**AVALIAÇÃO DA INSTABILIDADE MITÓTICA DE *Aspergillus nidulans*
ATRAVÉS DE TÉCNICAS GENÉTICAS CLÁSSICAS E FUSÃO
DE PROTOPLASTOS**

**CLAUDIA BARROS MONTEIRO
- Bióloga -**

ORIENTADORA: PROF. Dr^a ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

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

**P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo-Brasil
Dezembro-1989**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Monteiro, Cláudia Barros

M775a Avaliação da instabilidade mitótica de Asper-
gillus nidulans através de técnicas genéticas clá-
sicas e fusão de protoplastos. Piracicaba, 1989.
135p. ilustr.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Aspergilo - Instabilidade mitótica - Avalia-
ção 2. Fungo patogênico - Genética 3. Fungo patogê-
nico - Protoplasto I. Escola Superior de Agricultu-
ra Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.2

AVALIAÇÃO DA INSTABILIDADE MITÓTICA DE *Aspergillus nidulans*
ATRAVÉS DE TÉCNICAS GENÉTICAS CLASSICAS E
FUSÃO DE PROTOPLASTOS

CLAUDIA BARROS MONTEIRO

Aprovada em: 15.03.90

Comissão julgadora:

Prof^a. Dr^a. Aline A. Pizzirani-Kleiner

ESALQ/USP

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

ESALQ/USP

Prof^a. Dr^a. Lidia Favraud

UFRJ

Aline A. Pizzirani-Kleiner
Prof^a. Dr^a. Aline A. Pizzirani-Kleiner
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Com carinho agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram a realizar este trabalho, especialmente a:

- Prof^a Dr^a Aline A. Pizzirani-Kleiner, pela orientação e dedicação;
- Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela atenção e sugestões;
- Prof^a Maria Helena Pelegrinelli Fungaro por ter me iniciado na pesquisa científica e a quem tenho muito carinho;
- Prof. Dr. Tadeu Elisbão, pela orientação durante minha graduação;
- Prof^a Dr^a Sílvia Maria Frigo, pela atenção durante meu estágio curricular na graduação;
- Adriana Cristina Longo e Saete A. Gaziola pelo auxílio na revisão do manuscrito;
- Marisa Vieira de Queiroz e Sílvia Maria Guerra Molina pelas discussões e auxílio no manuscrito;
- Mônica R. Bertão, Vânia A. Vicente, José Sebastião Cunha Fernandes, Vitor Warwar, Cláudia Silva pela amizade;
- Aos amigos de sempre Maria Helena W. Guglielmi, Sílvia C. Crepaldi, Fátua R. C. Ritz e Alfredo C. Coletti;

- Funcionários Antônio José Rocha Campos, Carlos A. Nolasco e Sandra R. Campos Wher, do laboratório de genética de microrganismos e a Carmen M. S. F. Pilotto, secretária da P. G. na Genética;
- Terezinha J. L. Barrete, Nilce Puga e Sílvia M. Zinsly pela ajuda nas referências bibliográficas;
- Colegas do curso de Pós-graduação;
- Professores do curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas;
- à CAPES pela concessão de Bolsa de Estudos;

SUMARIO

página

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Introdução	3
2.2. Elementos genéticos móveis: estudos recentes em eucariotos e procariotos	4
2.3. Instabilidade genética em <i>Ascobolus immensus</i>	14
2.4. Instabilidade genética em <i>Neurospora crassa</i>	16
2.5. Instabilidade genética em <i>Aspergillus</i> <i>nidulans</i>	18
2.5.1. Aberrações cromossômicas estruturais	19
2.5.2. Aberrações cromossômicas numéricas	23
2.5.3. Fatores que influenciam a instabilidade	25
2.6. Os elementos móveis de McClintock e a instabilidade de <i>A. nidulans</i>	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Linhagens	34
3.2. Meios de cultura e soluções	37
3.2.1. Meio mínimo (PONTECORVO et alii, 1953)	37
3.2.2. Meio completo (AZEVEDO e COSTA, 1973, modificado)	37
3.2.3. Meio mínimo-galactose (ROBERTS, 1959)	37
3.2.4. Meio de acetato de amônio (APIRION, 1962)	38
3.2.5. Meio completo	38

3.2.6. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo	38
3.2.7. Meio completo duas vezes concentrado	38
3.2.8. Solução de vitaminas	39
3.2.9. Solução "tween 80"	39
3.2.10. Solução salina	39
3.2.11. Solução de benlate [metil(butil carbamoil)-2-benzimidazole carbamatol (HASTIE ,1970)	40
3.2.12. Suplementos adicionados ao meio mínimo	40
3.2.13. Tampão fosfato pH=5,8 (0,2M)	41
3.2.14. Tampão fosfato (0,02M)	41
3.2.15. Solução de giemsa	41
3.2.16. Solução de HCl 1N	41
3.2.17. Solução de KCl 1,2M	42
3.2.18. Solução de KCl 0,6M	42
3.2.19. Solução de enzimas	42
3.2.20. Solução de polietilenoglicol (PEG) 30%	43
3.2.21. Solução estoque de acrilamida (30% acrilamida, 0,8% N-metileno-bis-acrilamida)	43
3.2.22. Tampão do gel separador pH 8,9	43
3.2.23. Tampão do gel empilhador pH 6,8	44
3.2.24. Tampão do tanque ou eletrólito pH 8,9	44
3.2.25. Tampão da amostra	44
3.2.26. Fixador "álcool gel wash"	45
3.2.27. Preparo do gel	45
3.2.27.1. Gel separador a 10%	45
3.2.27.2. Gel empilhador a 4%	45
3.2.28. Coloração do gel	46

3.2.28.1. Esterase (EST)	
(SHAW & PRASAD, 1970)	46
3.3. Placas de análise genética	46
3.4. Placas de regeneração de protoplastos	47
3.5. Uso de palitos para a transferência	
de colônias	47
3.6. Esterilização e incubação	47
3.7. Isolamento de setores deteriorados	
originados da linhagem A	48
3.8. Técnicas de análise genética	48
3.8.1. Obtenção de heterocários	48
3.8.2. Isolamento de diplóides	48
3.8.3. Análise mitótica	49
3.8.4. Análise meiótica	50
3.8.4.1. Segregação em meio completo	
mais estabilizador	51
3.9. Testes de alelismo	52
3.10. Obtenção e regeneração de	
protoplastos (HAMLYN et alii, 1981)	53
3.11. Fusão de protoplastos (PEBERDY, 1979)	54
3.11.1. Obtenção dos produtos de fusão	54
3.11.2. Isolamento de diplóides	55
3.11.3. Análise mitótica	55
3.11.4. Transferência do caráter	
deteriorado	56
3.12. Efeito do benlate sobre os diplóides	56
3.13. Técnicas de coloração de núcleos	
de protoplastos (BORGES, 1987)	57
3.14. Técnicas eletroforéticas (PACCOLA	
et alii, 1988)	57
3.14.1. Preparo das amostras	57
3.14.2. Montagem das placas de	
eletroforese vertical	58

3.14.3. Aplicação das amostras e corrida da eletroforese	59
3.14.4. Revelação das esterases	59
4. RESULTADOS	60
4.1. Obtenção espontânea dos deteriorados	60
4.2. Técnicas de análise genética	64
4.2.1. Obtenção dos heterocários	64
4.2.2. Isolamento de diplóides	64
4.2.3. Haploidização	65
4.2.4. Análise mitótica	67
4.2.5. Análise meiótica	71
4.3. Testes de alelismo	76
4.4. Obtenção e regeneração de protoplastos	78
4.5. Fusão de protoplastos	80
4.5.1. Análise mitótica	82
4.6. Efeito do benlate sobre os diplóides	90
4.7. Transferência do caráter deteriorado	92
4.8. Coloração de núcleos de protoplastos	95
4.9. Eletroforese	98
5. DISCUSSÃO	100
5.1. Obtenção espontânea dos deteriorados	100
5.2. Técnicas de análise genética - metodologia clássica e fusão de protoplastos	102
5.2.1. Obtenção de diplóides e haploidização	102
5.2.2. Segregação meiótica	104
5.2.3. Localização dos determinantes de deterioração	105
5.3. Testes de alelismo	107
5.4. Efeito do benlate sobre os diplóides	109
5.5. Obtenção, regeneração e fusão de protoplastos	110
5.5.1. Frequência de regeneração	110

página

5.5.2. Frequência de fusão	111
5.5.3. Transferência do caráter deteriorado.....	113
5.6. Coloração de núcleos de protoplastos	114
5.7. Eletroforese	115
6. CONCLUSÕES	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	119

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1. Marcadores genéticos da linhagem MSE de <i>Aspergillus nidulans</i>	34
2. Marcadores genéticos da linhagem A de <i>Aspergillus nidulans</i>	35
3. Marcadores genéticos e fenotípicos dos mutantes utilizados	36
4. Variantes deteriorados isolados em meio completo a 37°C por oito dias de incubação	63
5. Linhagem MSE e colônias haplóides deterioradas, HV94, que apresenta os marcadores genéticos da linhagem MSE e V94, isoladas em meio completo após cinco dias de incubação a 37°C	94
6. Protoplastos do V96 obtidos após três horas de incubação em solução de enzimas	97
7. Padrão eletroforético de bandas do sistema esterase das linhagens A e MSE e dos variantes deteriorados	99

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1. Frequência total de setores por colônia da linhagem A	61
2. Frequência total de setores por colônia da linhagem A	61
3. Descrição morfológica dos setores deteriorados obtidos	62
4. Coloração e diâmetro dos conídios haplóides das linhagens A e MSE e dos diplóides entre os variantes deteriorados e a MSE	66
5. Análise mitótica dos segregantes do V93	68
6. Análise mitótica dos segregantes dos V94, V94.1, V95 e V95.1	69
7. Análise mitótica dos segregantes deteriorados e normais dos V96 e V96.1	70
8. Localização dos determinantes de deterioração nos grupos de ligação	71
9. Segregantes obtidos através do ciclo sexual pelo cruzamento entre variantes deteriorados e de primeira ordem e a linhagem MSE semeados em meio completo)	72
10. Segregantes obtidos através do ciclo sexual pelo cruzamento entre variantes deteriorados e de primeira ordem e a linhagem MSE (semeado em meio completo estabilizador osmótico)	73
11. Análise meiótica do cruzamento V93xMSE	73
12. Análise meiótica do cruzamento V94xMSE	74
13. Análise meiótica do cruzamento V94.1xMSE	74
14. Análise meiótica do cruzamento V95xMSE	74
15. Análise meiótica do cruzamento V95.1xMSE	75

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
16. Análise meiótica do cruzamento V96xMSE	75
17. Análise meiótica do cruzamento V96.1xMSE.....	75
18. Variantes e segregantes utilizados nos testes de alelismo, nos diferentes grupos de ligação	77
19. Testes de alelismo	78
20. Frequência de regeneração de protoplastos da linhagem MSE e variantes deteriorados	79
21. Cor dos conídios das colônias deterioradas em meio completo mais estabilizador osmótico	80
22. Frequência de fusão citoplasmática entre a linhagem MSE e os variantes deteriorados e a linhagem A.....	81
23. Porcentagem de regeneração da linhagem MSE e dos variantes deteriorados V93, V94.1 e V96 após incubação com PEG	82
24. Coloração e diâmetro dos conídios diplóides obtidos por fusão de protoplastos	83
25. Análise mitótica dos segregantes normais dos diplóides V93xMSE obtidos por fusão de protoplastos	84
26. Análise mitótica dos segregantes normais e deteriorados dos diplóides V94xMSE obtidos por fusão de protoplastos	85
27. Análise mitótica dos segregantes normais e deteriorados dos diplóides V94.1xMSE obtidos por fusão de protoplastos	86
28. Análise mitótica dos segregantes normais e deteriorados dos diplóides V95xMSE obtidos por fusão de protoplastos	87
29. Análise mitótica dos segregantes normais e deteriorados dos diplóides V95.1xMSE obtidos por fusão de protoplastos	88

TabelaPágina

30. Análise mitótica dos segregantes normais e deteriorados dos diplóides V96xMSE obtidos por fusão de protoplastos	89
31. Análise mitótica dos segregantes normais e deteriorados dos diplóides V96.1xMSE obtidos por fusão de protoplastos	90
32. Número de colônias e setores e a média de setores por colônia obtidos da haploidização com solução benlate de haplóides P (ROPER, 1952) e F (PEBERDY, 1979), dos diferentes variantes	91
33. Número e frequência dos tipos de setores normais (N) e deteriorados (D) obtidos a partir dos diplóides P e F dos diferentes variantes	92
34. Número e tipo de colônias analisadas de cada variante deteriorado, para a recuperação de colônias haplóides deterioradas com os marcadores genéticos da linhagem MSE	93
35. Número e frequência de núcleos de protoplastos das linhagens MSE, ppy e A e dos variantes deteriorados, após três horas de incubação com o sistema lítico	96

**AVALIAÇÃO DA INSTABILIDADE MITÓTICA DE *Aspergillus nidulans*
ATRAVÉS DE TÉCNICAS GENÉTICAS CLASSICAS E FUSÃO DE
PROTOPLASTOS**

Autora: CLAUDIA BARROS MONTEIRO

Orientadora: PROF. DRa. ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER

RESUMO:

A instabilidade genética observada no fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*, é semelhante em muitos aspectos aos estudos em milho de McCLINTOCK (1951), com os elementos genéticos móveis. Muitos trabalhos vêm sendo realizados desde 1960 no sentido de caracterizar através da genética clássica, e mais recentemente com as técnicas modernas, o fenómeno de transposição.

A instabilidade deste fungo é observada na forma de setores produzidos por uma linhagem que apresenta uma duplicação de um segmento do grupo de ligação I translocado para o grupo de ligação II. Tais setores originados por deleções, novas duplicações, outros rearranjos e por transposição podem ser classificados em melhorados, deteriorados e heterocarióticos.

Este trabalho pretendeu ser mais uma contribuição aos estudos básicos dessa instabilidade. Inicialmente através do isolamento de setores deteriorados e sua análise genética via metodologia clássica, já que tais setores podem ser originados por transposição. Foram analisados 7 variantes deteriorados através do ciclo sexual

e parassexual, sendo que os determinantes de deterioração foram localizados nos grupos de ligação III e IV.

Utilizando-se de técnicas modernas através da obtenção, fusão e regeneração de protoplastos, a análise genética dos variantes foi feita em diplóides obtidos por fusão. Nenhuma alteração foi detectada quanto a localização dos determinantes genéticos de deterioração na análise mitótica dos 7 variantes.

E finalmente foi verificado se ocorre transposição pela fusão citoplasmática, através da fusão dos protoplastos. Foi encontrado 1 variante haplóide com fenótipo deteriorado e marcadores genéticos da linhagem MSE, pela fusão de protoplastos desta linhagem com o variante V94, em menos que 600 colônias analisadas.

Para se alcançar esses três objetivos, outros pequenos ensaios complementares foram feitos, como a segregação meiótica dos cruzamentos entre variantes deteriorados e a linhagem MSE, em meio com estabilizador osmótico, para diminuir a desvantagem seletiva dos deteriorados em relação as colônias normais; porcentagem de regeneração e fusão de protoplastos, um estudo comparativo das linhagens A, MSE e variantes deteriorados; verificação da toxicidade do PEG aos variantes deteriorados; efeito do fungicida benlate sobre a instabilidade dos diplóides obtidos pela metodologia clássica e fusão de protoplastos; e padrão eletroforético das enzimas do sistema esterase das linhagens A, MSE e variantes deteriorados.

EVALUATION OF THE MITOTIC INSTABILITY OF
Aspergillus nidulans BY CLASSICAL GENETIC TECHNIQUES
AND PROTOPLAST FUSION

Author: CLAUDIA BARROS MONTEIRO

Adviser: Prof. Dr. ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER

SUMMARY:

The genetic instability found in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* is, in many aspects, similar to the studies of moving genetic elements in maize, done by McCLINTOCK (1951). Since 1960, many studies have been carried out with the aim of understanding the phenomena of transposition, initially by using classical genetic techniques and more recently by using modern techniques.

The instability of this fungus is observable by the production of sectors by strains which possess a duplicated segment of linkage group I translocated to linkage group II. Such sectors, originated either by deletions, new duplications, transposition or by other rearrangements, may be classified as improved, deteriorated or heterokaryotic.

This work is a contribution to the basic studies of this instability, and is divided into three main parts. Initially, deteriorated sectors were isolated and genetically analyzed by classical methods, since such sectors may be originated by transposition. Seven

deteriorated variants were analyzed by their sexual and parasexual cycles. The determinants of deterioration were found to be localized in linkage group III and IV.

Modern techniques, namely the obtainment, fusion and regeneration of protoplasts, were used and genetical analysis of variants were carried out on diploides obtained by fusion. No alteration of the localization of the genetic determinants of deterioration was detected by mitotic analysis of the seven variants.

Finally, protoplast fusion was used to verify if transposition occurs from cytoplasmic fusion. A haploid variant, with a deteriorated phenotype and genetic markers of the MSE strain, was found from the protoplasmic fusion of this strain with the variant V94, within less than 600 analyzed colonies.

To achieve the above objectives, other small complementary assays were done, such as the meiotic segregation of the crosses between deteriorated variants and the MSE strain, in a medium containing osmotic stabilizer, with the aim of decreasing the selective disadvantage of the deteriorates; a comparative study of strains A and MSE and deteriorated variants as to percentage of regeneration and fusion of protoplasts; examination of PEG toxicity to deteriorated variants; effect of benlate fungicide upon the instability of the diploids obtained by classical methodology and by protoplast fusion; and the eletrophoretic pattern of the enzymes of the esterase system of strains A and MSE and deteriorated variants.

1. INTRODUÇÃO

O fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* serve bem como um modelo de estudos básicos e aplicados. Trabalhos em diversas áreas vêm sendo realizados desde a obtenção de mutantes, mapeamento de genes, melhoramento genético, até clonagem, transformação e isolamento de genes pela genética molecular. Como não poderia faltar, estudos sobre a instabilidade genética devida a elementos móveis é uma das linhas seguidas pela genética clássica. Entretanto, as técnicas de genética molecular têm ficado de lado a esse respeito.

A partir dos trabalhos de McCLINTOCK (1951), os elementos móveis foram descritos em vários organismos, procariotos e eucariotos, com inúmeros trabalhos. Apesar disso, pouco se sabe sobre os mecanismos de transposição e sua regulação. Para os procariotos, os estudos sugerem a existência de diferentes modelos para os vários transposons. Quanto aos eucariotos, bem estabelecido é a presença de sequências de DNA medianamente repetitivas, interdispersas pelos genomas, capazes de inserção e excisão e provocar rearranjos em sua estrutura. Entretanto, poucas idéias existem sobre o papel desses elementos nos organismos e a sua importância no processo evolutivo.

O marco inicial sobre a instabilidade mitótica em *A. nidulans* foi desenvolvido por BAINBRIDGE e ROPER em 1966, sendo que a descrição de uma linhagem com marcadores genéticos apropriados por NGA e ROPER (1968) inseriu definitivamente os estudos sobre instabilidade na

genética deste fungo. Tal linhagem apresenta um segmento duplicado do grupo de ligação I translocado para o grupo de ligação II (linhagem A) e produz frequentemente três tipos de setores: melhorados, deteriorados e heterocarióticos.

A instabilidade genética deste fungo é, então, observada na forma de setores, que podem ser isolados e analisados geneticamente, interessante vantagem em relação aos estudos em grãos variegados de milho de McCLINTOCK (1951). Entre os dois tipos de trabalhos existem uma série de características comuns, principalmente no que se refere a aberrações cromossômicas provocadas pela presença de elementos móveis.

Qualquer trabalho nesta área está bem justificado, principalmente pelo possível isolamento de um elemento transponível em *A. nidulans*, que poderá ser utilizado como veículo de clonagem de uma substância economicamente importante. Estudos neste sentido já existem para os transposons de bactérias e os elementos P de *Drosophila*.

Este trabalho segue os estudos iniciados por AZEVEDO e ROPER (1970), que analisaram os variantes deteriorados obtidos a partir da linhagem A, e apresenta os seguintes objetivos:

- 1) isolar setores deteriorados obtidos espontaneamente a partir da linhagem A e analisá-los geneticamente pela metodologia clássica;
- 2) analisar os variantes deteriorados através de diplóides obtidos por fusão de protoplastos e verificar se ocorre alteração na localização dos determinantes genéticos de deterioração de variantes submetidos a essa técnica;
- 3) verificar se ocorre transposição através de fusão citoplasmática pela técnica de fusão de protoplastos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Introdução

A presente revisão bibliográfica propõe-se a apresentar: 1) um breve resumo sobre a natureza e as características gerais dos elementos genéticos móveis, também chamados de elementos móveis ou elementos transponíveis; 2) em que estágio encontram-se os estudos nos diversos organismos, desde bactérias e leveduras, a eucariotos superiores; 3) a instabilidade relacionada a esses elementos em fungos filamentosos como *Ascobolus immersus* e *Neurospora crassa*; e 4) mais detalhadamente a instabilidade observada em *Aspergillus nidulans*; bem como 5) comparar os estudos de McCLINTOCK (1951) (em milho) e outros relacionados, com os trabalhos sobre esse assunto em *A. nidulans*.

São diversas as formas e os mecanismos moleculares dos elementos transponíveis, mas existem algumas características básicas que permitiram sua detecção em vários organismos após os experimentos de McCLINTOCK (1951), como por exemplo em *Drosophila*, soja, trigo, ervilha, leveduras, fungos filamentosos e bactérias, entre outros.

Inúmeros trabalhos já foram desenvolvidos na busca de evidências genéticas de sua presença através de cruzamentos e análises básicas. Nas linhas de pesquisas hoje, com relação aos elementos genéticos móveis,

encontram-se estudos nos quais os laboratórios têm-se utilizado de eletroforeses seguidas de "Southern Blot". No caso específico de *Drosophila* a técnica mais empregada é a hibridação *in situ* dos cromossomos politênicos.

Em fungos filamentosos, apenas a genética clássica tem sido empregada na forma de cruzamentos e avaliação da instabilidade, com exceção de *Neurospora crassa* que foi estudado através de técnicas moleculares.

2.2. Elementos genéticos móveis: estudos recentes em procariotos e eucariotos.

A importância dos elementos genéticos móveis, e a quantidade de trabalhos que foram e estão sendo feitos desde 1950, refletem uma nova maneira de compreender a estrutura dos cromossomos. Estes eram tidos como estruturas conservativas, isto é, com uma quantidade exata de informações, numa ordem sequencial bastante estável, onde somente recombinações entre segmentos homólogos de DNA e/ou aberrações cromossômicas poderiam promover alterações.

Entretanto, BARBARA McCLINTOCK em 1951, estudando fenótipos instáveis em milho (aparência variegada dos grãos) sugeriu a existência de elementos controladores capazes de se excisarem e de se translocarem para outras partes do genoma, causando instabilidade na expressão dos genes. Além disso, seriam responsáveis por alterações na organização dos cromossomos, tais como, deleções, inversões e duplicações. Tais processos que não envolvem o sistema de recombinação clássico, com enzimas que atuam apenas sobre segmentos homólogos de DNA, têm sido chamados coletivamente de recombinação ilegítima.

Em procariotos, tais elementos, foram

descobertos em *Escherichia coli*, e identificados como causadores de uma nova classe de mutações com caráter fortemente polar, ou seja, mutações que localizando-se em um gene integrante de um operon, afetavam não apenas esse gene, mas também genes distais a ele em relação ao promotor.

Os elementos IS (sequências de inserção) foram os primeiros a serem estudados e, com o aparecimento da técnica do DNA recombinante, rapidamente tornou-se possível cloná-los e estudá-los mais profundamente. Através destas técnicas, descobriram que quando dois destes IS ocorrem relativamente próximos são capazes de movimentarem-se como uma unidade, carregando entre eles alguns genes, o que WATSON et alii (1983) denominaram de transposon.

Tais estruturas podem ser encontradas tanto em plasmídios como nos cromossomos. Além disso, vários transposons carregam genes para a expressão de resistência a drogas ou a bacteriófagos (KLECKNER, 1981).

Os elementos móveis causam alterações na organização e expressão dos genomas a frequências comparáveis ou maiores do que as taxas de mutação espontânea (10^{-4} a 10^{-7}), por diferentes caminhos:

- 1) como consequência direta da inserção do transposon ou rearranjo promovido por transposição;

- 2) devido à recombinação entre duas cópias de um elemento presentes em diferentes localizações.

Quanto à estrutura, os elementos IS são segmentos de DNA com 800-1500 nucleotídeos, que codificam exclusivamente proteínas envolvidas no processo de sua transposição. Cada IS apresenta em suas extremidades certas sequências de bases invertidas, geralmente com 10 a 40 pb (pares de bases).

A especificidade para a seleção de um sítio de inserção parece ser uma propriedade intrínseca de cada

elemento IS. Alguns se inserem somente em um ou em poucos sítios, outros se inserem em um grande número de sítios alvos e uma terceira categoria parece inserir-se mais casualmente.

O mecanismo de transposição do IS envolve duplicação do elemento e a inserção de sua cópia em um novo sítio, de forma que o elemento inicial não deixe o sítio de origem.

Quando o IS se transpõe, uma sequência de DNA alvo é duplicada, resultando na repetição direta dessa sequência em cada lado do elemento. Para cada elemento, a sequência repetida por evento de transposição pode ser diferente, mas seu tamanho é constante, normalmente 5 ou 9 pb. Essa duplicação parece ser decorrente do mecanismo de transposição, que envolve duplicação exclusiva do elemento, quebra precisa em duas extremidades e ligação ao DNA alvo, que é cortado de forma específica com defasagem de certo número de bases entre as duas fitas, que origina uma duplicação direta (NEWTON, 1987).

Muito pouco se conhece acerca do mecanismo de transposição do IS, sendo provável que diferentes IS sigam modelos diversos de transposição.

Quanto aos transposons, são sequências de DNA com mais de 2000 pares de nucleotídeos e apresentam uma região central flanqueada por sequências repetidas de DNA, que podem ter a mesma orientação em ambas as terminações ou ter uma orientação invertida. Estas consistem de sequências idênticas de IS.

Supõe-se que o mecanismo de transposição dos transposons ocorre por formação de cointegrados. Cortes nas extremidades do transposon e cortes defasados no alvo são necessários. Ocorre então união das extremidades livres do transposon e do alvo, duplicação do elemento e formação dos cointegrados. Para a resolução ocorre recombinação entre as duas cópias do transposon liberando os dois replicons

(NEWTON,1987).

Estudos com objetivo de identificar e mapear os fatores envolvidos na transposição, bem como compreender o seu mecanismo vêm sendo realizados por TSUDA & LINO (1988) com plasmídios TOL de *Pseudomonas* (pWWO) que possui genes para a degradação do tolueno (xyl). Pela manutenção instável do pWWO em *E. coli*, identificaram dois elementos transponíveis que transportavam todos os genes xyl. Um elemento corresponde ao transposon de 56 Kb, o Tn4651, e o outro de 70 Kb, o Tn4653 que inclui o anterior. A análise genética demonstrou que a formação de um cointegrado requer um fator transposase, que é codificado por um elemento de 3 Kb no final do Tn4653. A resolução do cointegrado deve ser mediada por "fatores necessários para resolução".

Existem alguns ISs ou Tns que apresentam especificidade quanto ao sítio de inserção. MARTINEZ e LA CRUZ (1988) estudaram a detecção dos chamados "hot-spot" (pontos quentes).

Através de eletroforese e "Southern Blot", vários autores têm feito mapeamento através da inserção física do Tn e análises de mutações causadas pela inserção de IS (JAKOWEC, 1988).

A clonagem de gene no transposon e inserção em outras bactérias tem sido a nova arma da Engenharia Genética. WALKER e PEMBERTON (1987) clonaram o gene para poligalactonurase transeliminase no Tn5, inseriram no plasmídio pR751 de *Klebsiella oxitoca* (pR751 :: Tn5 - Pga⁺) e transformaram *E. coli* e *Aeromonas hydrophila* entre outras.

Um método simples baseado no uso de um derivado do Tn5 (Tn5-lux), foi projetado para introdução e expressão estável do caráter bioluminescência em variedades gram negativas (BOIVIN et alii, 1988). O Tn5-lux contém os genes para luciferase (genes A, B) de *Vibrio harveyi* responsáveis pela bioluminescência, mostrando ser útil para a localização e enumeração de associações planta-bactéria.

DE VOS *et alli* (1986) já haviam mostrado que o Tn5 podia ser facilmente transferido para *Rhizobium*. Três linhagens de *Rhizobium leguminosarum* foram ensaiadas quanto à luminescência em associações. O Tn5-lux também foi transferido para *Pseudomonas* e *Agrobacterium*. A expressão de bioluminescência em nódulos fixadores de nitrogênio é importante para confirmar a presença de uma linhagem rizobial sem a necessidade de qualquer tipagem.

Em eucariotos os elementos genéticos móveis foram descobertos em milho, há mais de 30 anos por McCLINTOCK (1951). Os elementos controladores foram descritos antes dos transposons e são semelhantes a eles quanto a inserção: a integração de um elemento dentro de um locus pode produzir um fenótipo mutante, enquanto que a excisão pode trazer a expressão normal.

Se o locus em que o elemento está integrado contribui para um fenótipo visível, tal como pigmentação, a eventual excisão durante o desenvolvimento resulta numa aparência variegada, fornecendo deste modo um critério de identificação para o início dos estudos.

Os mecanismos moleculares de transposição em eucariotos não são conhecidos como os de procariotos. O que está bem estabelecido é que os genomas de eucariotos contêm sequências de DNA medianamente repetitivas interdispersas, sendo que sua capacidade de inserção dentro de genes estruturais pode ter um importante papel no curso do processo evolutivo. Entretanto, apesar da estrutura desses elementos ser agora bem conhecida, poucas idéias existem a respeito do seu papel no organismo (DÖRING e STARLINGER, 1986).

Em milho os elementos Ds/Ac ("Dissociator/Activator") apresentam semelhanças com os elementos transponíveis de muitos organismos já estudados: no sítio de inserção, ladeando esses elementos, aparecem sequências duplicadas em número de 8 pb e vários desses

elementos apresentam em suas extremidades sequências de 11 pb que aparecem invertidas.

O elemento Ds pode causar quebras cromossômicas perto de seu sítio de inserção na presença do elemento Ac. Como consequência dessas quebras e de subsequentes fusões de quebras terminais, vários tipos de rearranjos cromossômicos (inversões, deleções, translocações e duplicações) podem ser encontrados em estoques de milho que apresentam Ds e Ac. O elemento Ds não transpõe na ausência de Ac, talvez Ds seja Ac sem a sequência codificadora para transposase (COSTA, 1987). Existem outros sistemas em milho como En/Spm.

Linhagens de milho que não demonstram a presença de um elemento transponível particular podem vir a sofrer "stress genômico", geralmente acompanhados de quebras e subsequentemente apresentar atividade de um elemento transponível (DÖRING e STARLINGER, 1986).

Os principais estudos em milho relacionam-se com a descoberta de novas famílias de transposons. WALBOT e WARREN (1988) encontraram no gene Adh-1-S 3034, uma inserção de cerca de 1,4 kb chamada Mu 1. Pela análise desta sequência do DNA, descobriu-se que apresentava 1,367 kb com 213 e 215 pb de "repeats" (repetições) invertidos e 9 pb de sequência duplicada no sítio de inserção do hospedeiro.

DOONER et alii (1988) estudaram os tipos de rearranjos que ocorrem em milho devidos a elementos transponíveis, principalmente envolvendo deleções.

O isolamento de genes via transposição também tem chamado a atenção (MOTTO et alii, 1988). A maior parte das proteínas do endosperma do milho consiste de uma família de polipeptídeos relacionados, coletivamente conhecidos como zeína, diferindo no peso molecular e composição de seus aminoácidos. Devido à relevância da síntese de zeína no valor nutricional e ao fato de que o

sistema representa um conveniente modelo para o estudo da regulação gênica em plantas superiores, inúmeros estudos têm sido conduzidos sobre o controle genético da deposição de zeína.

O gene opaque 2 (o_2) é de particular interesse porque seu alelo recessivo modifica o conteúdo de proteína do endosperma numa maneira nutricionalmente favorável.

A metodologia utilizada foi a inserção de um elemento transponível autônomo no locus o_2 de milho, gerando um mutante instável $o_2 - m_5$. Para isso, utilizou-se o estoque wx - m_7 como doador de Ac num cruzamento, existindo, portanto, boas possibilidades do elemento Ac estar envolvido na origem de $o_2 - m_5$. Foi feito então, eletroforese dos fragmentos originados por enzimas de restrição, seguida de transferência para filtro de nitrocelulose e hibridação com fragmentos Ac ("probe"-sonda). Entre os fragmentos analisados, dois continham uma sequência que apresentavam estrutura semelhante ao Ac. O gene o_2 , com inserção Ac foi isolado por uma "probe" específica. Este isolamento representa a mais recente adição à lista de genes de milho clonados por transposição, que inclui os genes: Bz₁, P, A₁, C₂, R₁ e Bz₂.

Os elementos transponíveis em ervilha estão em fase de descoberta. SHIRSA (1988) estudou as proteínas armazenadas, comparando as sequências da região flanqueadora 5' dos genes legB e legC. Foi encontrada uma sequência com grande homologia com o terminal 3' de uma variedade de elementos transponíveis de plantas, incluindo o Tgm1 (soja), Tam (boca-de-leão) e En1 (milho). A hibridação mostrou que existem duas regiões no gene legC complementares que são separadas por 2,5kb de sequência não hibridizada. O sequenciamento desta região mostrou que terminações 5' e 3' formam um perfeito "repeat" (repetição)

invertido. Este elemento foi chamado Pisl ("pea insertion sequence 1").

Desde 1984 existem estudos sobre os elementos transponíveis Tam1 de *Antirrhinum majus* (boca-de-leão) (BONAS et alii, 1984). SOMMER et alii (1988) têm estudado as alterações na expressão gênica por excisão, via análise molecular, no locus nivea, importante na biossíntese da antocianina.

Em trigo, a presença de um elemento transponível também já foi observada em um de seus loci gênicos. O estudo dessa inserção foi conduzido por HARBERD et alii (1987), sendo o elemento móvel identificado, designado por Wis.

Em soja, os elementos Tgm (RHODES e VODKIN, 1988) apresentaram semelhanças com os de *Drosophila*, porque o mecanismo de transposição de ambos funciona de modo diverso em relação aos outros eucariotos. Entretanto, foram encontradas sequências comuns ao elemento En de milho.

As drosófilas apresentam sequências de inserção e elementos transponíveis bem caracterizados. Por exemplo, a família cópia apresenta longas terminações repetidas de aproximadamente 17pb (COSTA, 1987). Os principais experimentos utilizam de hibridação *in situ* dos cromossomos politênicos das glândulas salivares de larvas.

Existe uma semelhança estrutural entre o provírus de retrovírus e os elementos cópia, sugerindo um mecanismo particular para sua transposição. O RNA transcrito desses elementos pode ser copiado em DNA de dupla fita linear ou circular pela ação da transcriptase reversa, e esses produtos agora, podem se integrar em novos sítios do genoma. Alguns pesquisadores sugerem que os DNA de cópia circular constituem intermediários de transposição (COSTA, 1987).

Além da família cópia, existem outros elementos em *Drosophila*: FB, Alu e P. Os mais estudados em

1988 foram os elementos P, que estão bem caracterizados e estão envolvidos na digenesia híbrida, que é uma série de defeitos prejudiciais para a propagação do organismo, incluindo mutações, aberrações cromossômicas, segregação defeituosa na meiose e esterilidade. O mecanismo envolvido sugere que a transposase só é ativa no citoplasma P^- (ausência do elemento P), pois só ocorre digenesia híbrida quando um macho P^+ (presença do elemento P) fecunda uma fêmea P^- (COSTA, 1987).

Interessante é o rígido controle da presença desses elementos em *Drosophila*. Aparentemente, existe um limite de 30 a 35 cópias por genoma haplóide, pois em diferentes isolados geográficos este foi o limite encontrado, entretanto havia um grande polimorfismo quanto aos sítios de inserção (SYVANEN, 1984).

Os trabalhos concentram-se em cruzamentos que resultem em progênie com alta frequência de transposição e com relação à digenesia híbrida no sentido de diminuir esta carga genética em populações naturais (SIMMONS et alii, 1987; ROIHA et alii, 1988; PASYUKOVA et alii, 1988).

Na engenharia genética, os elementos P são importantes instrumentos para a mutagênese, clonagem e como vetores de transformação e de mobilização de outros elementos. A transferência de genes mediadas por elementos transponíveis oferece grande vantagem, por ocorrer em maior frequência e não resultar em rearranjo do DNA integrado (ROBERTSON et alii, 1988).

Em leveduras, CAMERON et alii (1979) iniciaram os trabalhos de elementos transponíveis com a descrição dos Ty ("transposons yeast"). Sua composição mostra uma região única de 5,2kb (elemento ϵ) flanqueada por um longo "repeat" terminal direto de cerca de 335pb (sequências δ).

Linhagens de laboratório apresentam cerca de

30 a 35 Ty e 100 seqüências ϕ , sugerindo que muitas vezes os ϕ não estão associados aos Ty. Assim, Ty e ϕ correspondem a uma família de DNA repetitivo e a recombinação entre eles pode levar a rearranjos genéticos (PICOLOGLOU et alii, 1988).

Da mesma forma que os elementos de *Drosophila*, os Ty têm mostrado que sua transposição ocorre via RNA intermediário e parece com o processo de retrotransposição.

Os elementos Ty parecem estar altamente coadaptados com o resto do genoma onde eles preferencialmente se inserem em regiões não codificadoras de genes estruturais, o que evita mutações permanentes (SYVANEN, 1984). Este é o caso de uma mutação his₄ 912 que resulta da inserção de um elemento transponível dentro da região não codificadora do gene his₄. Revertentes his⁺ são resultado da excisão por recombinação do elemento, deixando um segmento inserido de 334pb, que se estivesse inserido no gene estrutural poderia bloquear definitivamente sua função (FARABAUGH e FINK, 1980).

Em leveduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, os estudos estão bem avançados. CLARK (1988) descreveu o Ty3, muito semelhante aos Ty1 e Ty2 já conhecidos e que forma a mais nova família de elementos transponíveis.

Uma característica importante dos elementos móveis é promover rearranjos genéticos. PICOLOGLOU et alii (1988) e KUPIEC e PETES (1988) mostraram modelos de rearranjos em leveduras, como por exemplo, deleções e inversões provocadas pela homologia entre elementos ϕ distantes entre si, uma vez que 330pb são o suficiente para vários tipos de recombinação mitótica e meiótica.

Outro papel dos elementos móveis em leveduras é a sua participação na determinação do sexo. O "mating type" α ou a é definido por um locus do cromossomo

III (MAT), que determina a capacidade de acasalar e esporular. Fatores α e α , produzem diferentes feromônios que atuam especificamente sobre células de tipos opostos (COSTA, 1987). O mecanismo da expressão do tipo de acasalamento é baseado na transposição de genes que são inseridos e expressados, de maneira alternada, no locus MAT.

Elementos transponíveis já foram detectados em outros organismos, como em *Caenorhabditis elegans*, um nematóide bastante estudado (EMMONS et alii, 1986; EIDE e ANDERSON, 1985 e MORI et alii, 1988) cujo elemento foi chamado Tc.

Uma variedade de sequências de DNA são encontradas em metazoários superiores que podem indicar uma ocorrência generalizada de elementos transponíveis. Entretanto, essas sequências não têm mostrado mobilidade, como é o caso das sequências repetitivas e altamente repetitivas que sugerem um mecanismo de amplificação como causa de sua origem (SYVANEN, 1984).

Como pode ser notado, as características comuns a todos os elementos transponíveis são:

- 1) rearranjos estruturais;
- 2) duplicação de pb na sequência alvo provocada pela transposição;
- 3) a própria transposição dos elementos causando mutações;
- 4) sequências repetidas nas extremidades dos elementos.

2.2. Instabilidade genética em *Ascobolus immersus*

Em *A. immersus*, a instabilidade foi estudada através de mutantes para a coloração e tamanho dos esporos

(DECARIS *et alii*, 1978), que apresentavam uma sincronização na reversão. Um dos mutantes revertia ao tipo selvagem depois da indução da germinação do esporo, enquanto que um outro depois, antes da meiose dentro dos órgãos sexuais reprodutivos. Estes autores postularam a existência de elementos transponíveis no estoque 50 de *Ascobolus*, onde os mutantes instáveis resultavam da inserção de elementos dentro dos genes envolvidos, e a instabilidade desses mutantes era explicada pela frequente e precisa excisão desses elementos.

DECARIS *et alii* (1979) descreveram um possível mecanismo para essa instabilidade, através de cruzamentos entre linhagens instáveis, determinando tipos indutores de reversão e que eram passíveis de reversão (receptor-caráter induzível), indutores e não induzíveis, não-indutores e induzíveis ou não indutores e não induzíveis.

Em 1979, RIZET *et alii* continuaram os estudos, pela frequência de aparecimento de mutantes instáveis, distribuição dos loci afetados no genoma, existência de sítios de instabilidade sobre certos loci e modalidades de reversões de vários mutantes instáveis no mesmo locus. A questão do papel biológico desses elementos ficou sem resposta, como em todos os outros casos de estudos relacionados a elementos móveis. Foi constatado apenas que esses elementos atuavam sobre a expressão de certos genes em fases precisas do desenvolvimento.

NICOLAS *et alii* (1978) descreveram um sistema diferente de instabilidade para o estoque 28 de *Ascobolus*. Os autores sugeriram a existência de uma mutação inicial GO provocada pela inserção de um elemento transponível cujos derivativos refletiriam os vários tipos de rearranjos provocados por esse elemento. Esse estudo foi feito também com mutantes para cor e tamanho de esporos.

A determinação dos elementos transponíveis

de *A. immersus* foi conduzida apenas por estudos genéticos clássicos, sem qualquer caracterização a nível molecular, sendo portanto semelhantes aos primeiros estudos desenvolvidos em milho e *Drosophila*.

2.3. Instabilidade genética em *Neurospora crassa*

Em *Neurospora crassa*, os trabalhos são mais antigos do que os de *A. nidulans*, iniciados com a descrição de pequenas duplicações por DE SERRES em 1957. Entretanto, a progênie de cruzamentos que envolviam tais linhagens não apresentavam instabilidade somática.

Em 1963, BARNET e DE SERRES atribuíram a instabilidade não somente a quebras cromossômicas, mas a alelos instáveis originados após exposição a vários análogos de bases que causavam mutações relacionadas à transição gênica (isto é, substituições purina-purina ou pirimidina-pirimidina).

Durante o estudo do locus arg₁ em *N. crassa*, NEWMEYER (1965) descreveu a progênie de um cruzamento entre uma linhagem mutante e o tipo selvagem como sendo "Dark agars". Tais colônias tinham inicialmente crescimento muito lento, com uma morfologia característica, como se fosse uma aranha, e bastante pigmentada; depois de vários dias elas escapavam dessa inibição e cresciam como a selvagem. Muitas das culturas resultantes comportavam-se como se os dois alelos "mating type" estivessem presentes. Em 1967, NEWMEYER e TAYLOR mostraram que as "Dark agars" apresentavam duplicações viáveis produzidas por um crossing-over numa inversão pericêntrica, onde a inibição inicial poderia ser devida à heterozigosidade para o locus "mating type", que estava incluído na duplicação. Essa heterozigosidade comporta-se como uma incompatibilidade

vegetativa.

Em 1977, NEWMEYER e GALEAZZI sugeriram que a fertilidade dependia da perda completa do segmento duplicado conforme verificado na linhagem Dp (IL; IR)H4250. Os cromossomos de *Neurospora* conteriam terminais com sequências repetitivas de DNA homólogos, sempre orientado na mesma direção em relação ao terminal e que crossing-over mitótico entre essas sequências homólogas resultaria nos rearranjos observados. O modelo proposto explicaria somente a deleção precisa do segmento duplicado, outros fatores deveriam estar relacionados a deleções imprecisas e perdas dos segmentos normal e translocado.

Outros fatores têm mostrado efeito sobre a instabilidade de *N. crassa* como, por exemplo, mutantes sensíveis à luz ultravioleta, obtidos por NEWMEYER e GALEAZZI (1978) e denominados mutantes uvs e NEWMEYER et alii (1978) com o mutante mei₃, que causavam deleções de duplicações, aumentando a instabilidade.

Em 1989, KINSEY e HELBER isolaram o primeiro elemento transponível de fungos filamentosos em *N. crassa*. O objetivo dos autores era estudar a instabilidade do locus am (glutamato desidrogenase), pois é um gene que já foi clonado e é bastante conhecido a nível molecular, além de apresentar mutantes facilmente selecionáveis. Em experimentos iniciais, linhagens padrões foram ensaiadas, mas não houve indícios de mutações devido a elementos transponíveis. Utilizou-se, então, uma linhagem na qual NEWMEYER e GALEAZZI (1977) já haviam observado efeito de instabilidade na linhagem Dp(IL;IR)H4250. Através de cruzamentos com uma linhagem lys-1 (lisina), foram isolados alguns mutantes para am. Para detectar se as mutações foram causadas pela inserção de elementos transponíveis, amostras de DNA dos mutantes foram submetidas à análise dos fragmentos de restrição para o locus am com sondas de fragmentos desse gene. Também procederam o sequenciamento

de regiões desse gene, nos casos em que ocorreu produção de diferentes bandas no gel de eletroforese. Através deste método, foi possível localizar dois elementos transponíveis, cuja inserção causou duplicação de 14 e 17pb, constituindo uma mutação estável, pela inserção na região codificadora de am e uma segunda instável localizada "upstream" do sítio de início da transcrição de am. O elemento foi denominado Tad.

É interessante observar que vários fatos descritos por NEWMEYER e GALEAZZI em 1977, como quebras na linhagem Dp(IL;IR)H4250 podem ser devidos à recombinação entre elementos Tad dispersos no genoma.

Quanto ao mecanismo de transposição, existem semelhanças estruturais com os Ty de leveduras, sugerindo que este ocorre por retrotransposição.

2.4. Instabilidade genética em *Aspergillus nidulans*

Os estudos quanto à instabilidade genética de *A. nidulans* podem ser divididos em três linhas de pesquisa. A primeira, envolve as aberrações cromossômicas estruturais como a própria causa da instabilidade. Uma segunda linha que corre paralelamente à anterior, refere-se às aneuploidias, principalmente à obtenção de aneuplóides em linhagens com duplicação. E uma terceira linha que inicia a partir de 1970, com os fatores que alteram tal instabilidade, para melhor entender o complexo sistema que envolve a chamada "não-conformidade mitótica" (NGA & ROPER, 1969).

2.4.1. Aberrações cromossômicas estruturais

A instabilidade mitótica de *Aspergillus nidulans* foi estudada inicialmente sob o enfoque das aberrações cromossômicas, especificamente duplicações. O primeiro trabalho a descrever uma nova característica entre a progênie de cruzamentos de pais morfologicamente normais, foi o de BAINBRIDGE e ROPER (1966). Este novo tipo, apresentando menor taxa de crescimento e segregando em proporção constante foi designado "crinkled" (enrugado) e carregava uma duplicação (III e VIII) de um segmento cromossômico como resultado de uma translocação desigual de um pai.

Colônias "crinkled" mostravam instabilidade vegetativa, setorizando tipos com morfologia e taxa de crescimento aproximada da normal em vários graus. Esses revertentes provavelmente originaram-se de perdas de uma parte variável do segmento cromossômico em duplicata.

Anteriormente, estudos sobre aberrações cromossômicas vinham sendo desenvolvidos, como o trabalho sobre as origens de translocações em *A. nidulans* de KAFER e CHEN (1964) e KAFER (1965). Esses autores mostraram uma série de linhagens translocadas cuja origem vem de tratamentos com luz ultravioleta, raios x e γ , onde as radiações ionizantes produziram maior frequência de translocações.

Em 1968, NGA e ROPER introduziram definitivamente os estudos de instabilidade mitótica em *A. nidulans*, com a descrição de uma linhagem bastante interessante originada do cruzamento $\text{Iad}_{20}\text{bi}_1 / \text{I-IIad}_{20}\text{bi}_1 \times \text{pro}_1\text{paba}_6\text{y}; \text{w}_3$, onde foi selecionado recombinantes verdes enrugados com provável genótipo $\text{Ipro}_1\text{paba}_6\text{y} \text{ad}_{20}^+\text{bi}_1 / \text{I-IIy} \text{ad}_{20}^+\text{bi}_1$. Esta linhagem apresentamarcas genéticas no segmento duplicado, tornando fácil a detecção de deleções pela

simples observação da coloração dos setores. Os autores concluíram que ocorria uma perda preferencial do segmento translocado e que as perdas poderiam ser intersticiais, por exemplo, $y^- ad^+$ poderiam ser perdidos e bi^+ permanecer.

Colônias de linhagens com duplicação produziām então, frequentemente, dois tipos de setores. Uma classe de variantes fenotipicamente melhorados e uma segunda classe, observada mais raramente, com fenótipo deteriorado. Variantes melhorados resultavam de prováveis perdas do segmento duplicado e os variantes deteriorados por novas duplicações em tandem. Para explicar as deleções propuseram um mecanismo de crossing over dentro de um laço intra-cromossômico e, tentativamente como uma fonte de elementos transponíveis.

NGA e ROPER (1969), com o uso de linhagens normal, translocada e duplicada, demonstraram que o surgimento de setores melhorados era exclusivamente devido à duplicação, uma vez que a normal e translocada não apresentavam setores. A instabilidade mitótica foi detectada em três linhagens com duplicação de *A. nidulans* e parece ser uma propriedade desse tipo de linhagem. Os autores propuseram o termo "não conformidade mitótica" para este fenômeno de instabilidade, sendo provocado pelo desbalanço cromossômico.

Surgiram, então, algumas explicações para o fenômeno. NGA e ROPER (1966) tinham várias sugestões sobre os mecanismos envolvidos, entre eles: deleção terminal, mutação, permuta mitótica e permuta desigual entre cromátides irmãs. Uma outra possibilidade foi levantada pelos mesmos autores em 1969, propondo um estado heterocromático para um ou outro segmento duplicado, uma vez que a heterocromatina mostra uma menor estabilidade mitótica em relação à eucromatina. A proposta foi descartada pelo pouco conhecimento a respeito desse tipo de cromatina e a impossibilidade de evidências citológicas

(ELLIOTT, 1960).

Em 1969, ROPER e NGA descreveram uma terceira classe de setores obtidos a partir de linhagens com duplicações. Os hipohaplóides ocorriam por uma deleção além do segmento duplicado sendo, portanto, inviável e somente mantido no estado heterocariótico. A relativa imunidade de partes balanceadas do genoma sugeria que esses segmentos a mais eram perdidos como parte de uma grande deleção que incluía o segmento não balanceado.

BALL (1967) estudou a supressão de genes relacionados à instabilidade. Em um de seus variantes (BALL, 1966), originado por um evento de translocação espontânea, parte do cromossomo III foi para o cromossomo V. A região de união do fragmento foi o determinante genético da instabilidade e da supressão do gene meth₁ (requerimento metionina; cromossomo IV). Uma explicação para isto foi a formação de um novo cistron pela fusão dos dois segmentos, que determinou a estrutura de uma proteína, que apresentava a habilidade de suprimir a auxotrofia para a metionina. Em um outro caso, a supressão do gene arg₂ (requerimento arginina; cromossomo III) estaria relacionada ao efeito de posição, que poderia surgir a partir de uma transposição de um segmento eucromático para uma região heterocromática. Este autor já levanta a possibilidade do sistema complexo que envolve a instabilidade de *A. nidulans* estar relacionado com os sistemas já descritos em organismos superiores, como em milho (McCLINTOCK, 1951) e bactérias (DAWSON e SMITH-KEARY, 1963).

Outro trabalho que associa instabilidade com efeito de posição foi feito por CLUTTERBUCK (1970), com mutantes para o locus "bristle" (cerdas), onde o conidióforo permanece como uma hifa rígida ao invés de desenvolver uma vesícula, esterigma e conídios. O alelo bria₁₂ deste locus apresenta um fenótipo variegado, e a análise genética deste variante sugeriu uma translocação,

dando a idéia de que o final do cromossomo III é heterocromático e a associação deste com o segmento eucromático do grupo de ligação VIII causa a variação do locus "bristle".

Os estudos com translocações continuam com BAINBRIDGE (1970) com a linhagem que apresentava ligação meiótica entre marcas previamente localizadas separadamente nos grupos de ligação III e VIII. Essa linhagem é bem menos estudada do que a linhagem com duplicação I-II, pela presença favorável de marcas genéticas. ZUCCHI e AZEVEDO (1979), com a mesma linhagem, observaram um maior número de setores do que a linhagem Dp (I;II).

Em 1970, surge o primeiro trabalho que enfoca transposição: "Não-conformidade mitótica em *Aspergillus*: alterações genéticas transponíveis e sucessivas" por AZEVEDO e ROPER. Os setores deteriorados observados em linhagens duplicadas poderiam ser devidos às novas duplicações em tandem ou à transposição do determinante de deterioração. Começaram os estudos dos variantes deteriorados originados de linhagens com duplicação cromossômica. A proposta de transposição envolve perda de uma mutação de seu sítio original, resultando em várias alterações morfológicas e, em substancial aumento de estabilidade. A maioria dos variantes analisados apresentavam mutações em partes não duplicada do genoma, segregavam como genes simples e foram designados determinantes de deterioração. Mais uma vez é ressaltada a semelhança desse sistema de instabilidade com os elementos transponíveis de milho, bactérias e *Drosophila*. Enfatizando que uma característica comum a esses casos de instabilidade é a conhecida ou possível presença de material genético em duplicata.

MENEZES e AZEVEDO (1972) estudaram a reversão ao tipo morfológicamente parental em três variantes deteriorados, tanto espontaneamente como depois de tratamento

com luz ultra-violeta. De seis reversões analisadas geneticamente, cinco foram devidas a supressores, e apenas uma devido a retromutação. Sendo esta última possivelmente resultado de deleção de material genético inserido.

Em resumo, a linhagem A descrita por NGA e ROPER (1968) pode apresentar: setores melhorados, originados pela perda parcial ou total do segmento duplicado (NGA e ROPER, 1969); setores deteriorados, originados por inversão, novas duplicações em tandem ou transposições (NGA e ROPER, 1968 e AZEVEDO e ROPER, 1970); e setores heterocarióticos, originados pela deleção de um segmento maior do que o duplicado (NGA e ROPER, 1969).

2.4.2. Aberrações cromossômicas numéricas

Outra linha de pesquisa segue estudando não-disjunção em linhagens com aberrações cromossômicas. Foi descrito por KAUFER (1960) que aneuplóides podem ser facilmente isolados de diplóides semeados em baixa densidade em meio seletivo, sendo os principais tipos encontrados: colônias compactas, colônias com pobre conidiação e "background" escuro e colônias com pouco crescimento.

Não disjunção mitótica de diplóides resulta em aneuplóides com uma frequência relativamente alta, 1 a 2%, segundo KAUFER (1961). Esta frequência não é influenciada por aberrações cromossômicas, ao contrário de não-disjunção meiótica, em que POLLARD *et alii* (1968) e UPSHALL e KAUFER (1974) encontraram a frequência aumentada em cruzamentos envolvendo heterozigotos para aberrações.

Linhagens ou tratamentos particulares podem aumentar ou dar tipos de dissômicos específicos, como o caso de um variante deteriorado instável (V8) obtido por

AZEVEDO e ROPER (1970). Este variante apresentava alta frequência de não-disjunção mitótica espontaneamente, de 20 a 35 vezes mais que as linhagens A e MSE, testes genéticos associados ao fenótipo mostraram ser um dissômico para o grupo de ligação III (AZEVEDO, 1971). A linhagem A e o V8 somente diferem quanto à presença de um gene que causa alteração na morfologia da colônia (V8), que está localizado no grupo de ligação IV. Este gene parece ser responsável pela frequência de dissômicos, possivelmente devido ao aumento de não-disjunção mitótica do grupo de ligação III.

GABRIELLI e AZEVEDO (1980), com o mesmo V8, verificaram que não ocorriam variações na frequência de dissômicos em diferentes temperaturas e valores de pH. Entretanto, conídios coletados do centro da colônia, incubados por dez dias, tinham significativo aumento na frequência de dissômicos, comparados com os coletados das extremidades, onde eles são mais jovens. Tal fato sugeriu que a idade produz uma redução generalizada na eficiência mitótica, afetando assim, a distribuição dos cromossomos, como já foi observado em leveduras e até no homem, com aumento da frequência de trissômicos na síndrome de Down. No caso do V8 existe, ainda, a possibilidade do gene envolvido causar uma perda ou alteração da substância necessária à distribuição normal, especificamente do cromossomo III na mitose, que é aumentada pela idade.

Tratamento com acriflavina, segundo BALL e ROPER (1966) em conídios haplóides produz uma frequência de 25% de dissômicos para o cromossomo IV. PIZZIRANI (1977), com o uso de desoxicolato de sódio em meio de cultura, encontrou um maior número de dissômicos de maneira geral, talvez por esta substância facilitar a visualização do aneuplóide, pela diminuição do tamanho das colônias.

Os fenótipos dos oito dissômicos e trissômicos de *A. nidulans* foram descritos por KAUFER e

UPSHALL (1976). Utilizando-se linhagens normais, o isolamento foi feito através de vários métodos, incluindo produtos meióticos e diplóides crescidos em meio com *p*-fluorfenilalanina.

2.4.3. Fatores que influenciam a instabilidade

A partir desses trabalhos, o estudo da instabilidade ficou restrito a fatores que a alteram no sentido de modificar sua frequência, para ajudar a elucidar o processo de "não-conformidade mitótica".

Primeiramente, envolvendo condições em que o reparo do DNA é provavelmente reduzido, por exemplo por mutações que conferem sensibilidade à luz ultra-violeta (BURR et alii, 1971) ou a cafeína (ROPER et alii, 1972), que aumenta a instabilidade da linhagem A.

O efeito de ions manganês (Mn^{2+}) comparativamente em diplóides balanceados e não balanceados foram estudados por BURR et alii (1982). A ação do Mn^{2+} é redução de crossing-over mitótico, sendo mais efetivo em linhagens Dp(I,II) e sem efeito significativo em Dp(III,VIII). Existem uma série de explicações para o efeito do Mn^{2+} , entretanto os autores acreditam que a melhor seja a estabilização da hélice de DNA reduzindo o crossing-over em diplóides e deleção em Dp(I,II). A ineficiência em Dp(III,VIII) pode ser devida a lesões que impeçam a estabilização.

Outras substâncias, tais como brometo de etídio (BONATELLI e AZEVEDO, 1977) e 1-4-oxatin (AZEVEDO et alii, 1977) também reduzem a instabilidade. O fungicida 1-4-oxatin atua inibindo a respiração. É possível que o brometo de etídio atue sobre o DNA mitocondrial, reduzindo indiretamente o número de setores devido à falta de energia

como consequência da inibição da respiração. Ou, ainda, que ele atinja diretamente a haploidização e/ou crossing-over mitótico por atuar sobre o DNA e o mecanismo de reparo.

O efeito do cloroneb foi verificado por AZEVEDO e SANT'ANA (1975) e este, ao contrário, aumentava a instabilidade de linhagens com duplicação.

O azul de tripan foi também ensaiado em 1970 por COOKE et alii, nas linhagens A e B. Houve um aumento da instabilidade com o aparecimento preferencial de setores amarelos em A e verdes em B, mostrando principalmente deleção do segmento translocado. Azul de tripan foi também utilizado no trabalho de SEXTON e ROPER (1984), além de cumarina já ensaiada por MAJEFELD e ROPER (1978), mostrando também um aumento da instabilidade.

Outros dois mutagênicos, acriflavina e etil-metano-sulfonato (EMS) produziram alterações na instabilidade de linhagens com duplicação. O EMS foi responsável por dois eventos em variantes deteriorados, perda do determinante original e nova alteração genética, ou transposição do determinante de deterioração de uma região para outra do genoma (ROSATO, 1973 e ROSATO e AZEVEDO, 1978).

A temperatura é outro entre tantos fatores que interferem na instabilidade de linhagens duplicadas. LIEBER (1976) diz ser a instabilidade dependente da temperatura de crescimento. A frequência total de deleções de um cromossomo III duplicado é maior a temperaturas baixas, enquanto que deleções no grupo de ligação I é evidentemente maior a temperaturas elevadas. A variação da temperatura parece alterar as frequências de deleção ou reparo, mas não as de transposição ou de novas duplicações (NIFFINEGER-SOUZA, 1979). Esse autor encontrou variação na instabilidade relacionada à produção de setores, em temperaturas mais baixas houve uma maior frequência de setores verdes, e nas temperaturas mais altas, uma maior

frequência de setores amarelos. Sugerindo ou uma alteração preferencial de enzimas de reparo ou de velocidade para a formação de cópias para os segmentos envolvidos na duplicação. FAVRAUD, (1984), também observou aumento de instabilidade dentro dos limites de 30 a 40°C, da linhagem A e de seus variantes.

Fatores genéticos podem, ainda, alterar a instabilidade, como mutações de ponto ou outras aberrações cromossômicas. Depois de irradiação com luz ultra-violeta, dois variantes foram isolados por AZEVEDO (1975). Um deles devido a uma nova translocação envolvendo os grupos de ligação V e VIII, apresentou um aumento da estabilidade e o segundo, um aumento da instabilidade devido a um fator recessivo (stf₁) localizado no grupo de ligação VIII.

Uma situação similar já tinha sido encontrada por LEE e NGA (1974), onde uma linhagem com duplicação no grupo de ligação I e uma translocação (VI-VIII), possivelmente com um pequeno segmento do cromossomo VI em duplicata, foi extremamente estável. O ponto do grupo de ligação VIII responsável pela estabilidade mostrou-se semi-dominante em diplóides com a linhagem "master", enquanto que o fator stf₁ foi recessivo.

O alelo uvsE que determina sensibilidade à luz ultra-violeta, diminui a frequência de crossing-over mitótico intragênico, aumentando a instabilidade de linhagens Dp(I,II) e Dp(III,VIII). O alelo uvsB, que aumenta a frequência de crossing-over mitótico intragênico foi efetivo somente com a Dp(I,II), aumentando a frequência de crossing-over mitótico entre os cromossomos homólogos do segmento I, ambos os casos sugeriram falhas no sistema de reparo (BURR, 1982).

Outro gene descrito por PIZZIRANI-KLEINER e AZEVEDO (1986b), o bncA causa redução da instabilidade em linhagens com duplicação e em diplóides, sugerindo ser este responsável por um processo de estabilização. A presença do

gene bnca produz conídios binucleados e trinucleados, sendo extremamente influenciado pela temperatura, podendo estar envolvidos componentes termossensíveis no processo de migração de núcleos para os esterigmas (PIZZIRANI-KLEINER e AZEVEDO, 1986a).

A protoplastização provoca um aumento no número de setores deteriorados nas colônias da linhagem A que foram submetidas a essa técnica, embora as características dos deteriorados não pareceram diferir (QUEIROZ, 1988).

É interessante destacar que, de maneira geral, fatores que alteram a frequência de recombinação mitótica ou reparo do DNA alteram a instabilidade de linhagens com duplicação. O que era de se esperar já que a instabilidade mitótica de *A. nidulans* está intimamente ligada a processos que os envolvem, como permuta desigual entre cromátides irmãs, novas duplicações em tandem e até transposição de parte ou todo material extra para outro sítio do genoma como descrito por NGA e ROPER (1968 e 1969) e AZEVEDO e ROPER (1970).

2.5. Os elementos móveis de McClintock e a instabilidade de *A. nidulans*

Na fase inicial de seu trabalho, segundo JONES e KARP (1985) McCLINTOCK (1951) estava interessada no comportamento mitótico dos cromossomos com uma única quebra terminal. Estas quebras, no entanto, geralmente causavam deficiências de material genético, levando à inviabilidade dos gametas, particularmente dos gametas masculinos. Para transpor este obstáculo, ela obteve um cromossomo 9 com quebras terminais ("sticky end"), sem perda de qualquer gene. Durante as duas meioses que ocorrem ao longo do

desenvolvimento do grão de pólen, estas quebras cromossômicas dão início ao ciclo de quebra-fusão-ponte cromatídico. Quando as cromátides duplicam-se para a primeira mitose, as quebras terminais das cromátides irmãs se fundem, e na anáfase da mitose a ponte é formada entre os dois centrômeros.

Como os cromossomos irmãos movem-se, esta ponte é quebrada, com cada um deles levando uma nova quebra terminal. Este então repete o ciclo na segunda mitose do grão de pólen, que quando maduro carrega em seus núcleos germinativos, um cromossomo 9 intacto e outro com uma quebra terminal. Durante a fertilização, um vai no núcleo diplóide do zigoto e o outro para o núcleo triplóide do endosperma. No zigoto ocorre a cicatrização das quebras e no endosperma o ciclo continua. A ocorrência do ciclo de quebra-fusão-ponte pode ser monitorada geneticamente pelo uso de marcadores, refletindo-se na variação dos grãos, pois estavam envolvidos genes para cor e produção de amido. Outro ciclo mais complexo descrito por McCLINTOCK (1951) foi o de quebra-fusão-ponte cromossômico.

Em 1944, ela fez cruzamentos entre as plantas que apresentavam quebras terminais no cromossomo 9. Os embriões de 677 grãos que resultaram destes cruzamentos sofreram o ciclo de quebra-fusão-ponte, manifestando evidente instabilidade genética. Desses 677 grãos, apenas 383 formaram plantas maduras, sendo que entre as sobreviventes, várias apresentaram sinais de rearranjos cromossômicos, tais como translocações, inversões, duplicações, deficiências e fusão de "knobs". O rearranjo estrutural envolveu outros cromossomos que não o 9. Foi observado ainda, uma explosão de genes mutados, sendo 32 mutações estáveis e várias outras mutações instáveis. Uma dessas mutações instáveis apareceu na forma de alguns grãos variegados na espiga de uma planta, essa variação era de um novo tipo, não esperado.

A planta em questão tinha sido autopolinizada depois de desenvolvida do grão da espiga "earthquake" (que

apresentava quebra terminal), e nenhuma quebra terminal estava presente na ocasião da fertilização. A variegação tinha forma de pontos escuros num conteúdo sem cor, parecendo que a planta era heterozigota para o alelo dominante C^I (inibição da cor), e o alelo para aleurona "purple" (C) era recessivo. Os pontos foram de tamanho e número regular, como se C^I fosse removido do endosperma numa taxa x em um tempo y do desenvolvimento. Ela sugeriu que várias formas de quebras controladas fossem assumindo locais definidos, o que representava um novo fenômeno genético.

A fim de investigar esta nova forma de variegação, devido à instabilidade do locus C^I , ela cultivou os grãos com os pontos "purple" e utilizou as plantas assim obtidas em vários cruzamentos a fim de obter estoques com marcas adicionais no cromossomo 9S.

Nestes cruzamentos não haviam quebras terminais presentes nos cromossomos, mas a variegação permaneceu somente com um tipo de setor. Quando ela analisou o paquíteno na meiose, viu que as quebras estavam localizadas no braço curto do cromossomo 9, envolvendo somente um dos pares de homólogos, e sempre no mesmo sítio, na junção das regiões de hetero e eucromatina, como um sítio particular de quebra que ela chamou de "dissociação" (Ds), mapeando sua posição citológica.

O primeiro indício de controle sobre a expressão de Ds veio da descoberta de grãos sem qualquer variegação em plantas que eram esperadas quebras em Ds. Analisando a progênie de um cruzamento $O^{\gamma} C^I C^I Ds Ds$ e $O CCdsds$, somente metade dos grãos eram variegados e a outra metade mostrou fenótipo dominante C^I , onde se esperaria toda a progênie heterozigota com grãos variegados. Ela então sugeriu a presença de fatores heterozigotos que segregavam como uma unidade mendeliana e que eram necessários para a quebra de Ds. Este fator foi chamado de ativador ou elemento Ac, e é herdado independentemente de Ds.

Continuando os estudos, um evento não esperado ocorreu no locus C, alterando-o para uma nova forma mutável, c^{m-1} , marcando a descoberta de transposição. Assim a atividade do Ds não era necessariamente causar quebras cromossômicas. Outros loci mutáveis foram descobertos por ela: c^{m-2} , w^{m-1} , bz^{m-2} .

O elemento Ds era então, um elemento móvel, que McCLINTOCK (1951) detectou seu movimento para novas localizações. Da mesma forma que Ds, Ac inicialmente não apresentava posição conhecida, pois não estava ligada a qualquer marca do cromossomo 9, e os outros cromossomos não tinham tantas marcas; num cruzamento, eventualmente ele apareceu no cromossomo 9 a 20 unidades do locus wx, sendo mais tarde mapeado em outros locais do 9S.

Estes foram os primeiros elementos móveis descritos e que, sem dúvida nenhuma, a quantidade de experimentos, assim como a capacidade de interpretação dos resultados de Bárbara McClintock mereceu, apesar de tarde, o prêmio Nobel.

De maneira geral, elementos transponíveis existem nos genomas de todos os organismos, mas normalmente na forma críptica. No caso dos elementos Ac e Ds, parece que o ciclo de quebra-fusão-ponte iniciado liberou os elementos de seu estado quiescente dentro de uma região de heterocromatina. Os rearranjos cromossômicos induzidos pelo ciclo levou os elementos à forma ativa (JONES e KARP, 1985).

Neste contexto, identificam-se as características comuns entre a instabilidade genética dos elementos de McClintock e a instabilidade do *A. nidulans*. AZEVEDO (1972) mostra um possível modelo para transposição de material genético de um cromossomo para outro, citando que este lembra casos de integração de episômos em bactérias. Os rearranjos provocados pelas quebras que ocorrem tanto nos cromossomos envolvidos como nos não envolvidos no evento; as mutações estáveis e instáveis, bem como as diferentes

localizações dos elementos Ac e Ds, apresentam semelhanças com os rearranjos provocados pela duplicação na linhagem de NGA e ROPER (1968) ou com as mutações encontradas por BALL (1966, 1967) ou ainda com as diferentes localizações dos variantes deteriorados de AZEVEDO e ROPER (1970) e AZEVEDO (1971). Enfim, os eventos envolvendo os elementos de McClintock são de muitas formas semelhante à instabilidade mitótica de *A. nidulans*, com a vantagem de que os setores, que são amostras dessa instabilidade, podem ser isolados e analisados geneticamente, o que não acontecia com os pigmentos dos grãos de milho. De um modo geral, em todos os organismos estudados que apresentam esses elementos transponíveis, aberrações cromossômicas são de ocorrência frequente, principalmente em leveduras e *Drosophila*.

Outro fato que sugere que a instabilidade de *A. nidulans* deve ser provocada por elementos transponíveis foi o isolamento e caracterização do primeiro elemento transponível de *N. crassa* (KINSEY e HELBER, 1989), numa linhagem que apresenta características semelhantes às das linhagens A e B de outras com duplicações estudadas em *A. nidulans*. Em *Neurospora*, os rearranjos eram detectados como esterilidade e escape das "Dark agars" na linhagem Dp(IL;IR)H4250 e em *Aspergillus* como setores nas colônias de linhagens com duplicações.

É, portanto, curioso observar que em *A. nidulans*, estudos moleculares a esse respeito não têm despertado interesse dos pesquisadores. Um fungo que apresenta uma genética básica fundamentada, iniciada na década de 50 com ROPER (1952), PONTECORVO et alii (1953, 1954), PONTECORVO e KAUFER (1958) com ciclos sexual e parassexual definidos, que apresentam uma das mais didáticas análises genéticas de segregantes, pela presença de marcadores para cor em algumas de suas linhagens e que é utilizado como modelo em uma série de técnicas avançadas, tais como a obtenção, regeneração e fusão de protoplastos,

além de trabalhos com clonagem e transformação genética. Também foram utilizados como modelo para melhoramento de microrganismos, via mutação, recombinação clássica e fusão de protoplastos como citado por BALL (1984). Recentemente, BRODY e CARBON (1989), obtiveram seis bandas em gel através de técnicas eletroforéticas conseguindo, deste modo, separar os cromossomos de *A. nidulans*, sendo que duas bandas continham dois cromossomos cada uma. AZEVEDO et alii (1983), através das curvas de sobrevivência aos mutagênicos etil-metano-sulfonato e ácido nitroso, tentaram determinar o tamanho dos cromossomos desse fungo e encontraram resultados próximos para seis dos oito grupos de ligação.

Essas, entre tantas linhas de pesquisa, conduzidas pelos pesquisadores das mais diversas áreas, não explicam a defasagem em relação a outros organismos na detecção de elementos transponíveis através de técnicas moleculares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens

a) Linhagem MSE ("Master Strain E") contendo marcadores genéticos em todos os oito grupos de ligação (McCULLY & FORBES, 1965) (Figura 1).

GRUPOS DE LIGAÇÃO	MARCADORES GENÉTICOS
I	<u>sua</u> ₁ <u>adE</u> ₂₀ . <u>va</u> ₂ <u>adE</u> ₂₀
II	<u>wa</u> ₃ .
III	<u>galA</u> ₁ .
IV	<u>pyroA</u> ₄ .
V	<u>facA</u> ₃₀₃ .
VI	<u>sb</u> ₃ .
VII	<u>nicB</u> ₈ .
VIII	<u>riboB</u> ₂ .
. Centrômero	

Figura 1. Marcadores genéticos da linhagem MSE de *Aspergillus nidulans*.

b) Linhagem A, que apresenta uma duplicação cromossômica do grupo de ligação I, translocada para o grupo de ligação II (NGA & ROPER, 1968) (Figura 2).

GRUPOS DE LIGAÇÃO	MARCADORES GENÉTICOS					
I		<u>proA</u> ₁	<u>pabaA</u> _o	<u>ya</u> ₂	+	+
II	<u>wa</u> ₃			+	<u>adE</u> _{2o}	<u>biA</u> ₁

• Centrômero

Figura 2. Marcadores genéticos da linhagem A de *Aspergillus nidulans*.

c) Linhagem proA₁, pabaA_o, ya₂

MARCADOR	FENÓTIPO
<u>adE</u> ₂₀	requisito para adenina
<u>bia</u> ₁	requisito para biotina
<u>facA</u> ₃₀₃	incapaz de crescer em meio contendo acetato como única fonte de carbono
<u>galA</u> ₁	incapaz de crescer em meio contendo galactose como única fonte de carbono
<u>nicB</u> ₉	requisito para ácido nicotínico
<u>pabaA</u> ₆	requisito para ácido <i>p</i> -aminobenzóico
<u>proA</u> ₁	requisito para prolina
<u>pyroA</u> ₄	requisito para piridoxina
<u>riboB</u> ₂	requisito para riboflavina
<u>sB</u> ₃	requisito para tiosulfato
<u>suA</u> ₁ <u>adE</u> ₂₀	supressor do mutante <u>adE</u> ₂₀
<u>YA</u> ₂	conídios amarelos
<u>WA</u> ₃	conídios brancos

Figura 3. Marcadores genéticos e fenótipos dos mutantes utilizados.

Estas linhagens são originárias do Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Seção de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra.

3.2. Meios de cultura e soluções

3.2.1. Meio mínimo (PONTECORVO *et alii*, 1953)

NaNO ₃	6,00g
KH ₂ PO ₄	1,50g
KCl	0,50g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50g
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Glicose	10,00g
Agar	15,00g
Água destilada	1000,00ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N.

3.2.2. Meio completo modificado (AZEVEDO & COSTA, 1973)

Meio mínimo acrescido de:

Peptona	2,00g
Caseína hidrolisada	1,50g
Extrato de leveduras	0,50g
Solução de vitaminas	1,00ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N.

3.2.3. Meio mínimo-galactose (ROBERTS, 1959)

No meio mínimo (item 3.2.1), a glicose foi substituída por igual quantidade de galactose.

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

Acetato de amônio	12,00g
KH_2PO_4	3,00g
NaCl	2,00g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50g
FeSO_2	traços
ZnSO_4	traços
Ágar	12,00g
Água destilada	1000,00ml

O pH foi ajustado para 6,1 com NaOH 1N.

3.2.5. Meio completo líquido

Preparado segundo o item 3.2.2, sem a adição de ágar.

3.2.6. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo

Preparado segundo o item 3.2.2, sem o ágar, acrescido de 2% de meio completo líquido.

3.2.7. Meio completo duas vezes concentrado

Preparado segundo o item 3.2.2, tendo o volume de água destilada reduzido à metade.

3.2.8. Solução de vitaminas

Acido nicotínico	100,00mg
Ácido p-aminobenzóico	10,00mg
Biotina	0,20mg
Piridoxina	50,00mg
Riboflavina	100,00mg
Tiamina	50,00mg
Água destilada esterilizada	100,00ml

A solução foi mantida em banho-maria por 15 minutos para esterilização e estocada em refrigerador em frasco escuro.

3.2.9. Solução "Tween" 80

Tween 80	0,10ml
Água destilada	100,00ml

A solução foi distribuída em tubos de ensaio contendo 2,5ml cada um, autoclavada e estocada em refrigerador.

3.2.10. Solução salina

NaCl	8,50g
Água destilada	1000,00ml

A solução foi distribuída em frascos contendo 9,0ml cada um, autoclavada e estocada em refrigerador.

3.2.11. Solução de benlate (metil-butil-carbamoil-2-benzimidazole carbamato) (HASTIE, 1970)

Benlate (50% benomil)	20,00mg
Água destilada esterilizada	10,00ml

O benlate foi dissolvido em uma gota de acetona. Após a mistura, a solução foi mantida por 15 minutos em banho-maria para esterilização.

3.2.12. Suplementos adicionados ao meio mínimo

As soluções estoque de suplementos para meio mínimo foram feitas adicionando-se cada um deles em água destilada esterilizada. A seguir, foram colocadas em banho-maria por 15 minutos para esterilização e conservadas em refrigerador.

Solução estoque	mg/100ml H ₂ O	Concentração final no meio de cultura
Adenina	500,00mg	25,00µg/ml
Ácido nicotínico	10,00mg	0,50µg/ml
Ácido p-aminobenzóico	5,00mg	0,25µg/ml
Biotina	4,00mg	0,20µg/ml
Metionina	1,00g	50,00µg/ml
Piridoxina	5,00mg	0,25µg/ml
Prolina	1,00g	50,00µg/ml
Riboflavina	10,00mg	0,50µg/ml
Tiossulfato de sódio	2,00g	100,00µg/ml

3.2.13. Tampão fosfato pH 5,8 (0,2M)**Solução A:**

NaH_2PO_4	24,00g
Água destilada	1000,00ml

Solução B:

Na_2HPO_4	35,60g
Água destilada	1000,00ml

Foram misturados 920ml da solução A com 80ml da solução B. A solução foi autoclavada para esterilização.

3.2.14. Tampão fosfato 0,02M

A solução de tampão fosfato 0,2M (pH 5,8) foi diluída dez vezes com água destilada.

3.2.15. Solução de Giemsa

Diluiu-se uma parte de Giemsa em 66 partes de glicerina a 60°C. Após o resfriamento, foram acrescentados 66 partes de metanol e a solução foi conservada à temperatura ambiente.

3.2.16. Solução de HCl 1N

HCl concentrado	82,50ml
Água destilada	1000,00ml

A solução foi conservada em frasco escuro.

3.2.17. Solução de KCl 1,2M

Foram dissolvidos 89,40g de KCl em 350ml de solução A (item 3.2.13). A solução foi aquecida até o KCl ser totalmente dissolvido. Adicionou-se, então, a solução B (item 3.2.13) até atingir pH 5,8. Completou-se o volume para 1000ml com tampão fosfato 0,2M (pH 5,8). A solução foi autoclavada e conservada em refrigerador.

3.2.18. Solução de KCl 0,6M

A solução de KCl 1,2M (item 3.2.17) foi diluída com tampão fosfato 0,2M esterilizado (item 3.2.13) na proporção de um volume de KCl 1,2M para um volume de tampão fosfato 0,2M (pH 5,8). A solução foi conservada em refrigerador.

3.2.19. Solução de enzimas

"Celulase CP" (JOHN & STURGES, SELBY YORSHIRE, UK)	2,5mg
"Novozyn 234" (NOVO INDÚSTRIA DENMARK)	2,5mg
KCl 0,6M em tampão fosfato pH 5,8	1,0ml

A mistura lítica foi preparada no momento do uso.

3.2.20. Solução de Polietilenoglicol (PEG) 30%

Solução A:

CaCl ₂ (0,1M)	0,11g
Água destilada	10,00ml

Solução B:

Glicina (0,5M)	0,375g
Água destilada	10,000ml

Foram colocados 10ml de solução A em 10ml de solução B e o pH corrigido para 8,0 com NaOH 4%. Adicionou-se, então, PEG 6000 na concentração final de 30%. A solução final foi autoclavada e conservada em refrigerador.

3.2.21. Solução estoque de Acrilamida (30% acrilamida, 0,8% N,N'-metileno-bis-acrilamida)

Acrilamida	75,00g
Bis-acrilamida	2,00g
Água destilada	250,00ml

A solução foi filtrada e estocada em refrigerador.

3.2.22. Tampão do gel separador (pH 8,9)

45,75g de tris-base foram dissolvidas em 60ml de água destilada. Ajustou-se o pH para 8,9 com HCl 1N. O volume foi completado para 100ml com água destilada. A solução foi filtrada e armazenada à temperatura ambiente.

3.2.23. Tampão do gel empilhador (pH 6,8)

Foram dissolvidas 4,475g de tris-base em 60ml de água destilada. Acertou-se o pH para 6,8 com HCl 1N. O volume foi completado para 100ml com água destilada. A solução foi mantida à temperatura ambiente.

3.2.24. Tampão do tanque ou eletrólito (pH 8,9)

Tris-base	63,20g
Glicina	39,90g

O volume foi completado com água destilada para 1000ml, filtrado e armazenado em refrigerador. No momento do uso, foi diluído: 100ml de tampão para 900ml de água destilada.

3.2.25. Tampão da amostra

Glicerol	5,00ml
Tampão do gel empilhador	2,50ml
Azul bromofenol	2,50ml
Água destilada	25,00ml

A solução foi armazenada a -20°C .

3.2.26. Fixador "álcool gel wash"

Acido acético	400,00ml
Glicerol	200,00ml
Agua destilada	800,00ml
Etanol	1000,00ml

Os itens foram misturados somente no momento do uso.

3.2.27. Preparação do gel

3.2.27.1. Gel separador a 10%

Tampão do gel separador (item 3.2.22)	1,500ml
Acrilamida (item 3.2.21)	5,000ml
Agua destilada	8,400ml
Persulfato de amônia a 10%	0,1125ml
TEMED	0,0050ml

Os itens foram misturados sob agitação e após adicionado o TEMED, a solução foi imediatamente vertida na placa, pois a polimerização é rápida.

3.2.27.2. Gel empilhador a 4%

Tampão do gel empilhador (item 3.2.25)	0,7500ml
Acrilamida (item 3.2.21)	1,0000ml
Agua destilada	5,7000ml
Persulfato de amônio a 10%	0,0560ml
TEMED	0,0075ml

A solução foi preparada sob agitação e, após a adição do TEMED, foi imediatamente vertida na placa.

3.2.28. Coloração do gel

3.2.28.1. Esterase (EST) (SHAW & PRASAD, 1970)

Substratos:

α -naftil acetato 1% em solução aquosa de acetona 50%

β -naftil acetato 1% em solução aquosa de acetona 50%

As soluções foram mantidas em refrigerador.

Corantes:

"Fast Blue RR"	50,00mg
Tris-HCl 0,5M pH=7,1	5,00ml
α -naftil acetato	0,75ml
β -naftil acetato	0,75ml
Água destilada	43,50ml

O corante foi preparado na hora do uso.

3.3. Placas de Análise Genética

Para análise genética das colônias, utilizou-se placas de Petri com meio completo, meio mínimo, meio mínimo suplementado de todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento e meio mínimo mais todos os requisitos, exceto aquele sob análise. Utilizou-se, também, placas com meio mínimo de galactose e acetato de amônio, sendo que em ambos os casos suplementou-se com todos os requisitos nutricionais

envolvidos no cruzamento.

3.4. Placas de Regeneração de Protoplastos

No caso de obtenção de protoplastos foi utilizado o meio completo duas vezes concentrado adicionado de solução estabilizadora (KCl 1,2M em tampão fosfato pH 5,8), na proporção 1:1.

Para regeneração dos protoplastos provenientes de fusão, ao meio mínimo duas vezes concentrado foi adicionado solução estabilizadora (KCl 1,2M em tampão fosfato pH 5,8), na proporção 1:1.

3.5. Uso de palitos para transferência de colônias

Foram utilizados palitos roliços esterilizados para transferir conídios no caso de inoculação por ponto.

3.6. Esterilização e inoculação

Os meios de cultura e as soluções utilizadas foram esterilizados em autoclave a 120°C por vinte minutos.

A temperatura de incubação foi de 37°C.

3.7. Isolamento de setores deteriorados originados da linhagem A

A linhagem "A" foi inoculada no centro de uma placa de Petri contendo meio completo. Após oito dias de incubação a 37°C, foi feita a contagem dos setores melhorados, deteriorados e heterocarióticos originados a partir da linhagem "A".

Os setores deteriorados foram isolados em placa de Petri contendo meio completo, inoculados a 37°C por oito dias.

3.8. Técnicas de Análise Genética

3.8.1. Obtenção dos heterocários

Conídios das duas linhagens, MSE e um dos deteriorados obtidos, que apresentavam complementação para marcas auxotróficas, foram transferidos para tubos de ensaio contendo 3,0ml de meio mínimo líquido mais 2% de meio completo líquido.

Após três dias de incubação a 37°C, as películas heterocarióticas formadas foram transferidas para meio mínimo sólido e incubadas a 37°C por oito dias.

3.8.2. Isolamento de diplóides (ROPER, 1952)

Conídios retirados do heterocário obtido segundo o item anterior foram suspensos em solução tween

80, afim de obter cerca de 10^7 conídios por mililitro.

Esta suspensão foi semeada em placas de Petri contendo meio mínimo, as quais foram incubadas a 37°C por três dias.

Os conídios coletados e semeados em meio mínimo permitiram somente germinação de diplóides procedentes de fusão de núcleos haplóides complementares.

Os critérios utilizados para o reconhecimento dos diplóides foram: a) capacidade de crescer em meio mínimo; b) cor da colônia; c) tamanho do conídio. O diâmetro dos conídios foi obtido através de ocular micrométrica em microscópio óptico, observando-se a suspensão de conídios em solução tween 80 em lâmina e lamínula.

3.8.3. Análise mitótica

A análise mitótica foi feita através do ciclo parassexual. Os conídios diplóides foram inoculados (quatro inóculos por placa) em meio completo mais solução benlate na concentração final de $0,5\mu\text{g/ml}$ (produto ativo) e incubados a 37°C por oito dias.

Esta substância inibe o crescimento do diplóide e, assim seleciona os setores haplóides, os quais foram isolados em uma placa mestra (26 pontos) contendo meio completo.

Após três dias de incubação a 37°C , a placa mestra foi transferida com auxílio de um replicador multifio (AZEVEDO et alii, 1976) para placas de análise genética (item 3.3). As leituras foram feitas com 12, 24 e 48 horas de incubação a 37°C .

3.8.4. Análise meiótica

A análise meiótica foi feita de acordo com a metodologia descrita por PONTECORVO *et alii* (1953), utilizando a ocorrência do ciclo sexual.

O heterocário preparado segundo o item 3.8.1., foi transferido para meio mínimo em placa de Petri vedada com fita adesiva, que favorece a formação de cleistotécios após oito dias de incubação a 37°C.

A seguir, os setores heterocarióticos formados foram observados em microscópio estereoscópico para verificar a presença dos corpos de frutificação. Selecionou-se, então, três dos maiores cleistotécios de cada cruzamento, que foram colocados em meio mínimo para retirada das células aderentes.

Cada cleistotécio foi transferido para a parede de um tubo de ensaio contendo tween 80 e esmagados com o auxílio de uma pipeta. Com a mesma pipeta utilizada para o esmagamento, as paredes do tubo foram lavadas suspendendo, deste modo, os ascósporos na solução tween.

De cada suspensão, após uma diluição em solução salina, foi semeado 0,1ml em placa com meio completo. Após dois dias de incubação a 37°C, selecionou-se os cleistotécios híbridos, um de cada cruzamento, e ainda estimou-se qual seria a melhor diluição para a obtenção de uma média de 50 colônias por placa. Novamente, então, foi semeado e incubado a 37°C por três dias.

As colônias isoladas de cada cruzamento foram transferidas para quatro placas mestra (26 pontos), com auxílio de palitos roliços esterilizados, na seguinte disposição: duas placas de colônias normais, uma placa de colônias brancas, uma placa com 13 verdes e 13 amarelas e duas placas de colônias deterioradas. Estas foram incubadas por três dias a 37°C.

A partir da placa mestra e com auxílio de um replicador multifio, as colônias segregantes foram replicadas para os diferentes meios de análise (item 3.3). As leituras foram feitas após 24, 48 e 72 horas de incubação a 37°C.

Através dos dados obtidos com a análise meiótica pode-se determinar se ocorre ligação entre dois loci, utilizando-se a fórmula:

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

onde: C = frequência de recombinação;

R = número de colônias recombinantes;

T = número total de colônias analisadas.

Para o cálculo do desvio padrão, utilizou-se a fórmula:

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

onde: s = desvio padrão;

p = frequência de colônias recombinantes;

N = número total de colônias analisadas.

O teste do X^2 foi aplicado para verificar se os desvios na proporção de 1:1 para colônias normais e deterioradas ocorreram ao acaso.

3.8.4.1. Segregação em meio completo mais estabilizador osmótico

Após obtenção dos cleistotécios híbridos como descrito no item anterior, a suspensão foi semeada em meio completo mais agente estabilizador KCl 1,2M em tampão fosfato 0,2M pH 5,8 na proporção de 1:1. Incubação a 37°C

por três dias.

Todas as colônias obtidas foram transferidas para quatro placas mestras por cruzamento, contendo meio completo, que foram incubadas por três dias a 37°C.

O meio com estabilizador torna a colônia deteriorada uma fenocópia da normal, e quando transferida para meio completo adquire seu fenótipo característico. Foi feita, então, a contagem de colônias normais e deterioradas, para verificar a proporção de 1:1. O teste χ^2 foi aplicado para comprovar se os desvios desta proporção ocorreram ao acaso.

3.9. Testes de alelismo

Os variantes deteriorados obtidos que apresentavam seu determinante genético de deterioração localizados no mesmo grupo de ligação foram submetidos à análise genética através do ciclo sexual para verificar se tais determinantes são alelos.

Foi também utilizado o variante deteriorado V9 (AZEVEDO e ROPER, 1970), cujo determinante está localizado no grupo de ligação III.

Selecionou-se segregantes deteriorados de forma que cruzamentos fossem feitos entre variantes de auxotrofias complementares, para a obtenção do heterocário (item 3.8.1).

Segundo o item 3.8.4, as colônias foram obtidas e analisadas. Apenas colônias deterioradas seriam encontradas se os determinantes fossem alelos. Caso contrário, observou-se a proporção entre colônias normais e deterioradas e pode-se inferir se estavam ligadas ou não.

3.10. Obtenção e regeneração de protoplastos (HAMLYN et alii, 1982)

Conídios das linhagens A e MSE e dos variantes deteriorados crescidos em meio completo a 37°C por sete a oito dias, foram suspensos em solução tween 80, de forma bem concentrada (10^7 conídios/ml), e inoculados em frascos erlenmeyer contendo 50ml de meio completo líquido.

Após 21 horas de incubação em agitador (180 rpm) a 28°C, o micélio formado para cada linhagem ou variante foi filtrado em filtro Büchner com auxílio de bomba de vácuo e lavado com KCl 0,6M (tampão fosfato 0,2M) por duas vezes.

A seguir, o micélio foi pesado e, para cada 50 mg, foi utilizado 1ml de KCl 0,6M (tampão fosfato 0,2M pH 5,8), contendo 5mg de enzima lítica (2,5mg de novozyn 234 e 2,5mg de celulase CP Sturges) (item 3.2.19) (HAMLYN et alii, 1982).

Incubou-se novamente em agitador (120 rpm, 28°C) por três horas para que ocorresse a digestão lítica. Logo após, foram observados ao microscópio, em lâminas, a presença dos protoplastos.

O conteúdo dos frascos foi transferido para tubos de centrifuga e centrifugados por 30 segundos a 500 rpm ficando, então, o micélio ao fundo e os protoplastos no sobrenadante. Este foi coletado e novamente centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Os protoplastos foram ao fundo. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado em KCl 0,6M em tampão fosfato 0,2M (pH 5,8) e centrifugado (3000 rpm, 15 minutos) por duas vezes, para remoção da enzima lítica.

Os protoplastos obtidos foram ressuspensionados em KCl 0,6M e contados em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico.

Diluições adequadas foram feitas e semeadas ("poor plate") em meio completo mais solução estabilizadora (item 3.4). A incubação foi feita a 37°C por três dias.

Em meio completo, só cresceram células que não são protoplastos e que resistiram à lise; em meio completo mais a solução estabilizadora cresceram tanto estas células quanto os protoplastos. A diferença mostrou o número real de protoplastos, com a porcentagem de regeneração para as linhagens e variantes utilizados.

3.11. Fusão de protoplastos (PEBERDY, 1979)

3.11.1. Obtenção dos produtos de fusão

A partir da suspensão de protoplastos, obtidos segundo o item anterior, tanto para as linhagens A e MSE como para os variantes deteriorados, procedeu-se à fusão.

Quantidades iguais de protoplastos para cada cruzamento (nunca menos de 10^6 protoplastos/ml) foram colocados em um tubo de centrifuga e centrifugado a 3000rpm por dez minutos.

O precipitado assim obtido foi ressuspendido em 1ml de solução do agente fusogênico polietilenoglicol (item 3.2.20.) pré-aquecido (30°C) por 10 minutos em banho maria a 30°C.

A seguir, foram adicionados 5ml de solução estabilizadora (KCl 0,6M, tampão fosfato 0,2M pH 5,8) e centrifugado (3000rpm por dez minutos). Este procedimento foi repetido por duas vezes para a retirada do PEG que é tóxico aos protoplastos. O precipitado então foi ressuspendida em 5ml de solução estabilizadora contendo os

protoplastos individuais e alguns fundidos.

A suspensão foi semeada em meio mínimo mais o agente estabilizador (item 3.4.), sem diluição e com uma diluição em solução estabilizadora, e em meio completo mais estabilizador (item 3.4.) após diluições apropriadas em solução estabilizadora.

Após três a quatro dias de incubação a 37°C, os heterocários foram obtidos, e a frequência de fusão de protoplastos foi determinada como sendo:

$$\frac{\text{colônias desenvolvidas em MMKCl}}{\text{colônias desenvolvidas em MCKCl}}$$

3.11.2. Isolamento de diplóides

A partir dos produtos de fusão heterocarióticos de cada cruzamento, segundo o item anterior, suspensões de conídios foram feitas em solução tween 80. Após algumas diluições em solução salina, de forma que a suspensão fique pouco concentrada, semeaduras em meio mínimo foram feitas para a obtenção dos diplóides depois de 4 dias de inoculação a 37 °C.

Os critérios para a verificação da diploidia foram os mesmos utilizados no item 3.8.2.

3.11.3. Análise mitótica

Foram isolados três diplóides de cada cruzamento e procedeu-se à análise mitótica como descrito no item 3.8.3.

3.11.4. Isolamento de haplóides a partir do heterocário

Dos heterocários obtidos por fusão de protoplastos, para cada cruzamento, conídios foram retirados e suspensos em solução tween 80. Após a contagem dos conídios na câmara de Neubauer com microscópio óptico, diluições em solução salina foram feitas para a obtenção de uma média de 50 a 70 colônias por placa. A semeadura foi feita em meio mínimo mais os requerimentos da linhagem MSE (tiosulfato de sódio, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico) mais adenina e biotina no sentido de obter um variante deteriorado com as auxotrofias da linhagem MSE.

3.12. Efeito do benlate sobre os diplóides

Foi feito um ensaio para comparar o efeito do benlate na haploidização dos diplóides obtidos pela metodologia clássica e por fusão de protoplastos.

Três diplóides isolados de cada método foram inoculados em placa de Petri contendo meio completo mais solução benlate (item 3.2.1) na concentração final de $0,5\mu\text{g/ml}$ da seguinte maneira: quatro pontos por placa em cinco placas para cada diplóide, num total de 30 placas com 120 colônias, sendo 60 de cada tipo de diplóide.

Os cuidados necessários quanto aos princípios básicos da experimentação foram tomados, como casualização das placas em relação ao meio de cultura, inóculo e distribuição na estufa. As 60 colônias funcionaram como repetições de cada tipo de diplóide.

Após oito dias de incubação a 37°C , foi feita a contagem dos setores.

3.13. Técnica de coloração de núcleos de protoplastos (BORGES, 1987)

Para a coloração, foi utilizado o precipitado obtido após trinta segundos de centrifugação do sistema lítico (item 3.10).

O material foi gotejado em lâminas, que por quinze minutos ficaram à temperatura ambiente. Logo após, foi feita a fixação em metanol absoluto por cinco minutos. Sem deixar secar, as lâminas foram colocadas para hidrólise em HCl 1N a 56°C por dois minutos. Procedeu-se à lavagem em água corrente e água destilada.

Para a coloração, sobre as lâminas colocou-se uma película de tampão fosfato (0,02M pH 5,8) onde foram gotejados o corante Giemsa. Após dois minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas à temperatura ambiente e montadas com laminulas para a observação em microscópio óptico. Foram contados 200 protoplastos por linhagem ou variante.

3.14. Técnicas Eletroforéticas (PACCOLA-MEIRELLES et alii, 1988)

3.14.1. Preparo das amostras

O material a ser ensaiado foi inoculado em erlenmeyer contendo 50ml de meio completo e incubados por oito dias a 37°C. A película de micélio formada na superfície do meio foi lavada com água destilada em filtro de Büchner e seco em papel de filtro.

O micélio foi pesado e, para cada 300mg,

adicionou-se 1ml do tampão do gel empilhador (item 3.2.23). Sempre em gelo, o micélio foi triturado em homogeneizador elétrico. O extrato obtido foi conservado em refrigerador, em banho de gelo, durante doze horas, para completar a extração.

Posteriormente, em centrífuga refrigerada, o extrato foi centrifugado a 14000rpm por 15 minutos, deixando assim, no sobrenadante o extrato protéico.

3.14.2. Montagem das placas de eletroforese vertical

A solução do gel separador (item 3.2.27.1) foi vertida, com auxílio de uma seringa, entre as placas de vidro previamente vedadas com ágar-água 4%. A quantidade de solução do gel separador foi calculada para atingir 4,5cm da extremidade superior do gel. O restante foi preenchido com água destilada, para que ocorra a polimerização uniforme da borda superior do gel, pois a acrilamida não polimeriza em presença de oxigênio.

Uma vez polimerizado o gel, a água foi retirada e o restante da placa preenchido com solução do gel empilhador (item 3.2.27.2) onde foi introduzido o pente para formar as canaletas. Após a polimerização do gel, o pente foi retirado.

As placas de vidro foram montadas na cuba de corrida, onde foi colocado o tampão do eletrólito (item 3.2.24).

3.1.3. Aplicação das amostras e corrida da eletroforese

De cada amostra, uma parte do extrato protéico (0,5ml) foi misturado com uma parte do tampão da amostra (item 3.2.25) (0,5ml), sendo aplicados 100 μ l em cada canaleta do gel com auxílio de micropipetas. Foram aplicadas a mesma amostra em duas canaletas consecutivas do gel que funcionaram como repetições

A cuba foi levada ao refrigerador e ligada à fonte. Inicialmente, foi aplicada uma voltagem de 100V até a frente atingir o final do gel empilhador. Em seguida, a voltagem foi alterada para 200V até o final da corrida.

3.14.4. Revelação de esterases

Após a corrida, o gel foi colocado em uma cuba de plástico em presença de 100ml da solução para revelação (item 3.2.28.1) e deixado à temperatura ambiente até as bandas aparecerem. O gel foi lavado em água e fixado em fixador "álcool gel wash".

4.RESULTADOS

4.1. Obtenção espontânea dos deteriorados

Foram analisadas 198 colônias da linhagem A, onde o número e os tipos de setores obtidos e a frequência de setores por colônia estão nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Dos setores deteriorados, sete foram selecionados para os estudos, entre eles estão variantes deteriorados de primeira ordem, obtidos a partir de sucessivos repiques. Sua caracterização morfológica está na tabela 3. Tal descrição foi feita logo após o seu isolamento, pois com os repiques ao longo do trabalho, em alguns casos, alteram a morfologia das colônias.

A figura 1 mostra alguns dos setores isolados em placas de Petri com meio completo. Os variantes deteriorados apresentaram crescimento mais lento que a linhagem MSE e semelhante, de maneira geral, ao crescimento da linhagem A. Pode-se ver a grande variedade de tipos de setores obtidos.

Um dos variantes obtidos, de coloração verde foi submetido a meio seletivo onde foi identificado que o mesmo era auxotrófico para biotina e adenina, sugerindo uma deleção do segmento duplicado no grupo de ligação I.

Tabela 1. Frequência total de setores por colônia da linhagem A.

Setores	No. observado	Frequência (%)	No. médio por colônia
amarelos	154	60,63	0,78
verdes	70	27,53	0,35
deteriorados	17	6,69	0,08
heterocarióticos	11	4,33	0,05
Total	254	100,00	1,26

Tabela 2. Frequência total de setores por colônia da linhagem A.

No. total de setores por colônia	No. de placas	Frequência (%)
0	55	27,78
1	68	34,34
2	44	22,22
3	25	12,63
4	3	1,51
5	3	1,51
Total	198	100,00

Tabela 3. Descrição morfológica dos setores deteriorados obtidos.

Variantes	Morfologia
V93	poucos esporos granulados, creme esverdeado, micélio marrom claro
V94	poucos esporos, rosa, micélio rosado
V94.1	poucos esporos, ocre, micélio claro
V95	poucos esporos, esverdeado e rosado nas bordas, micélio escuro
V95.1	pouquíssimos esporos, amarelado, micélio rosado
V96	poucos esporos granulados, marrom, colônia enrugada, micélio escuro.
V96.1	poucos esporos, rosa, micélio escuro

Figura 4. Variantes deteriorados isolados em meio completo a 37°C por oito dias de incubação. Os variantes analisados estão marcados com os respectivos números. Os variantes a e b são, respectivamente, um aneuplóide e um deteriorado com uma deleção no grupo de ligação I.

4.2. Técnicas de análise genética

4.2.1. Obtenção dos heterocários

Os variantes deteriorados selecionados foram submetidos a cruzamento com a linhagem testadora MSE, sendo fácil a formação de película heterocariótica em meio mínimo líquido mais 2% de meio completo após três dias de incubação a 37°C.

Procedeu-se, então, à transferência destas películas para meio mínimo sólido. Foram necessárias duas películas para cada variante, uma para o ciclo parassexual e outra em placa vedada para o ciclo sexual.

4.2.2. Isolamento de diplóides

Foram obtidos diplóides, em alguns casos diretamente da placa de meio mínimo onde a película heterocariótica foi colocada, em outros casos pela sementeira em meio mínimo, de esporos retirados do heterocário.

Quanto à coloração, os diplóides obtidos foram verdes e amarelos (tabela 4).

Os diplóides verdes obtidos pela indução do ciclo parassexual foram mais instáveis e geralmente apresentaram setores amarelos diplóides, muitos haploidizavam espontaneamente.

A confirmação da diploidia foi dada pelos sucessivos repiques em MM, ou seja, por sua capacidade de crescer neste meio (prototrofia) e pelo diâmetro dos conídios.

A tabela 4 mostra o diâmetro dos conídios haplóides das linhagens A e MSE e dos diplóides entre os variantes deteriorados e a linhagem MSE, com suas respectivas colorações.

A linhagem A portadora da duplicação cromossômica, apresentou conídios ligeiramente maiores que os da MSE, como era de se esperar. Sendo, respectivamente, 3,8 e 3,31 μ m.

O diâmetro dos diplóides variou de 4,3 até 4,75 μ m.

4.2.3. Haploidização

Uma solução de benlate foi utilizada para facilitar a haploidização. Esta foi adicionada ao meio completo na concentração final de 0,5 μ g/ml.

Tabela 4. Coloração e diâmetro dos conídios haplóides das linhagens MSE e A e dos diplóides entre os variantes deteriorados e a MSE. a/

Haplóides	Cor	Diâmetro
MSE	branco	3,31 μ m
A	verde	3,80 μ m
Diplóides		
V93//MSE	verde	4,70 μ m
V94//MSE	verde	4,75 μ m
V95//MSE	verde	4,60 μ m
V96//MSE	verde	4,45 μ m
V94.1//MSE	amarelo	4,54 μ m
V95.1//MSE	amarelo	4,54 μ m
V96.1//MSE	amarelo	4,65 μ m

a/ Diâmetro de um conídio; média obtida a partir da medição de 30 conídios.

Os diplóides verdes apresentavam setores amarelos prototróficos em grande quantidade, assim como setores normais brancos haplóides, em alguns o aparecimento de setores deteriorados em pequena quantidade pode ser incluído na análise. Os setores amarelos prototróficos foram excluídos para facilitar a análise, pois poderiam ser diplóides.

Os variantes deteriorados de primeira ordem formaram diplóides amarelos, sendo que o diplóide V94.1//MSE produziu, setores normais brancos e os V95.1//MSE e V96.1//MSE produziram, além destes, setores deteriorados que foram também analisados.

4.2.4. Análise mitótica

Os dados referentes à análise dos segregantes haplóides, obtidos nos diferentes cruzamentos estão nas tabelas 5, 6 e 7.

Os segregantes deteriorados foram colocados em meio completo mais estabilizador KCl tampão fosfato pH 5,8 (0,2M) para verificar a coloração dos esporos. No caso do V96, todos foram brancos e do V96.1, 19 brancos e um amarelo.

A localização dos determinantes genéticos de deterioração encontra-se na tabela 8.

Tabela 5. Análise mitótica dos segregantes do V93.

Grupo de Ligação	Marcadores	Variante deteriorado//MSE
		<u>V93</u> N
I	pro ⁺ paba ⁺	22
	pro paba	4
II	w ⁺	0
	w	26
III	gal ⁺	0
	gal	26
IV	pyro ⁺	23
	pyro	3
V	fac ⁺	22
	fac	4
VI	s ⁺	17
	s	9
VII	nic ⁺	16
	nic	10
VIII	ribo ⁺	18
	ribo	8
Total		26

N = segregantes normais

Tabela 6. Análise mitótica dos segregantes dos V94, V94.1 V95 e V95.1.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Variantes deteriorados //MSE							
		V94		V94.1		V95		V95.1	
		N	D	N		N	D	N	D
I	pro ⁺ paba ⁺	10	2	36		4	3	9	1
	pro paba	2	0	15		3	0	1	1
II	w ⁺	0	0	0		0	0	0	0
	w ⁻	12	2	51		7	3	10	2
III	gal ⁺	6	1	26		1	3	1	2
	gal	6	1	25		6	0	10	0
IV	pyro ⁺	1	2	0		4	1	1	0
	pyro	11	0	51		3	2	9	2
V	fac ⁺	6	2	22		3	0	8	2
	fac	6	0	29		4	3	2	0
VI	s ⁺	8	1	32		2	2	6	1
	s	4	1	19		5	1	4	1
VII	nic ⁺	7	2	29		1	2	6	1
	nic	5	0	22		6	1	4	1
VIII	ribo ⁺	7	2	28		4	2	7	1
	ribo	5	0	23		3	1	3	1
Total		12	2	51		7	3	10	2

N = segregantes normais

D = segregantes deteriorados

Tabela 7. Análise mitótica dos segregantes deteriorados (D) e normais (N) dos V96 e V96.1.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Variantes deteriorados//MSE			
		V96//MSE		V96.1//MSE	
		N	D	N	D
I	pro ⁺ paba ⁺	24	7	15	14
	pro paba	4	9	11	6
II	w ⁺	0	0	0	1
	w	28	16	26	19
III	gal ⁺	3	16	0	19
	gal	25	0	26	1
IV	pyro ⁺	15	4	20	10
	pyro	13	12	6	10
V	fac ⁺	12	8	13	11
	fac	16	8	13	9
VI	s ⁺	23	8	18	14
	s	5	8	8	6
VII	nic ⁺	14	8	12	10
	nic	4	8	14	10
VIII	ribo ⁺	17	10	19	11
	ribo	11	6	7	9
Total		28	16	26	20

Tabela 8. Localização dos determinantes genéticos de deterioração nos grupos de ligação.

Determinantes de deterioração	Grupo de ligação
V93	III
V94	IV
V95	III
V96	III
V94.1	IV
V95.1	III
V96.1	III

4.2.5. Análise meiótica

4.2.5.1. Segregação meiótica

Após a localização dos determinantes genéticos de deterioração nos grupos de ligação através do ciclo parassexual, utilizou-se da segregação meiótica para verificar a ocorrência de ligação com qualquer marcador genético.

Os dados da segregação meiótica encontram-se na tabela 9. A proporção esperada de segregantes normais e deteriorados era de 1:1. Foi aplicado o teste do χ^2 para detectar se os desvios encontrados ocorreram ao acaso. Caso esta proporção não fosse seguida, o χ^2 foi aplicado à proporção 2:1, uma vez que os segregantes deteriorados podem perder a competição com os normais quando semeados, alterando a proporção esperada de 1:1. Dentre os segregantes normais incluíram-se aqueles de coloração branca, amarela e verde.

Comparativamente, os esporos sexuais foram semeados em meio completo mais estabilizador osmótico KCl 0,6M em tampão fosfato 0,2M (pH 5,8). Os dados da segregação encontram-se na tabela 10.

Nas tabelas 11 a 17 encontram-se os dados referentes às análises dos variantes deteriorados e de primeira ordem. Foi considerado ligação entre os marcadores genéticos quando a frequência de recombinação entre eles foi menor que 40%.

Tabela 9. Segregantes obtidos através do ciclo sexual pelo cruzamento entre variantes deteriorados e de primeira ordem e a linhagem MSE (semeados em meio completo).

Cruzamento	Segregantes		Total	X ² a/	
	normais	deter.		1:1	2:1
V93xMSE	132	79	211	13,3128**	17,4171**
V94xMSE	283	276	559	0,0876 ^{ns}	—
V95xMSE	109	65	174	11,1264**	14,1685**
V96xMSE	121	77	198	9,7777**	20,3702**
V94.1xMSE	213	205	418	0,1531 ^{ns}	—
V95.1xMSE	131	80	211	12,3270**	18,7693**
V96.1xMSE	69	52	121	2,3884 ^{ns}	—

a/ Os desvios foram considerados significativos ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 10. Segregantes obtidos através do ciclo sexual pelo cruzamento entre variantes deteriorados e de primeira ordem e a linhagem MSE (semeado em meio completo mais estabilizador KCl (pH 5,8) em tampão fosfato 0,2 M).

Cruzamento	Segregantes		Total	χ^2		a/
	normais	deter.		1:1	2:1	
V93xMSE	87	17	104	47,1154**	13,4981**	
V94xMSE	31	35	66	0,2424 ^{ns}	—	
V95xMSE	77	21	98	32,0000**	6,6667**	
V96xMSE	54	49	103	0,2427 ^{ns}	—	
V94.1xMSE	51	58	109	0,4495 ^{ns}	—	
V95.1xMSE	56	37	93	3,8818 ^{ns}	—	
V96.1xMSE	58	46	104	1,3846 ^{ns}	—	

a/ Os desvios foram considerados significativos ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 11. Análise meiótica do cruzamento V93xMSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		normais	deter.		
III	gal ⁺	41	21	52,88	+ 4,9%
	gal	28	14		

Tabela 12. Análise meiótica do cruzamento V94xMSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		normais	deter.		
IV	pyro ⁺	24	37	37,50	± 4,78%
	pyro	28	15		

Tabela 13. Análise meiótica do cruzamento V94.1xMSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		normais	deter.		
IV	pyro ⁺	22	29	48,07	± 4,90%
	pyro	25	23		

Tabela 14. Análise meiótica do cruzamento V95xMSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		normais	deter.		
III	gal ⁺	10	26	34,61	± 4,70%
	gal	42	26		

Tabela 15. Análise meiótica do cruzamento
V95.1xMSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		normais	deter.		
III	gal ⁺	24	38	38,46	± 4,80%
	gal	30	16		

Tabela 16. Análise meiótica do cruzamento
V96xMSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		normais	deter.		
III	gal ⁺	25	21	48,00	± 4,90%
	gal	31	24		

Tabela 17. Análise meiótica do cruzamento
V96.1xMSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		normais	deter.		
III	gal ⁺	26	24	52,13	± 5,15%
	gal	21	23		

4.3. Testes de alelismo

Os variantes deteriorados utilizados nos testes de alelismo, dos diferentes grupos de ligação, estão listados na tabela 18. Entre eles estão os obtidos por este trabalho e o V9 obtido por AZEVEDO (1971).

Na tabela 19 estão os dados referentes aos resultados dos testes de alelismo.

Os variantes V93, V95, V95.1, V96 e V96.1 apresentaram determinante genético de deterioração no grupo de ligação III, estes foram cruzados entre si e alguns cruzados com o V9.

A proporção 2:1 foi utilizada para a análise do χ^2 dos segregantes do cruzamento V93 com V95.1. Este último apresenta-se bastante deteriorado, perdendo em meio completo, a competição com os segregantes normais, portanto dando origem a um menor número de segregantes deteriorados, provocando um desvio na proporção esperada de 3 deteriorados:1 normal para cruzamentos envolvendo variantes com determinantes não alelos. Nos demais cruzamentos, o χ^2 foi calculado para a proporção 3:1, considerando os valores significativos ao nível de 5% de probabilidade.

Cleistotécios inviáveis, claros e pouco consistentes, foram encontrados para todos os cruzamentos realizados entre os V96 e V96.1, o mesmo para os V94 e V94.1, cujos determinantes de deterioração estão localizados no grupo de ligação IV.

Tabela 18. Variantes e segregantes utilizados nos testes de alelismo, nos diferentes grupos de ligação.

Grupo de ligação	Variantes
III	<p> V93(segr.<u>pyroA</u>₄;<u>sB</u>₃) x V9 V93(segr.<u>pyroA</u>₄;<u>sB</u>₃) x V95 V93(segr.<u>pyroA</u>₄;<u>sB</u>₃) x V95.1 V93 x V96(segr.<u>pyroA</u>₄;<u>galA</u>₁) V93 x V96.1(segr.<u>pyroA</u>₄;<u>sB</u>₃) V95(segr.<u>sB</u>₃;<u>galA</u>₁;<u>facA</u>₃₀₃) x V9 V95(segr.<u>sB</u>₃;<u>galA</u>₁;<u>facA</u>₃₀₃) x V95.1 V95(segr.<u>sB</u>₃;<u>galA</u>₁;<u>facA</u>₃₀₃) x V96 V95(segr.<u>sB</u>₃;<u>galA</u>₁;<u>facA</u>₃₀₃) x V96.1 V95.1 x V96(segr.<u>pyroA</u>₄;<u>galA</u>₁) V95.1 x V96.1(segr.<u>pyroA</u>₄;<u>sB</u>₃) V96 x V96.1(segr.<u>pyroA</u>₄;<u>sB</u>₃) </p>
IV	<p> V94(segr.<u>pyroA</u>₄;<u>riboB</u>₂;<u>sB</u>₃) x V94.1 </p>

Tabela 19. Testes de alelismo.

Cruzamento	Segregantes		Total	Proporção	X ²
	deter. normais				
V93 x V9	120	47	167	3 : 1	0,8801 ^{ns}
V93 x V95	185	58	243	3 : 1	0,1659 ^{ns}
V93 x V95.1	116	59	175	2 : 1	0,0204 ^{ns}
V93 x V96	95	40	135	3 : 1	1,5432 ^{ns}
V93 x V96.1	91	36	127	3 : 1	0,7585 ^{ns}
V95 x V9	93	39	132	3 : 1	1,4545 ^{ns}
V95 x V95.1	78	0	78	—	—
V95 x V96	111	18	129	3 : 1	8,3945 ^{**}
V95 x V96.1	105	47	152	3 : 1	2,8420 ^{ns}
V95.1 x V96	89	22	111	3 : 1	1,5885 ^{ns}
V95.1 x V96.1 ^(b)	—	—	—	—	—
V96 x V96.1 ^(a)	—	—	—	—	—
V94 x V94.1 ^(a)	—	—	—	—	—

(a) todos os cleistotécios analisados foram inviáveis.

(b) todos os cleistotécios analisados foram autofecundados.

4.4. Obtenção e regeneração de protoplastos

A frequência de regeneração dos protoplastos obtidos no item 3.10, para a linhagem MSE e os variantes deteriorados estão reunidos na tabela 20.

A tabela 21 mostra a coloração dos conídios deteriorados em meio completo mais solução estabilizadora KCl tampão mais fosfato pH 5,8 (0,2M).

O variante V95.1 em meio com solução estabilizadora manteve seu fenótipo deteriorado. Para este

variante foi feita uma auxonografia em meio mínimo e meio mínimo mais estabilizador osmótico (item 3.2.18); ele manteve seu fenótipo, mas com o surgimento de setores verdes.

Tabela 20. Frequência de regeneração de protoplastos da linhagem MSE e variantes deteriorados.

Linhagem	Número de protoplastos x 10^{-6}	% Regeneração
MSE	6,85	23,87
A	13,10	25,31
Variantes		
V93	2,55	12,06
V94	4,90	23,16
V95	6,75	18,84
V96	15,20	17,40
V94.1	3,15	25,39
V95.1	25,00	25,80
V96.1	16,50	24,54

• média de dois experimentos

Tabela 21. Cor dos conídios das colônias deterioradas em meio completo + estabilizador KCl 0,6M (tampão fosfato 0,2M).

Deteriorado	Cor
V93	verde
V94	verde
V95	verde
V96	verde
V94.1	amarelo
V95.1	setoriza verde
V96.1	amarelo

4.5. Fusão de protoplastos

Os dados referentes à frequência de fusão de protoplastos entre a linhagem testadora MSE com cada um dos variantes deteriorados e com a linhagem A estão na tabela 22.

Tabela 22. Frequência de fusão citoplasmática entre a linhagem MSE e os variantes deteriorados, e a linhagem A.

Linhagens	Frequência de fusão
A	$2,49 \times 10^{-3}$
MSE	$2,01 \times 10^{-3}$
Variantes	
V93	$2,53 \times 10^{-3}$
V94	$1,20 \times 10^{-3}$
V95	$1,91 \times 10^{-3}$
V96	$1,27 \times 10^{-3}$
V94.1	$1,15 \times 10^{-3}$
V95.1	$1,07 \times 10^{-3}$
V96.1	$1,74 \times 10^{-3}$

• média de dois experimentos

Um pequeno ensaio foi feito para verificar a porcentagem de regeneração após incubação com PEG por dez minutos a 30°C. Neste caso, a porcentagem de regeneração foi considerada como sendo o número de colônias que regeneraram em meio completo mais estabilizador menos as que regeneraram em meio completo em relação ao número de protoplastos contados em câmara de Neubauer antes da adição do PEG, conseqüentemente estão incluídas colônias que podem ser produtos de fusão. Os resultados estão na tabela 23.

Tabela 23. Porcentagem de regeneração da linhagem MSE e dos variantes deteriorados V93, V94.1 e V96 após incubação com PEG.

Linhagem	% Regeneração
MSE	16,13
V93	2,11
V94.1	8,36
V96	8,47

4.5.1. Análise mitótica

Os diplóides obtidos por fusão de protoplastos foram também analisados quanto à segregação mitótica. Foram escolhidos três diplóides de cada fusão entre um variante deteriorado e a linhagem MSE.

A tabela 24 mostra a coloração e o diâmetro dos conídios dos diplóides obtidos por fusão de protoplastos.

Os diplóides assim obtidos sofreram haploidização em meio completo mais benlate na concentração final de $0,5\mu\text{g/ml}$.

De maneira geral, os diplóides apresentaram-se mais instáveis que os obtidos pelo ciclo parassexual. Setores deteriorados foram observados em todos, exceto para V93//MSE.

Nas tabelas 25 a 31, estão os resultados das análises mitóticas dos variantes deteriorados.

Tabela 24. Coloração e diâmetro dos conídios diplóides obtidos por fusão de protoplastos. a/

Diplóides	Cor	Diâmetro
V93//MSE	verde	4,65
		4,45
		4,50
V94//MSE	verde	4,69
		4,55
		4,71
V95//MSE	verde	4,55
		4,61
		4,62
V96//MSE	verde	4,46
		4,45
		4,40
V94.1//MSE	amarelo	4,45
		4,40
		4,44
V95.1//MSE	amarelo	4,44
		4,45
		4,32
V96.1//MSE	amarelo	4,50
		4,53
		4,54

a/ Diâmetro de um conídio; média obtida a partir da medição de 30 conídios.

Tabela 25. Análise mitótica dos segregantes normais de 3 diplóides V93//MSE obtidos por fusão de protoplastos.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	V93//MSE		
		<u>1</u> N	<u>2</u> N	<u>3</u> N
I	pro ⁺ paba ⁺	15	18	10
	pro paba	7	7	5
II	w ⁺	0	0	0
	w	22	25	15
III	gal ⁺	2	2	1
	gal	20	23	14
IV	pyro ⁺	11	9	8
	pyro	11	16	7
V	fac ⁺	9	12	8
	fac	13	13	7
VI	s ⁺	13	17	5
	s	9	8	10
VII	nic ⁺	12	12	9
	nic	10	13	6
VIII	ribo ⁺	9	10	7
	ribo	13	15	8
Total		22	25	15

N = segregantes normais

Tabela 26. Análise mitótica dos segregantes normais e deteriorados de 3 diplóides V94//MSE obtidos por fusão.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	V94//MSE					
		1		2		3	
		N	D	N	D	N	D
I	pro ⁺ paba ⁺	24	6	21	4	24	0
	pro paba	12	2	4	1	24	1
II	w ⁺	0	0	2	0	0	0
	w	36	8	23	5	39	1
III	gal ⁺	24	4	17	1	13	1
	gal	12	4	8	4	26	0
IV	pyro ⁺	0	7	0	5	0	1
	pyro	36	1	25	0	39	0
V	fac ⁺	25	6	14	3	16	1
	fac	11	2	11	2	23	0
VI	s ⁺	22	6	17	4	12	0
	s	14	2	8	1	27	1
VII	nic ⁺	20	4	14	4	24	1
	nic	16	4	11	1	15	0
VIII	ribo ⁺	20	7	14	1	20	0
	ribo	16	1	11	4	19	1
Total		36	8	25	5	39	1

N = segregantes normais

D = segregantes deteriorados

Tabela 27. Análise mitótica dos segregantes normais e deteriorados de 3 diplóides V94.1//MSE obtidos por fusão de protoplastos.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	V94.1//MSE					
		1		2		3	
		N	D	N	D	N	D
I	pro ⁺ paba ⁺	21	8	21	2	34	6
	pro paba	4	1	5	2	9	3
II	w ⁺	0	7	0	2	0	3
	w	25	2	26	2	43	6
III	gal ⁺	20	2	20	3	31	7
	gal	5	7	5	1	12	2
IV	pyro ⁺	0	8	0	4	2	9
	pyro	25	1	26	0	41	0
V	fac ⁺	16	1	14	1	25	4
	fac	9	8	12	3	18	5
VI	s ⁺	22	4	23	2	23	5
	s	3	5	3	2	20	4
VII	nic ⁺	16	4	18	2	21	5
	nic	9	5	8	2	22	4
VIII	ribo ⁺	16	4	19	1	28	8
	ribo	9	5	7	3	15	1
Total		25	9	26	4	43	9

N = segregantes normais

D = segregantes deteriorados

Tabela 28. Análise mitótica dos segregantes normais e deteriorados de 3 diplóides V95//MSE obtidos por fusão de protoplastos.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	V95//MSE					
		1		2		3	
		N	D	N	D	N	D
I	pro ⁺ paba ⁺	16	12	9	13	15	15
	pro paba	6	11	6	16	7	9
II	w ⁺	0	1	2	4	1	0
	w	22	22	13	25	21	24
III	gal ⁺	4	23	2	29	2	24
	gal	18	0	13	0	20	0
IV	pyro ⁺	14	11	8	16	15	18
	pyro	8	12	7	13	7	6
V	fac ⁺	9	14	7	15	12	15
	fac	13	9	8	14	10	9
VI	s ⁺	10	14	13	17	15	12
	s	12	9	2	12	7	12
VII	nic ⁺	10	15	9	14	8	15
	nic	12	8	6	15	14	9
VIII	ribo ⁺	13	18	8	16	10	13
	ribo	9	5	7	13	12	11
Total		22	23	15	29	22	24

N = segregantes normais

D = segregantes deteriorados

Tabela 29. Análise mitótica dos segregantes normais e deteriorados de 3 diplóides V95.1//MSE obtidos por fusão de protoplastos.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	V95.1//MSE					
		1		2		3	
		N	D	N	D	N	D
I	pro ⁺ paba ⁺	9	1	6	1	8	6
	pro paba	0	1	1	6	0	5
II	w ⁺	3	0	2	2	1	3
	w	6	2	5	5	7	8
III	gal ⁺	2	2	1	7	0	10
	gal	7	0	6	0	8	1
IV	pyro ⁺	3	2	4	5	2	3
	pyro	6	0	3	2	6	8
V	fac ⁺	5	2	6	6	8	4
	fac	4	0	1	1	0	7
VI	s ⁺	5	0	2	6	2	6
	s	4	2	5	1	6	5
VII	nic ⁺	5	1	1	5	1	4
	nic	4	1	6	2	7	7
VIII	ribo ⁺	6	1	2	5	1	6
	ribo	3	1	5	2	7	5
Total		9	2	7	7	8	11

N = segregantes normais

D = segregantes deteriorados

Tabela 30. Análise mitótica dos segregantes normais e deteriorados de 3 diplóides V96//MSE obtidos por fusão de protoplastos.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	V96//MSE					
		1		2		3	
		N	D	N	D	N	D
I	pro ⁺ paba ⁺	19	13	20	10	12	10
	pro paba	6	7	4	6	8	5
II	w ⁺	0	0	0	0	0	0
	w	25	20	24	16	20	15
III	gal ⁺	2	20	2	14	0	15
	gal	23	0	22	2	20	0
IV	pyro ⁺	15	18	21	9	13	7
	pyro	10	2	3	7	7	8
V	fac ⁺	18	19	19	10	15	10
	fac	7	1	5	6	5	5
VI	s ⁺	14	16	9	10	11	7
	s	11	4	15	6	9	8
VII	nic ⁺	8	12	20	11	9	9
	nic	17	8	4	5	11	6
VIII	ribo ⁺	13	8	19	9	15	8
	ribo	12	12	5	7	5	7
Total		25	20	24	16	20	15

N = segregantes normais

D = segregantes deteriorados

Tabela 31. Análise mitótica dos segregantes normais e deteriorados de 3 diplóides V96.1//MSE obtidos por fusão de protoplastos.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	V96.1//MSE					
		1		2		3	
		N	D	N	D	N	D
I	pro ⁺ paba ⁺	11	14	17	15	17	10
	pro paba	13	10	8	8	6	13
II	w ⁺	0	5	0	8	1	4
	w	24	13	25	15	22	19
III	gal ⁺	1	15	1	23	0	21
	gal	23	3	24	0	23	2
IV	pyro ⁺	18	11	7	16	11	14
	pyro	6	7	18	7	12	9
V	fac ⁺	10	9	13	16	9	14
	fac	14	9	12	7	14	9
VI	s ⁺	14	14	18	12	14	11
	s	10	4	7	11	9	12
VII	nic ⁺	9	13	14	11	14	16
	nic	15	5	11	12	9	7
VIII	ribo ⁺	11	14	13	11	9	11
	ribo	13	4	12	12	14	12
Total		24	18	25	23	23	23

N = segregantes normais

D = segregantes deteriorados

4.6. Efeito do benlate sobre os diplóides

Durante as análises dos deteriorados, aparentemente os diplóides obtidos pelas duas metodologias empregadas, isto é, ciclo parassexual (P) e fusão de

protoplastos (F), comportaram-se de maneira diferente. Os diplóides obtidos por fusão de protoplastos foram mais instáveis em presença da solução benlate. Um experimento foi feito para verificar tal instabilidade. As tabelas 32 e 33 mostram os resultados.

Atenção especial deve ser dada ao V96, que apresentou um número bem maior de colônias com setores, além de um número maior de setores em diplóides de fusão, sendo setores deteriorados em maior frequência.

Tabela 32. Número de colônias e setores e a média de setores/colônia obtidos da haploidização com solução benlate (0,5µg/ml) de diplóides P (ROPER, 1952) e F (PEBERDY, 1979), dos diferentes variantes.

Variantes	Colônias		Setores		$\bar{X}$	
	P	F	P	F	P	F
v93//MSE	51	53	106	122	2,07	2,30
v94//MSE	42	46	64	85	1,52	1,84
v95//MSE	53	52	115	114	2,16	2,19
v96//MSE	12	45	14	87	1,16	1,93
v94.1//MSE	20	41	41	88	2,05	2,14
v95.1//MSE	48	44	63	61	1,31	1,38
v96.1//MSE	17	22	18	33	1,05	1,50

Tabela 33. Número e frequência dos tipos de setores normais (N) e deteriorados (D) obtidos a partir dos diplóides P e F dos diferentes variantes após haploidização com solução benlate.

Variantes	P		F	
	Setores		Setores	
	N	D	N	D
v93//MSE	106(1,00)	—	122(1,00)	—
v94//MSE	64(1,00)	—	81(0,95)	4(0,04)
v95//MSE	112(0,97)	3(0,03)	107(0,93)	7(0,06)
v96//MSE	10(0,71)	4(0,29)	46(0,52)	41(0,47)
v94.1//MSE	38(0,92)	3(0,08)	74(0,84)	14(0,16)
v95.1//MSE	50(0,79)	13(0,21)	40(0,65)	21(0,35)
v96.1//MSE	8(0,44)	10(0,55)	12(0,36)	21(0,63)

4.7. Transferência do caráter deteriorado

Dos heterocários obtidos por fusão de protoplastos (item 3.11.1), foram coletados conídios e semeados em meio mínimo mais os requerimentos da linhagem MSE (item 3.11.4), para a recuperação dos haplóides, objetivando encontrar um haplóide deteriorado com as marcas da linhagem MSE.

Semeando em média 50 a 70 colônias por placa, encontrou-se aneuplóides, diplóides e haplóides deteriorados em baixa frequência, como mostra a tabela 34.

Tabela 34. Número e tipos de colônias analisadas de cada variante deteriorado, para a recuperação de colônias haplóides deterioradas com os marcadores genéticos da linhagem MSE.

Variante deter.	No. de colônias analisadas	diplóides	aneuplóides	haplóides
V93	977	1	—	—
V94	541	2	—	1
V95	1036	1	—	—
V96	1206	2	1	—
V94.1	1242	2	—	—
V95.1	1310	1	2	—
V96.1	1730	4	2	—
ppy	1151	3	—	—

Para o haplóide deteriorado isolado, foi feita a confirmação das marcas da linhagem MSE e medição dos conídios. O HV94 apresentou um diâmetro de 3,61 μ m.

A figura 5 mostra a linhagem MSE e os HV94 e V94.

Fiura 5. Linhagem MSE e colônias haplóides deterioradas, HV94, que apresenta os marcadores genéticos da linhagem MSE e o V94 isoladas em meio completo após cinco dias de incubação a 37°C.

4.8. Coloração de núcleos de protoplastos

Segundo o item 3.13, foi feita a coloração de núcleos de protoplastos. Na contagem, foram utilizados 200 protoplastos de cada variante deteriorado e das linhagens MSE, ppy e A. Os dados que encontram-se na tabela 35 correspondem à média de dois experimentos. Os protoplastos encontrados apresentavam de zero a quinze núcleos, sendo em maior frequência os de um e dois núcleos. A figura 6 mostra os protoplastos do variante V96.

Tabela 35. Número e frequência de núcleos dos protoplastos das linhagens MSE, ppy e A e dos variantes deteriorados, após três horas de incubação no sistema lítico.

Linhagens	No. e frequência de núcleos				
	0	1	2	3	4
MSE	15(0,07)	64(0,31)	70(0,34)	36(0,17)	10(0,04)
A	14(0,06)	80(0,37)	74(0,34)	20(0,09)	11(0,05)
ppy	21(0,09)	66(0,29)	59(0,26)	29(0,12)	15(0,06)
Variantes					
V92	10(0,04)	72(0,32)	77(0,34)	20(0,09)	23(0,10)
V93	15(0,07)	72(0,21)	70(0,34)	36(0,18)	20(0,10)
V94	17(0,08)	38(0,19)	65(0,33)	56(0,28)	9(0,04)
V95	8(0,04)	43(0,21)	60(0,30)	27(0,13)	28(0,14)
V96	29(0,14)	52(0,29)	66(0,33)	23(0,11)	13(0,06)
V94.1	11(0,05)	33(0,15)	48(0,28)	31(0,14)	25(0,12)
V95.1	20(0,10)	70(0,35)	79(0,39)	10(0,05)	12(0,06)
V96.1	14(0,07)	65(0,32)	65(0,32)	20(0,10)	14(0,07)

Figura 6. Protoplastos do V96 obtidos após três horas de incubação em solução de enzimas.

4.9. Eletroforese

A figura 7 mostra o padrão eletroforético de bandas, das linhagens MSE e A e dos variantes deteriorados, no sistema esterase.

Figura 7. Padrão eletroforético de bandas do sistema esterase das linhagens A e MSE e dos variantes deteriorados, que aparecem em duas repetições. O (*) representa o padrão de bandas do variante que apresenta deleção do segmento duplicado do grupo de ligação I.

5. DISCUSSÃO

5.1. Obtenção espontânea dos deteriorados

Colônias de linhagens com duplicação apresentam uma taxa de crescimento reduzida e uma morfologia característica, produzindo frequentemente setores de três tipos. Uma classe de variantes fenotipicamente melhorados, com taxa de crescimento e morfologia semelhantes ao selvagem. Uma segunda classe, observada mais raramente, com fenótipo deteriorado e uma terceira classe de setores heterocarióticos (NGA e ROPER, 1968, 1969 e BAINBRIDGE e ROPER, 1966).

De acordo com alguns autores (AZEVEDO, 1971; MENEZES, 1974; NIFFINEGGER-SOUZA, 1979; PIZZIRANI-KLEINER, 1981; OLIVEIRA, 1982; PACCOLA, 1982; FAVRAUD, 1984; QUEIROZ, 1988) a frequência de setores obtidos espontaneamente a partir de inoculação por ponto da linhagem A, crescidas a temperatura de 37°C, variou entre 0,89 e 2,89. Neste trabalho a frequência obtida foi 1,26, da mesma forma que trabalhos anteriores com uma alta incidência de setores amarelos em comparação com os verdes, indicando que a deleção no segmento translocado do grupo de ligação II é mais comum do que a deleção no segmento duplicado do grupo de ligação I, para setores melhorados.

Existe uma série de fatores que alteram a instabilidade, sendo que a temperatura (LIEBER, 1976; NIFFINEGGER-SOUZA, 1979; OLIVEIRA, 1982; FAVRAUD, 1984;

QUEIROZ, 1988) comum a todos os experimentos, é talvez a maior responsável pelas diferenças encontradas na frequência de setores, pois dificilmente incubadores apresentam temperatura permanente de 37°C.

Setores deteriorados foram encontrados numa frequência de 0,06, sendo que 17 puderam ser isolados e caracterizados morfológicamente. Entre eles está um aneuplóide, provavelmente um dissômico para o grupo de ligação VI, quando comparado com os dissômicos para todos os 8 grupos de ligação descritos por KAUFER e UPSHALL (1973). Segundo KAUFER (1961) a presença de grandes setores em aneuplóides é devida a não disjunção que causa perda do cromossomo extra e volta ao estado normal haplóide.

AZEVEDO e ROPER (1970) e AZEVEDO (1971) analisaram 31 setores originados de linhagem com duplicação e os classificaram em 4 grupos:

1. Determinantes de deterioração associados com deleção no grupo de ligação I; neste grupo está incluído um dos variantes encontrados por este trabalho, que mostrou-se auxotrófico para biotina e adenina, além de apresentar esporos verdes;

2. Determinantes de deterioração localizados em outros grupos de ligação que não os envolvidos na duplicação; os demais variantes encontrados parecem pertencer a esta classe, pois é a classe mais frequente e mais estável;

3. Determinantes localizados no segmento translocado, como novas duplicações em tandem, este grupo de variantes é bastante instável, não sendo isolados neste trabalho;

4. Determinantes tão instáveis que só podem ser analisados por seus derivativos, por exemplo um aneuplóide, como um dos isolados.

Nos sucessivos repiques, outros setores deteriorados foram obtidos a partir dos variantes já

isolados, que são os chamados variantes de 1ª ordem. Totalizando 24 deteriorados, 7 foram selecionados para análise genética. Sua caracterização morfológica está na tabela 3. Tal descrição morfológica foi feita logo após o seu isolamento, pois com os repiques suas características, em alguns casos, foram se alterando. Utilizando a numeração iniciada por AZEVEDO (1971), os variantes foram chamados de V93 a V96 e os de 1ª ordem V94.1, V95.1 e V96.1 por terem originado dos V94, V95 e V96 respectivamente.

5.2. Técnicas de análise genética - metodologia clássica e fusão de protoplastos

5.2.1. Obtenção de diplóides e haploidização

Para a realização da análise mitótica, a obtenção de diplóides, quer pela metodologia clássica (ROPER, 1952) quer pela fusão de protoplastos (PEBERDY, 1979) foi uma etapa necessária para a comparação das duas metodologias.

A confirmação da diploidia foi dada em ambos os casos, pela coloração, prototrofia e diâmetro dos conídios. Segundo ROPER (1952) a relação do diâmetro dos conídios haplóides e diplóides é de 1:1,3. Neste trabalho o diâmetro dos conídios diplóides nunca foi menor que 4,30 μm , que corresponde a 1,3 vezes o diâmetro dos conídios da linhagem haplóide MSE (tabela 4)

A obtenção de segregantes a partir de diplóides ocorre espontaneamente devido a sucessivas perdas cromossômicas (KAFFER, 1960 e 1961). Para aumentar a frequência de haploidização, vários agentes já foram ensaiados, sendo que os mais frequentemente utilizados são

os *p*-fluorfenilalanina (*pfa*) (MOPURGO, 1961; LHOAS, 1961), benlate (HASTIE, 1970) e cloroneb (AZEVEDO e SANT'ANA, 1975).

Por alguns motivos o benlate foi escolhido para esse estudo. PACCOLA (1982) utilizou os 3 agentes para comparar seus efeitos em cruzamentos envolvendo os variantes deteriorados. O cloroneb não mostrou ser um bom agente haploidizante em diplóides heterozigotos para aberrações cromossômicas, pois aumenta a frequência de permuta mitótica. Esse tipo de linhagem é muito influenciada pela taxa de crossing-over que altera sua instabilidade, sendo um dos mecanismos responsáveis por ela (NGA e ROPER, 1968). Além disso, o cloroneb seleciona algumas marcas como galA₁ e riboB₂ confundindo as análises. PIZZIRANI-KLEINER (1981) já havia detectado o efeito seletivo do cloroneb para mapear o gene bnca, pela detecção de apenas setores haplóides pyroA₄⁺. A localização do gene bnca no grupo de ligação IV foi conseguida com a utilização do *pfa*.

FAVRAUD (1984) encontrou o mesmo problema, 3 variantes foram comparados quanto ao efeito do cloroneb e benlate, dois deles, em cloroneb apresentaram alta frequência de segregantes pyroA₄⁺, quando comparados ao efeito do benlate.

Quanto ao *pfa*, todos os autores concordam com sua eficiência em doses baixas (AZEVEDO, 1971; MENEZES, 1974; PIZZIRANI-KLEINER, 1981; PACCOLA, 1982), inclusive com o aparecimento de setores deteriorados. Neste caso o impedimento é a disponibilidade.

O benlate foi então, a melhor opção. Foram obtidos setores haplóides deteriorados na dose de 0,5 µg/ml de solução benlate, em maior frequência para diplóides obtidos via fusão de protoplastos. FAVRAUD (1984), PACCOLA (1982) e QUEIROZ (1988) só analisaram setores brancos normais. FAVRAUD (1984) sugere que a ausência de

segregantes haplóides deteriorados em seu trabalho, pode ser devido à inibição do seu crescimento pelo fungicida ou à seu menor valor adaptativo em relação a outros segregantes. Neste trabalho parece que o tipo de alteração devida ao determinante de deterioração pode estar envolvido no aparecimento de setores deteriorados, pois os diplóides V93//MSE, obtidos tanto por fusão de protoplastos, quanto segundo ROPER (1952) não produziram deteriorados na quantidade de setores analisados, ou então a dose de benlate utilizada causou algum efeito, como sugere FAVRAUD (1984).

5.2.2. Segregação meiótica

MOLINA e AZEVEDO (1989) observaram que variantes deteriorados inoculados em meio completo mais estabilizador osmótico mostravam um fenótipo normal (fenocópia). Estes autores sugeriram que a aparência enrugada destes variantes tivessem origem pela dificuldade de absorção de algum componente do meio, provavelmente devido a alterações na membrana plasmática. O estabilizador "repararia" o erro permitindo o desenvolvimento normal da colônia.

Todos os variantes deteriorados analisados neste trabalho foram submetidos a inóculo em meio de cultura mais solução estabilizadora (tabela 22). Este artifício foi utilizado também nos dados de segregação meiótica, no sentido de minimizar o problema de competitividade entre colônias deterioradas e normais, que poderiam levar a um desvio da segregação 1:1.

Os deteriorados V93 e V96 permaneceram com desvios significativos para a proporção 1 normal : 1 deteriorado, apesar de provocar efeito no caso do V95

(tabela 10). PACCOLA (1982) em seu trabalho, descreve que a presença de aberrações cromossômicas heterozigotas em cruzamentos tem como consequência a produção de ascos com um número de ascóporos inferior a 8 ou ascos contendo vários ou todos os ascóporos defectivos, podendo ser esta uma possível explicação para os desvios significativos encontrados para a segregação 1:1.

5.2.3. Localização dos determinantes de deterioração

Todos os variantes deteriorados analisados, fazem parte do grupo descrito por AZEVEDO e ROPER (1970) e AZEVEDO (1971) que apresentam seu determinante localizado em outros grupos de ligação que não os envolvidos na duplicação.

O V93, mostrou através do ciclo parassexual, que o determinante de deterioração estava segregando junto com a marca galA₁ uma vez que todas as colônias brancas normais foram também deficientes para a utilização da galactose como única fonte de carbono. A coloração dos esporos deste variante em meio com estabilizador foi verde, indicando a presença do segmento em duplicata translocado no grupo de ligação II com o gene γ^+ . Nenhum setor verde com duplicação ou amarelo normal foi encontrado, o que envolveria a segregação do grupo de ligação II do variante deteriorado. Da mesma forma nenhum setor deteriorado foi observado. Fizeram parte da análise apenas setores brancos normais haplóides. O mesmo resultado foi encontrado para os diplóides obtidos pelas duas metodologias empregadas (tabelas 5 e 25). Pelo valor de recombinação obtido pela análise dos segregantes através do ciclo sexual, a marca galA₁ e o determinante de deterioração não estão ligados no

cromossomo III.

Quando os variantes V94 e V94.1 foram inoculados em meio mais solução estabilizadora, a coloração de seus esporos foi respectivamente verde e amarela. Isto sugeriu para o variante de 1ª ordem uma deleção do segmento duplicado translocado no grupo de ligação II, pois os V94 e V94.1 apresentaram os seus determinantes de deterioração no grupo de ligação IV. Neste caso, setores deteriorados puderam ser isolados. A coloração dos esporos, tanto de colônias normais como de colônias deterioradas foi branca. Da mesma forma que o V93, outros segregantes normais e deteriorados deveriam ser encontrados. Quanto à segregação meiótica, o V94 e o V94.1, não foi detectada qualquer ligação com a marca pyroA₄. O teste de alelismo que poderia comprovar se os dois determinantes são alelos, não pôde ser feito pela inviabilidade dos cleistotécios, nos vários cruzamentos realizados, mas acredita-se que sejam alelos. Além disso, cruzamentos com outros variantes e os V94 e V94.1 não foram realizados.

O variante V95 em meio com estabilizador apresentou esporos verdes. Pelas análises mitótica e meiótica, seu determinante de deterioração está no grupo de ligação III, ligado à marca galA₁. Fizeram parte da análise mitótica dos diplóides obtidos por fusão de protoplastos, colônias normais e deterioradas brancas e amarelas.

O V95.1, em meio com estabilizador, permaneceu com o fenótipo deteriorado. Segundo MOLINA e AZEVEDO (1989), aneuplóides comportam-se desta forma, o que não parece ser o caso. Uma auxonografia foi feita no sentido de verificar se com o fenótipo deteriorado neste meio, estaria envolvida alguma auxotrofia, o que também não foi o caso. Talvez tenha ocorrido perda do segmento duplicado do grupo de ligação II, pois surgiram setores verdes em meio mínimo com estabilizador e suplementado. O V95.1 apresenta um fenótipo bastante deteriorado, bem mais

característico do que o V95. As análises mostraram seu determinante de deterioração localizado no grupo de ligação III, segregando junto com a marca galA₁. O teste de alelismo comprovou que os determinantes dos V95 e V95.1, são alelos.

A exemplo do caso dos V94 e V94.1, os variantes V96 e V96.1 apresentavam em seus esporos coloração verde e amarela respectivamente. Formaram diplóides extremamente instáveis, mostrando uma segregação quase de 1:1 de, setores brancos, normais e deteriorados, principalmente para os diplóides obtidos por fusão de protoplastos. Nos dois casos, os determinantes estão no grupo de ligação III, sem qualquer ligação com a marca galA₁. Isto sugere que no V96.1 ocorra perda do segmento translocado no grupo de ligação II. O teste de alelismo também não pôde ser feito, pela inviabilidade dos cleistotécios nos cruzamentos realizados.

Determinantes de deterioração já foram encontrados em todos os grupos de ligação, com maior ou menor frequência. Neste trabalho eles foram localizados para os diferentes variantes nos grupos de ligação III e IV.

De maneira geral, quanto a localização dos determinantes de deterioração nos grupos de ligação, os resultados obtidos pelas duas metodologias utilizadas para a obtenção dos heterocários, foi semelhante, com algumas diferenças no que se refere a quantidade de setores haplóides observados nos diplóides obtidos por fusão de protoplastos. Com relação a frequências de recombinação mitótica, nada foi detectado, talvez pelo baixo número de segregantes analisados, como as alterações descritas por RIBEIRO - PAES et alii (1988) em diplóides de *A. nidulans* obtidos por fusão de protoplastos.

5.3. Testes de alelismo

Os variantes deteriorados que apresentavam determinantes de deterioração localizados no mesmo grupo de ligação foram submetidos a análise genética através do ciclo sexual para verificar se os determinantes eram alelos.

Quando os determinantes de deterioração não são alelos e não estão ligados, espera-se uma segregação de 3 colônias deterioradas : 1 colônia normal; havendo ligação, a proporção de deteriorados aumenta quanto mais próximos estiverem os determinantes, pois a frequência de crossing-over diminui, interferindo no aparecimento de segregantes normais. Se os determinantes são alelos espera-se o aparecimento de somente colônias deterioradas. Cuidados devem ser tomados para não confundir segregação de determinantes alelos com a segregação de um cleistotécio autofecundado. Uma maneira simples seria, semear os esporos sexuais em meio com estabilizador osmótico, se os deteriorados cruzados apresentarem cores diferentes será facilmente detectado os tipos parentais. Caso contrário é interessante verificar as outras marcas envolvidas no cruzamento.

Em alguns casos a segregação 3:1 não foi verificada, utilizando-se a segregação 2:1 para o teste do χ^2 . Novamente neste caso está em evidência o problema do menor valor adaptativo dos deteriorados, que poderia ser resolvido, em parte, pela segregação em meio completo com estabilizador osmótico.

O variante V9 obtido por AZEVEDO (1971) foi utilizado em alguns cruzamentos que envolviam variantes deteriorados cujos determinantes estavam localizados no grupo de ligação III.

Neste grupo de ligação, o determinante do

V93 não é alelo de qualquer outro, não estando ligado a eles tão pouco. No cruzamento V93 x V95.1, a proporção 2:1 foi verificada talvez pela menor viabilidade do V95.1, que apresenta seu fenótipo bastante deteriorado.

O V95 é alelo do V95.1, sendo encontrados somente segregantes deteriorados de diferentes tipos neste cruzamento. No cruzamento V95 e V96 a proporção de deteriorados foi maior que o esperado indicando uma possível ligação entre os dois determinantes. Deveria ter sido encontrado o mesmo tipo de resultado para o cruzamento V95.1 e V96, já que V95 e V95.1 são alelos, mas talvez a menor viabilidade do V95.1, detectada tanto no cruzamento V95.1 com MSE, quanto no cruzamento V93 e V95.1 tenha camuflado os dados, mostrando uma segregação 3:1.

Nos cruzamentos V96 com V96.1 e V94 com V94.1 todos os cleistotécios analisados, nos vários cruzamentos, foram inviáveis, apresentando coloração marrom clara e pouco consistentes.

5.4. Efeito do benlate sobre os diplóides

Durante as análises mitótica, aparentemente os diplóides obtidos por fusão de protoplastos foram mais instáveis, produzindo um número maior de segregantes haplóides. Um experimento comparativo foi feito para verificar tal aumento de instabilidade.

De maneira geral o número de setores por colônia em diplóides obtidos de fusão foi levemente maior quando comparados aos diplóides obtidos segundo ROPER (1952), entretanto, quando analisados estatisticamente, as diferenças são consideradas como sendo devido ao acaso. Foi considerado para esta ANAVA, como repetições, cada um dos variantes deteriorados, sendo os tratamentos diplóides

obtidos pelas duas metodologias. O coeficiente de variação mostrou-se um pouco alto por não serem repetições verdadeiras ($CV = 23,6\%$). Para o número de segregantes deteriorados, sua frequência em diplóides obtidos por fusão de protoplastos é maior do que os de diplóides obtidos pela metodologia clássica (tabela 34). Entretanto, o número de colônias que apresentaram setores permaneceu quase o mesmo.

Segundo OLIVEIRA (1982) o diplóide heterozigoto Dp (I, II) apresenta maior instabilidade em temperaturas mais altas, em meio completo acrescido de benlate ($1\mu\text{g/ml}$).

Um aumento na frequência de setores deteriorados a partir da linhagem A submetidas a protoplastização, foi obtido por QUEIROZ (1988). A autora sugeriu que alterações devem ocorrer, pois a célula fica exposta a substâncias utilizadas no processo e ainda ao esforço de regenerar uma nova parede.

5.5. Obtenção regeneração e fusão de protoplastos

5.5.1. Frequência de regeneração

O tempo de crescimento dos esporos em meio completo líquido foi alterado para 21 horas ao invés das 18 horas sugeridas por HAMLYN et alii (1981), pelo atraso no desenvolvimento de alguns dos deteriorados, principalmente do V95.1. Enquanto a linhagem MSE apresentou, após 21 horas as "bolinhas" de micélio já bem consistentes, o V95.1 mostrou "fiapos" de micélio. Tanto que, após as 3 horas de incubação no sistema lítico, fragmentos de micélio ainda permaneceram no caso da linhagem MSE, e para o V95.1 está totalmente digerido, para aproximadamente a mesma

quantidade de micélio. PEBERDY e GIBSON (1971) sugeriram que a parede recém-sintetizada de hifas terminais podem ser mais prontamente degradadas, do que a parede em regiões mais antigas. Da mesma forma para micélios em fases mais avançadas de desenvolvimento, onde a parede celular já é mais consistente.

A tabela 21 mostra a frequência de regeneração para todos os variantes e linhagens utilizadas. PEBERDY (1979) descreveu a frequência para regeneração de protoplastos de *A. nidulans* entre 20 e 30% . Neste trabalho as linhagens A e MSE apresentaram 25 e 23% aproximadamente, sendo que uma variação maior ocorreu em alguns dos variantes deteriorados (12-25%).

QUEIROZ (1988) sugeriu que a variação observada em seu experimento no número e regeneração de protoplastos dentro das repetições poderia ser explicada pela própria metodologia empregada, pois não se pode afirmar com precisão, se foi colocado exatamente a mesma quantidade de micélio ou se não houve qualquer oscilação da temperatura de incubação.

5.5.2. Frequência de fusão

Um pré-requisito necessário para a fusão de protoplastos é a aglutinação dos protoplastos, com perda mínima de viabilidade e alta taxa de fusão. Em plantas, vários métodos já foram descritos, entre eles a utilização de pressão mecânica através de micromanipuladores; exposição dos protoplastos a altas concentrações de nitrato de sódio; pH; antisoro específico (CONSTABEL e KAO, 1974; BURGESS e FLEMING, 1974). Entretanto, o mais eficiente produto foi utilizado por KAO e MICHYLUK (1974), o polietilenoglicol (PEG), conhecido estabilizador de

protoplastos em bactérias. O PEG induz uma forte aglutinação dos protoplastos e causa aderência a superfícies de vidro ou plástico.

A aglutinação pelo PEG, envolve atração dos protoplastos por forças eletrostáticas. O PEG é ligeiramente polar e a superfície da plasmalema preferencialmente, apresenta cargas negativas. Cátions bivalentes (geralmente sais de cálcio) são utilizados para ligar as moléculas de PEG, que estabelecem pontes entre os protoplastos isolados, mediando sua aglutinação. Vidro e plástico em soluções neutras carregam cargas negativas, essa adesão segue os mesmos princípios da aglutinação de protoplastos.

Em fungos, FERENCZY et alii (1974) descreveram evidências de fusão, sem qualquer estimulante, em *Geotrichum candidum*. Em 1975, FERENCZY et alii já demonstraram um aumento na frequência de fusão pela utilização do PEG em *A. nidulans*, *A. flavus*, *A. niger*, *Pennicillium frequentans*, e *P. ramigena*. Para o *A. nidulans*, o PEG agregou em média cerca de 30 protoplastos com uma frequência de fusão de $2,5 \cdot 10^{-3}$.

ANNE e PEBERDY (1976) com uma série de outros fungos dos gêneros *Pennicillium*, *Aspergillus* e *Cephalosporium* encontraram uma frequência de fusão de 0,1 a 0,7 %, após tratamento com PEG.

Pela metodologia empregada neste trabalho (PEBERDY, 1979), a frequência encontrada de fusão foi por volta de 0,1 % para os variantes deteriorados e 0,2% para as linhagens ppy e A (todos fundidos com protoplastos da linhagem MSE). Aparentemente, uma leve diferença existiu entre as frequências de fusão das linhagens A e ppy e dos deteriorados. Entretanto somente 2 repetições foram feitas de cada cruzamento, um experimento com 3 repetições deveria ser feito, com os devidos testes estatísticos para verificar melhor se ocorreu ou não tal variação.

Especulando sobre o assunto, foi observado que em meio completo mais KCl, após a mistura dos protoplastos com o PEG, que a proporção de colônias regeneradas da linhagem MSE, foi maior do que as dos variantes deteriorados (havia mais colônias brancas do que amarelas ou verdes). Foi então feito um experimento único e simples para verificar a porcentagem de regeneração da linhagem MSE e dos variantes deteriorados após a incubação com PEG. Como pode ser visto na tabela 23, para três variantes ensaiados, a porcentagem de regeneração foi menor do que a da linhagem MSE.

Esse ensaio elimina a hipótese de que os deteriorados em semeadura com certa densidade, perdem a competição para as colônias normais, mesmo porque esta foi feita em meio completo mais estabilizador. Por outro lado, reforça a idéia de que o PEG é mais tóxico aos variantes, por apresentarem algum problema de membrana. Ou ainda que a alteração de membrana dos variantes reduza a capacidade de aglutinar os protoplastos, por uma menor interação com o PEG. CONSTABEL e KAO (1974) citam que a aglutinação depende da flexibilidade da plasmalema e qualquer alteração desta flexibilidade pode reduzir a capacidade de aglutinar protoplastos. Reduzindo a aglutinação, resulta em geral em decréscimo na porcentagem de fusão.

Após a obtenção dos heterocários, a fusão de núcleos foi induzida em meio mínimo, objetivando a obtenção de diplóides. Estes foram analisados geneticamente com o intuito de verificar, principalmente, se havia confirmação dos resultados obtidos da análise mitótica através da obtenção de diplóides pela metodologia clássica. A discussão comparativa das análises está no item 5.2..

5.5.3. Transferência do caráter deteriorado

Com o objetivo de isolar uma colônia haplóide que apresentasse todos os marcadores genéticos da linhagem MSE, mas com o fenótipo dos variantes deteriorados, isto é, com a presença do determinante de deterioração, o ensaio segundo o item 3.11.4. foi desenvolvido para verificar a ocorrência do fenômeno.

Entre as colônias isoladas encontrou-se diplóides e alguns aneuplóides. Em *Aspergillus* as colônias aneuplóides são visualmente distinguíveis dos haplóides, pelo crescimento pobre e produção de grandes setores haplóides (KAHER e UPSHALL, 1976). Os diplóides originaram-se por fusão de núcleos no heterocário e os aneuplóides surgiram por não disjunção mitótica.

A idéia inicial era examinar 1000 colônias de cada variante e 5000 do variante mais instável (V96.1). Entretanto, foi encontrado o haplóide desejado antes das 1000 colônias, no variante V94. As marcas genéticas do haplóide foram verificadas em meio seletivo, e a sua coloração em meio mais estabilizador osmótico. O HV94 apresentou esporos brancos tal como a linhagem MSE. As marcas da linhagem MSE são bastante estáveis, descartando qualquer hipótese de reversão.

Uma possível transposição pode então estar envolvida no surgimento desta colônia, principalmente se considerarmos um modelo de retrotransposição para seu mecanismo de mobilidade; como os de leveduras (CLARK et alii, 1988) e *N. crassa* (KINSEY e HELBER, 1989). Um elemento transponível é capaz de transposição de um plasmídeo para o cromossomo, como já observado em procariotos (BOIVIN, et alii, 1988) e *Drosophila* (ROBERTSON et alii, 1988) utilizando o transposon como um veículo de clonagem. A transposição de um cromossomo para outro num

citoplasma comum, também ocorre na digenesia híbrida de *Drosophila*, onde o macho P^+ , é capaz de transpor seu elemento P para uma fêmea P^- durante a fecundação (COSTA, 1987) ou em milho para a transferência do elemento Ac em cruzamentos (MOTTO, et alii, 1988).

Estudos mais detalhados, através de análise genética devem ser feitos para confirmar e esclarecer tal fenômeno, já que a sugestão foi dada com base apenas na descrição morfológica e confirmação das marcas genéticas.

5.6. Coloração de núcleos de protoplastos

Os protoplastos foram corados após 3 horas de incubação em solução de enzima lítica. Os resultados obtidos conferem com os dados de QUEIROZ (1988), com apenas uma diferença, a frequência de protoplastos anucleados foi inferior. A autora já havia detectado uma menor ocorrência desse tipo de protoplasto após 1 hora de incubação na enzima. Seus resultados foram comparados aos dados de ISAAC e PEBERDY (1985), no período inicial de digestão utilizando-se KCl como estabilizador osmótico. A técnica de coloração utilizada neste trabalho foi a mesma utilizada por QUEIROZ (1988), segundo ela os protoplastos anucleados poderiam ser confundidos com artefatos de coloração, não entrando na contagem (tabela 36).

A diferença na frequência de regeneração dos protoplastos de variantes deteriorados em comparação com as linhagens A e MSE não pode ser explicada pela presença de protoplastos anucleados em maior frequência neste tipo de variante. Os dados referentes aos 2 grupos foi semelhante. O mais provável é que esteja envolvida a menor viabilidade dos deteriorados.

Pode-se verificar protoplastos grandes,

vacuolados com até 15 núcleos. PEBERDY e GIBSON (1971) descreveram os tipos de protoplastos observados a partir de 1 hora de incubação, sendo pequenos e não vacuolados, formados na extremidade da hifa. Continuando a incubação, resultou na liberação, das partes mais velhas da hifa, de protoplastos maiores e vacuolados, como os encontrados por este trabalho.

5.7. Eletroforese

A eletroforese dos variantes deteriorados e das linhagem MSE e A foi feita objetivando evidenciar uma possível, mas remota, alteração devida ao determinante de deterioração numa das enzimas do sistema esterase. Como pode-se observar na figura 7 o padrão das bandas de todas as amostras comportou-se igualmente.

Atualmente a técnica de eletroforese de amostras de DNA seguida de "Southern Blot" é extremamente utilizada na detecção e isolamento de elementos transponíveis, como no trabalho de KINSEY e HELBER (1989) para *Neurospora crassa*. Técnicas de genética molecular em pouco tempo devem surgir em estudos com *A. nidulans*.

6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que:

a) os determinantes genéticos de deterioração foram localizados nos grupos de ligação III e IV nos variantes isolados;

b) a utilização de estabilizador osmótico adicionado ao meio de cultura para estudos de segregação meiótica, produziu bons resultados no sentido de diminuir a desvantagem seletiva das colônias deterioradas em relação às normais;

c) não houve qualquer alteração na localização nos cromossomos dos determinantes genéticos de deterioração, nos variantes analisados pela metodologia clássica e fusão de protoplastos;

d) aparentemente, ocorreu transposição do determinante genético de deterioração através de fusão citoplasmática entre protoplastos de um dos variantes isolados e da linhagem MSE, pela obtenção de um variante deteriorado com todas as marcas genéticas da linhagem MSE;

e) o PEG mostrou ser mais tóxico aos variantes deteriorados do que para a linhagem MSE, talvez devido a problemas de membrana plasmática;

f) os diplóides obtidos através de fusão de protoplastos mostraram-se mais instáveis do que os obtidos pela metodologia clássica, tanto espontaneamente como na presença do fungicida benlate, produzindo maior número de setores deteriorados;

g) o padrão eletroforético do sistema esterase dos variantes deteriorados isolados e das linhagens A e MSE não apresentou qualquer diferença.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANNE, J. & PEBERDY, J.F. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. Journal of General Microbiology, London, 92:413-17, 1976.
- APIRION, D. A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice-versa in microorganisms. Nature, London, 195:959-61, 1962.
- AZEVEDO, J.L. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. England, 1971. 240p. (Ph-D Thesis - University of Sheffield).
- AZEVEDO, J.L. O ciclo parassexual em fungos. Revista de Microbiologia, São Paulo, 3: 157-67, 1972.
- AZEVEDO, J.L. Altered instability due to genetic change in a duplications strain of *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, Cambridge, 26:55-61, 1975.
- AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. Exercícios práticos de genética. São Paulo, Nacional, 1973. 288p.
- AZEVEDO, J.L.; OLIVEIRA, A.; ROCHA CAMPOS, A.J. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 2:237-41, 1976.

AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; DANTAS D'ARCE, M.M.C. Survival of haploid, diploid and disomic conidia of *Aspergillus nidulans* to mutagenic agents. Revista de Biologia, Lisboa, 12:271-78, 1983.

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

AZEVEDO, J.L. & SANT'ANA, E.P. The use of chloroneb to obtain haploid segregants from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. Aspergillus News Letter, Sheffield, 13:6, 1975.

AZEVEDO, J.A.; SANT'ANA, E.P.; BONATELLI Jr, R. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4 oxathiin in *Aspergillus nidulans*. Mutation Research, Amsterdam, 48:163-72, 1977.

BAINBRIDGE, B.W. Genetic analysis of an unequal chromosomal translocation in *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, Cambridge, 15:317-26, 1970.

BAINBRIDGE, B.W. & ROPER, J.A. Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, London, 42:417-24, 1966.

BALL, C. Instability associated with chromosome translocation in *Aspergillus nidulans*. Heredity, London, 21:531, 1966.

- BALL, C. Chromosomal instability related to gene supression in *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, Cambridge, 10:173-83, 1967.
- BALL, C. Filamentous fungi. In: BALL, C. Genetics and breeding of industrial microorganisms. Boca Raton, CRC Press, 1984. p.159-68.8.
- BALL, C. & ROPER, J.A. Studies on the inhibition and mutation of *Aspergillus nidulans* by acridines. Genetical Research, Cambridge, 7:207-21, 1966.
- BARNETT, W.E. & DE SERRES, F.J. Fixed genetic instability in *Neurospora crassa*. Genetics, Princeton, 48:717-23, 1963.
- BOIVIN, R.; CHALIFOUR, F.; DION, P. Construction of a Tn5 derivative encoding bioluminescence and its introduction in *Pseudomonas*, *Agrobacterium* e *Rhizobium*. Molecular & General Genetics, Berlin, 213:50-5, 1988.
- BONAS, V.; SOMMER, H.; HARRISON, B.J.; SAEDLER, H. The transposable element Tam1 of *Antirrhinum majus* is 17kb long. Molecular & General Genetics, Berlin, 194:138-43, 1984.
- BONATELLI Jr, R. & AZEVEDO, J.L. Effects of ethidium bromide in diploid and duplication strain of *Aspergillus nidulans*. Experientia, Basel, 33:311-12, 1977.
- BORGES, M.I. Técnicas de protoplastização e isolamento de DNA de alto peso molecular de *Aspergillus niger*. Campinas, 1978. 125pp. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).

- BRODY, H. & CARBON, J. Eletrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Washington, 86:6260-63, 1989.
- BURGESS, J. & FLEMING, E.N. Ultrastructural studies of the aggregation and fusion of plant protoplasts. Planta, Berlin, 118:183-93, 1974.
- BURR, K.W.; PALMER, H.M.; ROPER, J.A. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the effects of reduced DNA repair. Heredity, London, 27:487, 1971.
- BURR, K.W.; ROPER, J.A. ; RELTON, J. Modification of chromosome instability in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, London, 128:2899-907, 1982.
- CAMERON, J.R.; LOH, E.Y.; DAVIS, R.N. Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. Cell, Cambridge, 16:739-51, 1979.
- CLARK, D.J.; BILANCHOENE, W.; HAYWOOD, L.J.; DILDINE, S.L.; SANDMEYER, S.B. A yeast sigma composite element, Ty3, has proprieties of a retrotransposon. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 263:1413-23, 1988.
- CLUTTERBUCK, A.J. A variegated position effect in *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, Cambridge, 16:303-16, 1970.
- CONSTABEL, F. & KAO, K.N. Agglutination and fusion of plant protoplasts by polyethylene glycol. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 52:1603-6, 1974.

COOKE, P.; ROPER, J.A.; WATMOUGH, W. Trypan blue-induced deletions in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. Nature, London, 226:276-77, 1970.

COSTA, S.O.P. Elementos Genéticos Móveis em Eucariontes. In: COSTA, S.O.P. Genética Molecular e de Microrganismos; Os fundamentos da engenharia genética. São Paulo, Manole, 1987. p.409-22.

DAWSON, G.W.P. & SMITH-KEARY, P.F. Episomic control of mutation in *Salmonella typhimurium*. Heredity, London, 18:1-20, 1963.

DECARIS, B.; FRANCOU, F.; LEFORT, C.; RIZET, G. Unstable ascospore color mutants of *Ascobolus imersus*. I. Temporal occurrence and modalities of back-mutations. Molecular & General Genetics, Berlin, 162:69-81, 1978.

DECARIS, B.; LEFORT, C.; FRANCOU, F.; RIZET, G. Unstable ascospore color mutants of *Ascobolus immersus*. II. Determinism and possible mechanisms of gene instability. Molecular & General Genetics, Berlin, 170:191-202, 1979.

DE SERRES, F.J., Jr. A genetic analysis of an insertion translocation involving the ad-3 region in *Neurospora crassa*. Genetics, Princeton, 42:366-367, 1957.

DE VOS, G.F.; WALKER, G.C.; SIGNER, E.R. Genetic manipulations in *Rhizobium meliloti* utilizing two new transposon Tn5 derivatives. Molecular & General Genetics, Berlin, 204:485-91, 1986.

- DOONER, H.K.; ENGLISH, J.; RALSTON, E.J. The frequency of transposition of the maize element activator is not affected by an adjacent deletion. Molecular & General Genetics, Berlin, 211:485-91, 1988.
- DÖRING, H.P. & STARLINGER, P. Molecular Genetics of transposable elements in plants. Annual Review of Genetics, Palo Alto, 20:175-200, 1986.
- EIDE, D. & ANDERSON, P. Transposition of Tc1 in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Washington, 202:410-15, 1986.
- ELLIOTT, C.G. The cytology of *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, Cambridge, 1:462-76, 1960.
- EMMONS, S.N.; ROBERTS, S.; RUAN, K. Evidence in a nematode for regulation of transposon excision by tissue-specific factors. Molecular & General Genetics, Berlin, 202:410-15, 1986.
- FARABAUGH, P.J. & FINK, G.R. Insertion of the eukariotic transposable element Ty1 creates a 5-base pair duplication. Nature, London, 286:352-55, 1980.
- FAVRAUD, L. Instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans* com duplicação cromossômica. Piracicaba, 1984. 160p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- FERENCZY, L.; KEVEI, F.; SZEGEDI, M. High-frequency fusion of fungal protoplasts. Experientia, Basel, 31:1028-30, 1975.

- FERENCZY, L.; KEVEI, F.; ZSOLT, J. Fusion of fungal protoplasts. Nature, London, 248:793-94, 1974.
- GABRIELLI, A.C. & AZEVEDO, J.L. A strain of *Aspergillus nidulans* producing a high frequency of disomics. Transactions of the British Mycological Society, London, 75:15-20, 1980.
- HAMLYN, P.F.; BRADSHAW, R.E.; MELON, F.M.; SANTIAGO, C.M.; WILSON, J.M.; PEBERDY, J.F. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. Enzyme and Microbiol Technology, Guildford, 3:321-25, 1981.
- HARBERD, N.P.; FLAVELL, R.B.; THOMPSON, R.D. Identification of a transposon-like insertion in a *Glu-1* of wheat. Molecular & General Genetics, Berlin, 209:326-32, 1987.
- HASTIE, A.C. Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. Nature, London, 226:771, 1970.
- ISAAC, S. & PEBERDY, J.F. Protein synthesis in mycelial protoplasts of *Aspergillus nidulans*. Transactions of the British Mycological Society, London, 85:358-61, 1985.
- JAKOWEC, M.; PIERRI, P.; CHANDLER, M.; GALAS, D.J. Mutational analysis of the open reading frames in the transposable element IS-1. Genetics, Princeton, 120:47-55, 1988.
- JONES, R. K. & KARP, A. "Jumping genes" in maize. Journal of the Agricultural Society, 65: 79-108, 1985.

- KAFER, E. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. Nature, London, 186:616-20, 1960.
- KAFER, E. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. Genetics, Princeton, 46:1581-609, 1961.
- KAFER, E. The origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. Genetics, Princeton, 52:217-32, 1965.
- KAFER, E. & CHEN, T.L. Translocations and recessive lethals induced in *Aspergillus* by ultra-violet light and gamma-rays. Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, 6:249-54, 1964.
- KAFER, E. & UPSHALL, A. The phenotypes of the eight disomics and trisomics of *Aspergillus nidulans*. Journal of Heredity, Washington, 64:35-8, 1976.
- KAO, K.N. & MICHYLUK, M.R. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta, Berlin, 115:355-67, 1974.
- KINSEY, J.A. & HELBER, J. Isolation of a transposable element from *Neurospora crassa*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Washington, 86:1929-33, 1989.
- KLECKNER, N. Transposable elements in prokaryotes. Annual Review of Genetics, Palo Alto, 15:341-404, 1981.
- KUPIEC, M. & PETES, T.D. Allelic and ectopic recombination between Ty elements in yeast. Genetics, Princeton, 119:549-59, 1988.

- LEE, Y.T. & NGA, B.H. Mitotic stability of a duplication in *Aspergillus nidulans*. Genetics, Princeton, 77:38-9, 1974.
- LHOAS, P. Mitotic haploidization of treatment of *Aspergillus niger* diploids with para-fluorophenylalanine. Nature, London, 190:744, 1961.
- LIEBER, M.M. The effects of temperature on genetic instability in *Aspergillus nidulans*. Mutation Research, Amsterdam, 34:93-122, 1976.
- MAJERFELD, I.H. & ROPER, J.A. The effects of the coumarin on the frequency of deletions in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. Molecular & General Genetics, Berlin, 159:203-6, 1978.
- MARTINEZ, E. & LA CRUZ, F. Transposon Tn21 encodes a RecA-independent site-specific integration system. Molecular & General Genetics, Berlin, 211:320-25, 1988.
- McCLINTOCK, B. Chromosome organization and gene expression. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, New York, 16:13-47, 1951.
- McCULLY, K.S. & FORBES, E. The use of *p*-fluorophenylalanine with "master" strains of *Aspergillus nidulans* from assigning genes to linkage groups. Genetical Research, Cambridge, 6:352-59, 1965.
- MENEZES, E. Análise genética de variantes deteriorados e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, 1974. 114p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

- MENEZES, E.M. Reversion in variants from a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. Molecular & General Genetics, Berlin, 164: 255-58, 1978.
- MOLINA, S.M.G. & AZEVEDO, J.L. Estudos de fenocópia em variantes deteriorados de *Aspergillus nidulans*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 41., Fortaleza, 1989. Resumos. São Paulo, 1989. p.729.
- MOPURGO, H.Y. Somatic segregation induced by p-fluorophenylalanine. Aspergillus News Letter, Sheffield, 2:10, 1961.
- MORI, I.; MOERMAN, D.G. & WATERSTON, R.H. Analysis of a mutator activity necessary for germline transposition and excision of Tc1 transposable elements in *Caenorhabditis elegans*. Genetics, Princeton, 120:397-407, 1988.
- MOTTO, M.; MADDALONI, M.; PONZIANI, G.; BREMBILLA, M.; MAROTTA, R.; DI FONZO, N.; SOAVE, C.; THOMPSON, R.; SALAMINI, F. Molecular cloning of the o2-m5 allele of *Zea mays* using transposon marking. Molecular & General Genetics, Berlin, 212:488-94, 1988.
- NEWMAYER, D. Somatic instability in *Neurospora*, resulting from a pericentric inversion. Genetics, Princeton, 52:462-68, 1965.
- NEWMAYER, D. & TAYLOR, C.W. A pericentric inversion in *Neurospora* with unstable duplication progeny. Genetics, Princeton, 56:771-91, 1967.

NEWMEYER, D. & GALEAZZI, D.R. The instability of *Neurospora* duplication Dp (IL;IR) H4250, and its genetic control. Genetics, Princeton, 85:461-88, 1977.

NEWMEYER, D. & GALEAZZI, D.R. A meiotic uv-sensitive mutant that causes deletion of duplications in *Neurospora*. Genetics, Princeton, 89:245-70, 1978.

NEWMEYER, D.; SCHROEDER, A.; GALEAZZI, D.R. An apparent connection between histidine, recombination and repair in *Neurospora*. Genetics, Princeton, 89:271-80, 1978.

NEWTON, S.M.C. Elementos genéticos móveis em procariontes. In: COSTA, S.O.P. coord. Genética Molecular e de Microrganismos; os fundamentos da engenharia genética. São Paulo, Manole, 1987. p.292-305.

NGA, B.H. & ROPER, J.A. A chromosomal process giving rise to vegetative instability in *Aspergillus nidulans*. Heredity, London, 21:530-31, 1966.

NGA, B.A. & ROPER, J.A. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis at *Aspergillus nidulans*. Genetics, Princeton, 58:193-209, 1968.

NGA, B.A. & ROPER, J.A. A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, Cambridge, 14:63-70, 1969.

NICOLAS, A.; HAMZA, H.; MEKKI-BERRADA, A.; KALOGEROPOULOS, A.; ROSSIGNOL, J.L. Premeiotic and meiotic instability generates numerous b2 mutation derivatives in *Ascobolus*. Genetics, Princeton, 116:33-43, 1987.

- NIFFINEGGER-SOUZA, D.R. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1979. 224p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- OLIVEIRA, F.M. Análise genética de setores melhorados em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1982. 101p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- PACCOLA, L.D. Estudos genéticos e citológicos em variantes deteriorados de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1982. 131p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- PACOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C. Manual de Técnicas Eletroforéticas em Microrganismos. Piracicaba, FEALQ, 1988. 54p. (Manual Técnico)
- PASYUKOVA, E.G.; BELYAEVA, E.S.; ILYINSKAYA, L.E.; GUOZDEV, V.A. Outcross-dependent transpositions of copia-like mobile genetic elements in chromosomes of a inbred *Drosophila melanogaster* stock. Molecular & General Genetics, Berlin, 212:281-86, 1988.
- PEBERDY, J.F. Fungal protoplast isolation, reversion and fusion. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, 33:21-39, 1979.
- PEBERDY, J.F. & GIBSON, R.K. Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. Journal of General Microbiology, London, 69:325-30, 1971.

PICOLOGLOU, S.; DICIG, M.E.; KOVARIK, P.; LIEBMAN, S.W.

The same configuration of Ty elements promotes different types and frequencies of rearrangements in different yeast strains. Molecular & General Genetics, Berlin, 211:272-81, 1988.

PIZZIRANI, A.A. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, 1977. 111p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Efeito do gene binA₁ na formação de conídios de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1981. 141p. (Doutorado -Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

PIZZIRANI-KLEINER, A.A. & AZEVEDO, J.L. Characterization and genetical analysis of an *Aspergillus nidulans* strain that produces multinucleate conidia. Transactions of the British Mycological Society, London, 86:123-30, 1986a.

PIZZIRANI-KLEINER, A.A. & AZEVEDO, J.L. Effect of the bnca gene on the instability of *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, Cambridge, 48:145-50, 1986b.

POLLARD, D.R.; KAUFER, E.; JOHNSTON, M.T. Influence of chromosomal aberrations on meiotic and mitotic nondisjunction in *Aspergillus nidulans*. Genetics, Princeton, 60:743-57, 1968.

PONTECORVO, G. & KAUFER, E. Genetic analysis based on mitotic recombination. Advances in Genetics, New York, 9:71-104, 1958.

- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MacDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, New York, 5:141-238, 1953.
- PONTECORVO, G.; TARR GLOOR, E.; FORBER, E. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. Journal of Genetics, London, 52:226-37, 1954.
- QUEIROZ, M.V. O Efeito da protoplastização na instabilidade mitótica de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1988. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- RHODES, P.R. & VODKIN, L.O. Organization of the Tgm family of transposable elements in soybean. Genetics, Princeton, 120:597-604, 1988.
- RIBEIRO-PAES, J.T.; ZUCCHI, T.M.A.D.; TEREZI, H.F. Fusão de protoplastos e recombinação em *Aspergillus nidulans*. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 15., Piracicaba, 1988 Anais. Piracicaba, FEALQ, 1988. p.59. (Simpósio Internacional de Genética de Fungos Filamentosos).
- RIZET, G.; LEFORT, C.; DECARIS, B.; FRANCOU, F.; KOVASSI, A. Unstable ascospore color mutants of *Ascobolus immensus*. III. Mapping, temporal occurrences and modalities of back-mutations of 34 new unstable mutants. Molecular & General Genetics, Berlin, 175:293-303, 1979.
- ROBERTS, C.F. A replica plating technique for the isolation of nutritionally exacting mutants of a filamentous fungus (*A. nidulans*). Journal of General Microbiology, London, 20:540-48, 1959.

- ROBERTSON, M.R.; PRESTON, C.R.; PHILLIS, R.N.; JOHNSON-SCHLITZ, D.M.; BENS, W.K.; ENGELS, W.R. A stable genomic source of the P element transposable in *Drosophila melanogaster*. Genetics, Princeton, 118:461-70, 1988.
- ROIHA, H; RUBIN, G.M.; O'HARE, K. P Element insertions and rearrangements at the singed locus of *Drosophyla melanogaster*. Genetics, Princeton, 119:75-83, 1988.
- ROPER, J.A. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. Experientia, Basel, 8:14-5, 1952.
- ROPER, J.A. & NGA, B.H. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. The production of hypodiploid and hypohaploid nuclei. Genetical Research, Cambridge, 14:127-36, 1969.
- ROPER, J.A.; PALMER, H.M.; WATMOUGH, W.A. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the effects of caffeine. Molecular & General Genetics, Berlin, 118:125-33, 1972.
- ROSATO, Y.B. Efeitos de etil-metano-sulfonato e acriflavina na instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1973. 74p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- ROSATO, Y.B. & AZEVEDO, J.L. Acriflavine and ethyl methanesulfonate-induced mutants of *Aspergillus nidulans* strains with chromosome duplication. Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 4:247-62, 1978.

- SEXTON, C.E. & ROPER, J.A. Spontaneous duplications and transpositions of a large chromosome segment in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, London, 130:583-95, 1984.
- SHAW, G.R. & PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes a compilation of recipes. Biochemical Genetics, New York, 4:297-320, 1970.
- SHIRSAT, A.H. A transposon-like structure in the 5' flanking sequence of a legumin gene from *Pisum sativum*. Molecular & General Genetics, Berlin, 212:129-33, 1988.
- SIMMONS, M.J.; RAYMOND, J.A.; BOEDIGHEIMER, M.J.; ZUNT, J.R. The influence of nonautonomous P Elements on hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. Genetics, Princeton, 117:671-85, 1987.
- SOMMER, H.; BONAS, U.; SAEDLER, H. Transposon-induced alterations in the promoter region affect transcription of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*. Molecular & General Genetics, Berlin, 211:49-55, 1988.
- SYVANEN, M. The evolutionary implications of mobile genetic elements. Annual Review of Genetics, Palo Alto, 18:271-93, 1984.
- TSUDA, M. & LINO, T. Identification and characterization of Tn4653, a transposon covering the toluene transposon Tn4651 on TOL plasmid pWWO. Molecular & General Genetics, Berlin, 213:72-7, 1988.

- UPSHALL, A. & KAFER, E. Detection and identification of translocations by increased specific nondisjunction in *Aspergillus nidulans*. Genetics, Princeton, 76:19-31, 1974.
- ZUCCHI, T.M.A.D. & AZEVEDO, J.L. Mitotic instability in a III-VIII duplication strain of *Aspergillus nidulans*. Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2:93-108, 1979.
- WALBOT, V. & WARREN, C. Regulation of Mu element copy number in maize lines with an active or inactive mutator transposable element system. Molecular & General Genetics, Berlin, 211:27-34, 1988.
- WALKER, M.J. & PEMBERTON, J.M. Construction of a transposon containing a gene for polygalacturonate transeliminase from *Klebsiella oxytoca*. Archives of Microbiology, Berlin, 146:390-95, 1987.
- WATSON, J.D.; TOOZE, J.; KURTZ, D.T. Recombinant DNA - A short course. Scientific American Books, New York, p.140-51, 1983.