ESTUDOS DE FENOCÓPIA EM
VARIANTES COM DETERMINANTES
DE DETERIORAÇÃO EM
ASPERGILLUS NIDULANS

SILVIA MARIA GUERRA MOLINA
Economista Doméstico

Orientador: Prof.Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
MARÇO - 1993

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

Molina, Silvia Maria Guerra

M722e Estudos de fenocópia em variantes com determinan-
tes de deterioração em *Aspergillus nidulans*. Piraci-
caba, 1993.
274p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Aspergilo - Fenótipo - Deterioração 2. Aspergi-
lo - Genética 3. Fungo - Genética I. Escola Superior
de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.24

ESTUDO DE FENOCÓPIA EM VARIANTES
COM DETERMINANTES DE DETERIORAÇÃO EM
Aspergillus nidulans

SILVIA MARIA GUERRA MOLINA

Aprovada em: 17.03.1993

Comissão julgadora:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
Prof ^a . Dr ^a . Aline A. Pizzirani-Kleiner	ESALQ/USP
Prof. Dr. Renato Bonatelli Junior	UNICAMP

Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Orientador

A meus pais, José e Maria Ignez e à Laura,
minha irmã, pelo exemplo e incentivo.
A meu irmão, Marcos pelo carinho e amizade.

Aos amigos Vânia, Sérgio, Rogério
e Giovana pelo intenso
convívio e solidariedade.

A meus filhos Acauã e Gabriel,
que desde muito cedo vêm me ensinando
a conciliar Trabalho e Amor.

Dedico

Ao Professor Doutor

RENATO BONATELLI JUNIOR

Queremos deixar nossa HOMENAGEM por sua presença marcante na Banca Examinadora deste Trabalho, através de uma participação ativa, interessada, com sugestões construtivas e originais, atitude esta que caracterizou toda sua Atividade Profissional.

Neste evento, entretanto, registramos sua última contribuição à ESALQ, após uma carreira tão brilhantemente conduzida e tão precocemente interrompida.

Agradecimentos

- Prof.Dr. João Lúcio de Azevedo pela orientação, incentivo e valorização da interação entre as diferentes áreas de conhecimento desde o tempo da Iniciação Científica.
- Profª Drª Aline A. Pizzirani-Kleiner pela disponibilidade científica e atenção constantes no decorrer desta pesquisa.
- Profª Drª Maria de Lourdes T.B. Wiendl, pela orientação motivadora no meu primeiro trabalho de pesquisa científica, na graduação. Prof. Dr. Frederico Maximiliano Wiendl pela disponibilidade e incentivo ao longo desse percurso.
- Aos colegas e amigos Marisa V. de Queiroz, Cláudia Barros Vitorello, Adriana C. Longo e José Odair Pereira (também fotógrafo deste trabalho) pela permanente interação científica no decorrer deste trabalho.
- Rogério de P. Almeida pela lembrança do back-up, pelo gráfico e análises estatísticas. A pesquisadora Maria Izalina Ferreira Alves (Iza) pela disponibilidade em esclarecer nossas dúvidas estatísticas.
- Pesquisador Francisco Alberto Pelissari pela dedicação e eficiência na administração de nosso laboratório e auxílio nos ensaios do presente trabalho.

- Pesquisador Luiz Humberto Gomes e Técnica Ana Maria Brancallion Giacomelli pelo treinamento nas técnicas eletroforéticas.
- Técnico Izael Fortunato Jr. pelo auxílio atento nos ensaios de fenocópia e análises genéticas.
- Fernanda de Toledo Pizza e Carlos L. Machado estagiários do Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Economia Doméstica, pela dedicação e interesse.
- Giovana Maria de Oliveira, secretária e amiga, pela digitação dos originais deste trabalho, incentivo e apoio constantes.
- Funcionários do Departamento de Genética, em especial José Antônio da Silva (técnico) e Célia Pontin (estagiária) do Laboratório de Genética de Microrganismos, Fernando Leopoldino e Antônio P. Gorga (Berdan) do Xerox e Carmem M.S.F. Pilotto, Secretária do Depto.
- Cândida Vanderlêia de Oliveira Wosiack (Léia), secretária da Pós-Graduação do Departamento de Genética, Maria Fernanda de Cello Meucci e Maria de Lourdes D'Abronzio Razera, secretárias da Diretoria da ESALQ.

- Bibliotecárias da ESALQ/Campus USP/Piracicaba em especial a Silvana Marchizelli Gregório pela revisão das citações bibliográficas e Nilce T. Puga.
- Ao Sr. Milton Caprecci pela cópias fotográficas.
- Professores do Depto. de Genética em especial Cláudio Lopes de Souza Jr. e Maria Lúcia Carneiro Vieira, meus primeiros professores de Genética que me motivaram e abriram espaço neste departamento.
- Colegas do Departamento de Economia Doméstica pelo apoio e incentivo constantes.

ÍNDICE

Lista de Figuras.....	XVI
Lista de Tabelas.....	XVIII
Resumo.....	XIX
Summary.....	XXV
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1. Plasticidade genômica e fenotípica.....	05
2.1.1. Rearranjos do material genético.....	08
2.1.2. Reversão de mutações.....	40
2.1.3. Mutações condicionais.....	47
2.2. Protoplastização e características da membrana plasmática e da parede celular.....	59
3. OBJETIVOS.....	71
3.1. Objetivos gerais.....	71
3.2. Objetivo específicos.....	72
4. CARACTERIZAÇÃO DAS HIPÓTESES DE PESQUISA.....	73
4.1. Síntese do problema.....	73
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	82
5.1. Linhagens.....	82
5.2. Meios de cultura.....	87

5.2.1.	Meio mínimo (MM).....	87
5.2.2.	Meio completo (MC).....	88
5.2.3.	Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo.....	88
5.2.4.	Meio de acetato amônio.....	88
5.2.5.	Meio de galactose.....	89
5.2.6.	Meio completo duas vezes concentrado.....	89
5.2.7.	Meio completo líquido.....	89
5.2.8.	MCKCITP (Meio completo com solução de cloreto de potássio em tampão fosfato).....	89
5.2.9.	MCKCl (Meio completo com estabilizador osmótico cloreto de potássio).....	90
5.2.10.	MCMgSO4 (Meio completo com estabilizador osmótico sulfato de magnésio).....	90
5.2.11.	MC SORBITOL (Meio completo com estabilizador osmótico sorbitol).....	90
5.2.12.	MC SACAROSE (Meio completo com estabilizador osmótico sacarose).....	91
5.2.13.	MCTP (Meio completo com tampão fosfato).....	91

5.3. Soluções.....	91
5.3.1. Solução de vitaminas.....	91
5.3.2. Solução salina.....	92
5.3.4. Solução de "Tween" 80 (Solução dispersante).....	92
5.3.5. Solução de Lisol.....	92
5.3.6. Solução de Benlate.....	93
5.3.7. Suplementos adicionais ao meio mínimo.....	93
5.3.8. Tampão Fosfato 0,2M pH 5,8.....	95
5.3.9. Solução de KCl 1,2M pH 5,8.....	95
5.3.10. Solução de KCl 0,6M pH 5,8.....	96
5.3.11. Solução de enzimas para produção de protoplastos.....	96
5.3.12. Solução de Polietileno Glicol.....	96
5.3.13. Solução de Acrilamida.....	97
5.3.14. Tampão inferior (4x) Lower buffer.....	97
5.3.15. Tampão superior (4x) Upper buffer.....	98
5.3.16. Solução de SDS.....	98
5.3.17. Solução de Persulfato de Amônio.....	98
5.3.18. Estoque de tampão de corrida (TC) (4x) Running buffer stock.....	98
5.3.19. Tampão carregador (2x) - Loading buffer.....	98

5.3.20. Tampão de peso (2x) - Sample buffer.....	99
5.3.21. Soluções para método de Biureto.....	99
5.3.22. Tampão Maleato pH 6,5.....	99
5.3.23. Géis inferiores.....	100
5.3.23.1. Gel SDS - PAGE.....	100
5.3.23.1.1. Tampão de corrida 1x - (Running buffer 1x).....	100
5.3.23.1.2. Composição do Gel.....	100
5.3.23.2. PAGE - PROTEÍNAS.....	101
5.4. Obtenção de Revertentes.....	101
5.4.1. Estabelecimento de curva de sobrevivência.....	101
5.4.2. Irradiação para obtenção de mutantes revertentes.....	103
5.4.3. Caracterização preliminar dos revertentes obtidos.....	104
5.4.4. Teste de estabilidade.....	104
5.5. Análises genéticas.....	105
5.5.1. Obtenção de Heterocário.....	105
5.5.2. Procedimentos para análise.....	106
5.5.2.1. Isolamento de Colônia Diploide.....	106
5.5.2.2. Obtenção de Segregantes Haplóides.....	107

5.5.2.3. Análise Mitótica e Meiótica.....	107
5.5.3. Procedimentos para Análise Meiótica.....	108
5.5.3.1. Obtenção e isolamento de Cleistotécios.....	108
5.5.3.2. Análise Meiótica.....	109
5.6. Obtenção de Protoplastos.....	111
5.7. Fusão de Protoplastos.....	113
5.8. Extração de Proteínas.....	113
5.8.1. Maceração do micélio.....	113
5.8.2. Método Biureto.....	114
5.9. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	115
5.9.1. Corrida Eletroforética.....	115
5.9.2. Coloração de Isoenzimas.....	116
5.9.2.1. Esterase Método de GAHNE (1966).....	116
5.9.2.2. Proteína Total.....	116
5.10. Ensaio de Fenocópia.....	117
5.10.1. Ensaio com estabilizador osmótico KCl (0,6) e tampão fosfato sobre linhagens haplóides normal e deteriorada.....	117

5.10.2. Ensaio com diferentes estabilizadores osmóticos com e sem tampão fosfato sobre linhagens diplóides normal e deteriorada.....	118
5.10.3. Ensaio com diferentes estabilizadores osmóticos com e sem tampão fosfato sobre as linhagens haplóides normal e deterioradas A e Vs (respectivamente).....	119
5.10.4. Ensaio com gradientes de concentração de KCl sobre linhagens normal, deteriorada e revertentes.....	119
5.10.5. Ensaio de privação de nutrientes (a partir de MC) sobre linhagens normal e deteriorada em presença e ausência de estabilizador osmótico KCl.....	120
5.10.6. Ensaio de privação de nutrientes (a partir de MM) sobre linhagens normal e deteriorada em presença e ausência do estabilizador osmótico KCl 0,6M ou MgSO ₄ 0,6M.....	120
5.11. Estoques de linhagens de fungos filamentosos em sílica.....	121
6. RESULTADOS.....	122

6.1. Obtenção de revertentes.....	122
6.1.1. Estabelecimento da curva de sobrevivência.....	122
6.1.2. Obtenção de mutantes revertentes para a cor verde.....	124
6.1.3. Caracterização preliminar dos revertentes obtidos C ₁₀ C ₁₂ e G#.....	125
6.1.4. Teste de estabilidade de G#.....	126
6.2. Ensaio de Fenocópia.....	127
6.2.1. Efeito do estabilizador osmótico KCl 0,6M e tampão fosfato sobre linhagens haplóides normal e deterioradas.....	127
6.2.2. Efeito de diferentes Estabilizadores Osmóticos, com e sem Tampão Fosfatos sobre as linhagens diplóides Det C ₁₂ // MSE e C ₁₂ // MSE	131
6.2.3. Efeito dos estabilizadores osmóticos e tampão fosfato sobre as linhagens haplóides A e V5.....	134
6.2.4. Efeito do gradiente de concentração de KCl sobre o fenótipo das linhagens normal, deterioradas e revertentes.....	139

6.2.5. Efeito de privação de nutrientes (a partir de MC) sobre linhagens normal e deteriorada em presença e ausência do estabilizador osmótico KCl 0,6M.....	143
6.2.6. Efeito de privação de nutrientes (a partir de MM) sobre linhagens normal e deteriorada em presença e ausência do estabilizador osmótico KCl 0,6 M ou MgSO ₄ 0,6 M	147
6.3. Análises genéticas.....	151
6.4. Obtenção de protoplastos.....	188
6.5. Fusão de protoplastos.....	189
6.6. Eletroforese de proteínas.....	189
7. DISCUSSÃO.....	196
7.1. Caracterização preliminar das linhagens estudadas.....	196
7.2. Ensaio de fenocópia.....	197
7.2.1. Fenótipo cor em função do Tampão fosfato e Estabilizador Osmótico (KCl 0,6 M) em Linhagens Haplóides Normal e Deterioradas.....	197
7.2.2. Fenótipo Cor em Função do Estabilizador Osmótico e Tampão Fosfato em Linhagens Diplóides Normal e Deteriorada.....	200

7.2.3. Efeito dos Estabilizadores Osmóticos e Tampão Fosfato sobre as Linhagens Haplóides A e V5.....	203
7.2.4. Fenótipo Cor em Função do Gradiente de Concentração de KCl em Linhagens Deterioradas e Revertentes.....	206
7.2.5. Fenótipo Cor em Função da Privação de Nutrientes (a partir de MC) em Linhagens Normal e Deteriorada em Presença e Ausência do estabilizador osmótico KCl 0,6 M.....	210
7.2.6. Efeito da privação de nutrientes (a partir de MM) em linhagem normal e deteriorada na ausência ou presença do estabilizador osmótico MgSO ₄ 0,6 M ou KCl 0,6M.....	212
7.3. Análises genéticas.....	213
7.3.1. Análises genéticas a partir dos ciclos sexual e parasexual.....	213
7.3.1.1. Linhagens A e V5.....	213
7.3.1.2. Linhagem revertente C ₁₀	214
7.3.1.3. Linhagem revertente C ₁₂	216
7.3.1.4. Linhagem G [#]	219
7.3.1.5. Linhagem G [#] 1.....	221

7.3.1.6. Linhagem HV94.....	221
7.3.2. Análises genéticas a partir da obtenção e fusão de protoplastos.....	228
7.4. Eletroforese de proteínas.....	229
8. CONCLUSÕES.....	230
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	236
10. ANEXOS.....	242

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1	Marcadores genéticos da linhagem A de <i>Aspergillus</i> <i>nidulans</i>84
2	Marcadores genéticos da Linhagem MSE de <i>Aspergillus</i> <i>nidulans</i>85
3	Curva de sobrevivência da linhagem V ₅ à irradiação Ultra-Violeta123
4	Esquema dos Marcadores no Cromossomo I (V ₅).....157
5	Esquema dos Marcadores no Cromossomo I (C ₁₂).....169
6	Linhagens HV94 , A e V ₅ em Meio Completo e Meio Completo com KCl 0,6M.....191
7	Linhagem A e V ₅ cultivadas em MC; MCKCl 0,2M ; MCKCl 0,4M; MCKCl 0,6M; MCKCl 0,8M; MCKCl 1,0M MCKCl 1,2M e MCKCl 2,4M.....192
8	Linhagens Cultivadas em Meio Completo Eletoforese: α - Esterase e Proteínas Totais Linhagens: A , G [#] , G ^{#.1} , V ₅ , C ₁₀ , C ₁₂ , HV94.....193
9	Linhagens Cultivadas em Meio Completo com Estabilizador Osmótico (KCl 0.6M) Eletoforese: α - Esterase e Proteínas Totais Linhagens: A , G [#] , G ^{#.1} , V ₅ , C ₁₀ , C ₁₂ , HV94.....194

10	Linhagens Cultivadas em Meio Completo com Estabilizador Osmótico (KCl 0,6M) e Tampão Fosfato Elektroforese: α - Esterase e Proteínas Totais Linhagens: A , G [#] , G [#] .1 , V5 , C10 , C12 , HV94.....195	
11	Esquema de permuta - Det ₁₂ // MSE.....218	

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
1	Taxas de Sobrevivência da Linhagem V5 à Irradiação U.V.....122
2	Teste de Auxotrofia (<u>pro⁻</u> <u>paba⁻</u>) para as Linhagens C ₁₀ , C ₁₂ , G [#] e V ₅125
3	Setores formados em colônias G [#]126
4	Fenótipo cor em função do tampão fosfato e estabilizador osmótico (KCl 0,6M) em linhagens haplóides normal e deterioradas.....128
5	Médias da contagem de esporos normal e deterioradas em função do crescimento com e sem tampão fosfato e estabilizador osmótico (KCl 0,6M).....129
6	Avaliação do crescimento das colônias normal e deterioradas em função da presença e ausência de tampão fosfato e estabilizador osmótico (KCl 0,6M).....130
7	Fenótipo cor em função do estabilizador osmótico e tampão fosfato- Linhagens diplóides normal e deteriorada.....131

8	Avaliação do crescimento em função de estabilizadores osmóticos e tampão fosfato sobre colônias diplóides normal e deteriorada.....	133
9	Fenótipo cor em função do tampão fosfato e diferentes estabilizadores osmóticos em diferentes concentrações em linhagens haplóides A e V ₅ , respectivamente normal e deteriorada.....	135
10	Contagem de esporos de colônia normal e deteriorada em função do crescimento com e sem tampão fosfato em diferentes estabilizadores osmóticos.....	137
11	Avaliação do crescimento de colônias normal e deterioradas em função da presença e ausência de tampão fosfato e diferentes tipos de estabilizadores osmóticos.....	138
12	Fenótipo cor em função do gradiente de concentração de KCl sobre linhagens normal, deterioradas e revertentes.....	140
13	Esporulação em função do gradiente de concentração de KCl sobre linhagens normal, deterioradas e revertentes valores	142
14	Crescimento em função do gradiente de concentração de KCl sobre linhagens normal, deterioradas e revertentes.....	143

15	Fenótipo cor em função da privação de nutrientes (a partir de MC). Sobre linhagens normal e deteriorada em presença e ausência do estabilizador osmótico KCl 0,6M.....	144
16	Crescimento em função da privação de nutrientes (a partir de MC) sobre linhagem normal e deteriorada em presença e ausência do estabilizador osmótico KCl 0,6M.....	146
17	Fenótipo cor em função da privação de nutrientes (a partir de MM) sobre linhagens normal e deteriorada em presença e ausência do estabilizador osmótico KCl 0,6M ou $MgSO_4$ 0,6M.....	148
18	Crescimento em função de privação de nutrientes (a partir de MM) sobre linhagens e deteriorada em presença e ausência de estabilizador osmótico KCl 0,6M ou $MgSO_4$ 0,6M.....	150
19	Auxanografia das linhagens parentais.....	151
20	Análise meiótica - Linhagem A (//MSE).....	152
21	Análise mitótica - Linhagem V_5 (xMSE).....	153
22	Estudo da associação dos grupos de ligação ao determinante de deterioração análise mitótica Linhagem V_5 (//MSE).....	154
23	Análise meiótica - Linhagem V_5 (xMSE).....	155
24	Teste de 3 pontos - V_5 x MSE.....	156

25	Frequências de Recombinação Cromossomo I	
	$V_5 \times \text{MSE}$	157
26	Análise mitótica - Linhagem C_{10} (//MSE).....	158
27	Auxanografia de Segregantes Haplóides Deteriorados	
	Originados de C_{10} //MSE.....	159
28	Estudo da associação dos grupos de ligação	
	ao Determinante de Deterioração Análise Mitótica	
	e Linhagem C_{10}	160
29	Análise meiótica - Linhagem C_{10} (xMSE).....	161
30	Análise mitótica - Linhagem C_{12} (xMSE).....	162
31	Estudo da Associação dos Grupos de	
	Ligação ao Determinante de Deterioração -	
	Análise Mitótica - Linhagem C_{12} -Diplóide C_{12} //MSE...	163
32	Auxanografia de Segregantes Haplóides Deteriorados	
	Originados de C_{12} //MSE.....	164
33	Análise mitótica - Linhagem C_{12} (//MSE).....	165
34	Análise meiótica - Linhagem C_{12} (xMSE).....	166
35	Teste de 3 Pontos - $C_{12} \times \text{MSE}$	167
36	Frequência de Recombinação - Cromossomo I -	
	$C_{12} \times \text{MSE}$	168
37	Análise mitótica - Linhagem $G^\#$ (//MSE).....	170
38	Estudo da Associação do Grupos de Ligação	
	ao Determinante de Deterioração -	
	Análise mitótica - Linhagem $G^\#$ (//MSE).....	171

39	Análise meiótica - Linhagem G [#] (xMSE).....	172
40	Análise meiótica - Linhagem G ^{#.1} (//MSE).....	173
41	Análise mitótica - Linhagem A (//HV94).....	174
42	Análise meiótica - Linhagem A (xHV94).....	175
43	Análise mitótica - Linhagem V ₅ (//HV94).....	176
44	Análise meiótica - Linhagem V ₅ (xHV94).....	177
45	Análise mitótica - Linhagem C ₁₀ (//HV94).....	178
46	Análise meiótica - Linhagem C ₁₀ (xHV94).....	179
47	Análise mitótica - Linhagem C ₁₂ (//HV94).....	180
48	Análise meiótica - Linhagem C ₁₂ (xHV94).....	181
49	Análise mitótica - Linhagem G [#] (//HV94).....	182
50	Análise meiótica - Linhagem G [#] (xHV94).....	183
51	Análise meiótica - Linhagem G [#] (xHV94)-Fenótipo Fluffy.....	184
52	Análise meiótica - Linhagem G ^{#.1} (//HV94).....	185
53	Análise meiótica - Linhagem G ^{#.1} (xHV94).....	186
54	Segregantes Obtidos no Ciclo Sexual.....	187
55	Concentração de Protoplastos.....	188
56	Esquema para Fusão de Protoplastos.....	189
57	Concentração de proteínas totais nos extratos de micélio.....	190

ESTUDOS DE FENOCÓPIA EM VARIANTES
COM DETERMINANTES DE DETERIORAÇÃO
EM *Aspergillus nidulans*

Autora: Silvia Maria Guerra Molina

Orientador: Dr. João Lúcio de Azevedo

RESUMO

A reversão do fenótipo de variantes deteriorados de *Aspergillus nidulans* mediante cultivo em meio de cultura com estabilizador osmótico caracteriza-se enquanto fenocópia, uma vez que em meios osmoticamente estabilizados os variantes geneticamente deteriorados assumem o fenótipo da linhagem normal da qual se originaram.

No presente trabalho estudou-se alguns dos aspectos ambientais envolvidos na reversão por fenocópia, além de se proceder a estudos genéticos com linhagens normais e revertentes (genotípicos) com o objetivo de ampliar a compreensão relativa aos fenômenos de instabilidade mitótica que originam os variantes deteriorados e que interferem em sua expressão fenotípica.

Demonstrou-se que a reversão por fenocópia está associada à concentração dos estabilizadores osmóticos empregados, bem como que a linhagem deteriorada (V₅) apresenta melhor resistência à privação de nutrientes que a linhagem normal duplicada (A).

Por outro lado, revertentes genéticos para o fenótipo normal também são influenciados pela concentração de estabilizadores, refletindo-se este fato no aumento da esporulação em meio de cultura osmoticamente estabilizado.

As linhagens C₁₀ e C₁₂ foram caracterizadas enquanto revertentes (genéticos) por supressão. Na linhagem G[#] constatou-se a reversão do caráter deteriorado em "fluffy". A linhagem G[#].1 caracterizou-se pela reversão intragênica e estável ao fenótipo normal.

Na linhagem HV94 não se identificou um gene responsável pelo seu fenótipo deteriorado, bem como este não reverte pela ação de estabilizadores osmóticos presentes no meio de cultura, sendo este um comportamento característico de linhagens aneuplóides.

A partir das observações efetuadas no presente trabalho pôde-se definir como deteriorado típico variantes cujo fenótipo característico reverta mediante a presença de estabilizadores osmóticos no meio de cultura.

PHENOCOPY STUDIES ON VARIANTS WITH DETERMINANTS OF
DETERIORATION IN

Aspergillus nidulans

S U M M A R Y

The reversion of phenotypes of deteriorated variants of *Aspergillus nidulans* through culture in medium with osmotic stabilizer may be characterized as phenocopy, as far as variants genetically deteriorated assume the phenotype of the normal strain from which they originate.

In the present work it was studied some environmental factors which affect the reversion by phenocopy, besides proceeding to genetic studies with normal and reverting strains (genotypicals) with the objective to wide the relative understanding about phenomena of mitotic instability which originate the deteriorated variants, and which affect their phenotypical expression.

Procedures employed showed that reversion by phenocopy is associated to the concentration of osmotic stabilizers used, as well as that one deteriorated strain (V₅) presents better resistance to nutrient privation than the normal duplicated strain (A).

On the other hand, genetic reversions to the normal phenotype are also influenced by the stabilizers concentration. This fact leads on increased sporulation in osmotically stabilized culture medium.

The strains C₁₀ and C₁₂ were shown to be genetic revertants by suppression. In the strain G[#] it was objetived modification of the deteriorated character into the "fluffy" phenotype. The strain G[#].1 was shown to be an intragenic and stable reversion into the normal phenotype.

In the strain HV94 was not identified a gene responsable by its deteriorated phenotype, as well it was not reverted by osmotic stabilizer action being this a characteristic behaviour of aneuploid strains.

After the results derived from the present work a typical deteriorated can be defined as a strain which has a characteristic phenotype that reverts in the presence of osmotic stabilizer in the culture medium.

1. INTRODUÇÃO

Grande parte do conhecimento obtido a partir do estudo de fungos filamentosos advém do trabalho com diferentes linhagens de *Aspergillus nidulans*. Esta espécie também é classificada como *Emmericella nidulans*, em relação ao seu estado perfeito e vem sendo utilizada em estudos básicos e aplicados, envolvendo aspectos de seu desenvolvimento e reprodução, bem como da produção de enzimas. O presente trabalho, por sua vez, concentra-se especificamente na genética básica deste fungo, relacionando aspectos de sua instabilidade mitótica com variações fenotípicas induzidas pelo ambiente.

A instabilidade mitótica observada em linhagens duplicadas de *A. nidulans* vem sendo estudada desde a década de 60 (BAINBRIDGE & ROPER, 1966; NGA & ROPER, 1968; ROPER & NGA, 1969; AZEVEDO & ROPER, 1970; AZEVEDO 1975; MENEZES & AZEVEDO, 1978; QUEIROZ & AZEVEDO, 1988; MONTEIRO & PIZZIRANI-KLEINER, 1991; entre outros), caracterizando-se possivelmente pela presença de

elementos genéticos transponíveis e duplicações cromossômicas como supostos responsáveis pelos eventos característicos destas linhagens.

As características peculiares às linhagens duplicadas, bem como seu comportamento sob diferentes condições, foram objeto de diversos estudos. Dentre estes pode-se destacar AZEVEDO et alii (1977); BONATELLI Jr. & AZEVEDO (1977); ROSATO & AZEVEDO (1978); ZUCCHI & AZEVEDO (1979).

Em *A. nidulans* linhagens portadoras de duplicação de um segmento do grupo de ligação I translocado para o grupo de ligação II apresentam instabilidade mitótica identificada pela formação de setores classificados como melhorados, deteriorados e heterocarióticos.

Quando ocorre perda de parte ou de todo o segmento excedente translocado durante o processo mitótico, produzem-se setores denominados "melhorados", que apresentam fenótipo normal e crescimento mais vigoroso que as linhagens duplicadas originais, bem como perdem seu aspecto "rugoso" típico.

Por outro lado, ao longo das divisões mitóticas também se desenvolvem setores que apresentam geralmente diminuição característica da taxa de crescimento e morfologia ainda mais alterada que a linhagem duplicada

original, quando comparadas às linhagens não portadoras de duplicações. Estes constituem os chamados setores "deteriorados".

Os setores deteriorados, entretanto, apresentam um fenótipo passível de correção pelo ambiente. MOLINA & AZEVEDO (1989) submetendo linhagens portadoras de determinantes genéticos de deterioração a meio de cultura contendo estabilizador osmótico, verificaram que estas apresentaram fenótipo normal, evidenciando-se a coloração verde, amarela ou branca e não a coloração marrom característica de colônias portadoras de determinantes de deterioração.

Observou-se portanto que a expressão (fenótipo) de uma alteração genotípica decorrente da instabilidade mitótica pode ser influenciada, ou mais especificamente, suprimida, pela concentração osmótica do meio de cultura.

Sendo assim, ao se estudar os mecanismos envolvidos nesta fenocópia (fungos deteriorados apresentando aparência de normais), bem como ao se proceder à análise genética de revertentes verdadeiros (reversões genéticas para o fenótipo normal, induzidas em variantes deteriorados) pode-se esclarecer aspectos relevantes para a compreensão da instabilidade mitótica em fungos filamentosos.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Buscando fundamentar adequadamente o trabalho ora proposto, a presente revisão aborda aspectos da instabilidade mitótica e da expressão fenotípica, introduzindo questões relacionadas à plasticidade genômica e fenotípica (item 2.1), além de discutir e exemplificar os rearranjos do material genético (item 2.1.1). A seguir são abordadas as reversões de mutações (item 2.1.2) e as mutações condicionais (item 2.1.3) e então, questões relacionadas à protoplastização e características da membrana plasmática e parede celular (item 2.2).

Com estes tópicos se pretendeu abranger possíveis mecanismos relacionados à instabilidade mitótica, bem como à obtenção de revertentes genéticos ou apenas fenotípicos, inclusive, neste último caso, obtidos pela presença de estabilizadores osmóticos no meio de cultura.

2.1. Plasticidade Genômica e Fenotípica

Em geral assume-se que a estabilidade de fenótipos reflete uma estabilidade correspondente de genótipo e de fisiologia, além de se assumir tacitamente que há uma correspondência manifesta entre genótipo e fenótipo (TERZAGHI & O'HARA ,1990). Entretanto, segundo estes autores, a descoberta primeiro dos plasmídios e então das várias classes de elementos genéticos móveis autônomos e não autônomos estabeleceu uma séria excessão a este ponto de vista, especialmente da estabilidade em microrganismos. Neste sentido, as técnicas modernas de microbiologia e genética molecular evidenciam que o genoma microbiano e conseqüentemente o fenótipo, é certamente mais plástico e adaptável do que se imaginou inicialmente. Desta forma, é importante a compreensão do potencial inerente para a mudança nos grupos específicos de microrganismos, tanto em situações industriais como de campo.

Muitos dos eventos que TERZAGHI & O'HARA (1990) sugerem ser manifestações de plasticidade genômica também estão associados a divergências evolucionárias de microrganismos. Esses autores consideram que a variabilidade fenotípica e genotípica de microrganismos não deve ser atribuída simplesmente a uma conseqüência da regulação convencional de genes ou à transferência

intercelular de informações genéticas. Também assumem que tais variações não estão necessariamente relacionadas a eventos de significado evolucionário, manifestando antes, em relação à plasticidade fenotípica e genotípica, uma perspectiva preferencialmente adaptativa.

Para ilustrar este ponto de vista pode-se citar o trabalho de QUINN et alii (1989). Ao estudarem o papel dos lipídios insaturados na membrana, esses autores consideraram que a fluidez da membrana deve ser mantida dentro de limites definidos, sendo acionados mecanismos celulares caso as condições ambientais (por exemplo: alteração da temperatura) interfiram sobre tal fluidez, alterando-se para tanto o grau de insaturação das moléculas de lipídios constituintes da membrana.

Quando várias células são expostas a temperaturas fora de seu ponto ótimo de crescimento, este processo adaptativo é freqüentemente observado, o qual se manifesta como uma mudança nos lipídios da membrana. Acredita-se que mudanças na composição são requeridas para preservar o estado físico particular da membrana, de tal modo que sua função e estabilidade sejam preservadas sob condições ambientais modificadas. QUINN et alii (1989) ressaltam que os organismos unicelulares são altamente versáteis neste aspecto e vários padrões de mudanças nos

lipídios das membranas estão envolvidos na aclimação para o crescimento a diferentes temperaturas.

O mecanismo de controle parece operar ao nível da síntese do RNA_m referente à dessaturase dos ácidos graxos, a qual somente ocorre sob significativas exposições a baixas temperaturas.

Tais observações deram origem à idéia de que os mecanismos homeostáticos estão presentes dentro da membrana e que são capazes de identificar sua fase ou estado físico para dirigir as mudanças químicas requeridas para preservar suas condições funcionais.

Também estudando a questão de plasticidade fenotípica e genotípica MEERTS & VEKEMANS (1991) observaram uma população natural da planta *Polygonum aviculare aequale* submetida a diferentes intensidades de pisoteamento, constatando diferenciação fenotípica em relação aos diferentes tratamentos.

Os autores concluíram que as diferenças entre as plantas-mãe (a espécie é autógama) no campo devem-se à plasticidade fenotípica, porque nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os descendentes de plantas de locais intensamente pisoteados e não pisoteados para todas as dezesseis características morfológicas estudadas. Estes dados sugerem, inclusive, que as plantas-

mãe não eram geneticamente diferenciadas quanto às características estudadas.

Por outro lado, seus dados também sugerem que a população estudada vem se tornando geneticamente adaptada ao ambiente com pisoteamento porque vem perdendo a capacidade de elevar acentuadamente a produção de sementes mesmo em situações não perturbadas. Segundo MEERTS & VEKEMANS (1991) tais variações não podem ser creditadas somente às respostas plásticas ao pisoteamento. Estariam relacionadas também à heterogeneidade genética ou ambiental não correlacionada ao pisoteamento (como por exemplo, o efeito de drogas) evidenciando a complexidade da interação genótipo-ambiente na determinação do fenótipo.

2.1.1. REARRANJOS DO MATERIAL GENÉTICO

O próprio mecanismo celular encarregado da manutenção da informação genética, ou seja, a mitose, permite alterações, de tal forma que eventualmente se verificam recombinações gênicas e outros tipos de instabilidade ao longo do ciclo mitótico.

VISERAS et alii (1990) analisaram o comportamento dos cromossomos B em embriões e em linhagens de células somáticas e germinativas de machos e fêmeas do

inseto *Locusta migratoria* com o objetivo de determinar se a instabilidade mitótica observada nos cromossomos B é um aspecto comum aos diferentes tecidos e estudar as relações entre a instabilidade e a transmissão destes cromossomos.

Em função de seu comportamento mitótico os cromossomos podem ser classificados em dois grupos principais: um contendo os cromossomos cuja transmissão e distribuição às células filhas é disjuncional, de tal forma que todas as células contém o mesmo número de cromossomos B; e o outro grupo contendo os cromossomos nos quais a não disjunção produz variações de seu número entre as células de um mesmo indivíduo. A maioria dos cromossomos B enquadra-se na primeira categoria, em outros casos entretanto verifica-se a instabilidade mitótica.

Nas duas populações analisadas neste estudo a instabilidade mitótica dos cromossomos B é uma característica comum não somente a embriões, mas também a tecidos somáticos de adultos. Além disto, ocorre nos machos e nas fêmeas, embora nas fêmeas esta instabilidade não se relacione aos mecanismos de acumulação dos cromossomos B. Portanto, nesta espécie de gafanhotos, a instabilidade dos cromossomos B não causa sua acumulação; devendo-se esta ao destino preferencial de células com um elevado número de cromossomos B (originados de não-disjunção durante os

primeiros estágios do desenvolvimento) à formação de células germinativas, o que ocorre nos machos.

VISERAS et alii (1990) ainda acrescentam que os cromossomos B devem ser nocivos à espécie, porque a taxa de acumulação observada (mais que 30% nos machos) não eleva a frequência na espécie, sendo esta ao contrário, mantida ao longo das gerações. Sendo assim, deve ocorrer uma taxa igual de eliminação nas fêmeas ou uma forte seleção contra indivíduos contendo tal cromossomo, ou uma combinação de ambos os fatores e então os cromossomos B seriam mantidos nas populações naturais somente por causa dos mecanismos de acumulação em linhagens germinativas dos machos.

Existem além disso, vários mecanismos pelos quais o próprio DNA pode ser modificado.

Estas mudanças podem abranger desde a substituição de um único nucleotídeo até o rearranjo de longas sequências destes podendo ou não determinar alterações fenotípicas identificáveis.

Tais eventos podem então, originar características inesperadas, originalmente não pertencentes ao organismo em questão. desta forma, os rearranjos do material genético, também são reconhecidos como fonte de variação fenotípica.

BORST & GRAVES (1987) estabeleceram uma distinção entre os tipos de rearranjos do material genético. Esta classificação define 2 tipos básicos de rearranjos quais sejam:

A) Os rearranjos programados que incluem:

- inversões
- transposições
- deleções e
- eventos de inserção que ocorrem em pontos finais precisamente especificados e que são mediados por recombinações sítio-específicas.

Estes eventos podem ser regulados por sinais ambientais específicos ou podem ocorrer aleatoriamente. As consequências fenotípicas dos rearranjos, embora conhecidas na maioria dos casos que foram mais estudados, permanecem desconhecidas em outros.

B) Rearranjos não programados, que em geral não têm a definição topológica da classe dos eventos programados e se dão ao acaso, em relação ao tempo. As consequências fenotípicas e o significado de eventos não programados, freqüentemente reconhecidos como mutações, geralmente permanecem obscuros.

O papel das transposições vem sendo estudado desde 1951, através dos trabalhos pioneiros de BARBARA McCLINTOK em milho, sendo posteriormente estudado por outros autores. A própria instabilidade mitótica da linhagem designada como A, de *A. nidulans* têm-se associado a atividade de elementos transponíveis (AZEVEDO & ROPER, 1970).

Segundo descrição de TERZAGHI & O'HARA (1990), a transposição é geralmente um evento duplicativo, com uma cópia do elemento ocupando tanto a posição nova quanto a original, embora a excisão precisa de elementos transponíveis ocorra a frequências muito baixas, diferentes elementos variam acentuadamente em relação às seqüências-alvo específicas, com alguns parecendo ter capacidade para inserção em qualquer lugar, enquanto outros parecem apresentar um âmbito restrito de possíveis sítios de inserção. Em todos os casos descritos entretanto, uma pequena seqüência (menor que 10 pb) correspondente ao sítio de inserção, é duplicada, com uma cópia encontrando-se em cada extremidade do elemento transponível.

Já em relação à estrutura destes elementos, os mesmos autores salientam que muitos, se não todos os grupos têm ao menos uma modesta quantidade de seqüências repetidas e acrescentam que enquanto qualquer par de seqüências repetitivas igualmente muito curtas é potencialmente

recombinogênico, de particular interesse neste contexto são os elementos transponíveis IS (sequências de inserção) e Tn (transposons).

Os elementos IS caracterizam-se por serem compostos de sequências repetidas (IR) flanqueando um gene possivelmente transponível, cujo produto é responsável pela catálise dos eventos de transposição.

Já os elementos Tn são descritos como pertencentes a duas classes. Os elementos Tn de classe I constituem-se de um par de elementos semelhantes a IS, flanqueando outros genes os quais codificam geralmente funções não essenciais, tais como resistência a drogas. Os elementos Tn de classe II constituem-se de um par de sequências IR simples, flanqueando a função (ou as funções) de transposição além de outras funções, como as exemplificadas para os elementos de classe I.

FINNEGAN (1989) apresenta outra classificação dividindo os elementos transponíveis em função do tipo de mecanismo de transposição, estabelecendo outras duas classes distintas. Os elementos da classe I transpõem-se por transcrição reversa de um RNA intermediário (um mecanismo DNA-RNA-DNA) enquanto que os elementos da classe II transpõem-se diretamente de DNA a DNA. Os elementos da classe I mais bem estudados são estruturalmente semelhantes aos retro-vírus integrativos, os quais devem transpor

através de um ciclo vital de retro-vírus modificado, usando o RNA como intermediário. Estes elementos semelhantes aos retro-vírus são denominados retro-transposons e apresentam repetições diretas em cada extremidade, além de um sítio potencial de ligação para RNA_t-primer, exatamente após a sequência repetida esquerda e uma sequência rica em purinas exatamente antes da sequência repetida direita. O DNA entre estas extremidades contém quadros de leitura abertos entre os quais encontra-se a codificação para uma possível transcriptase reversa.

O segundo tipo de elementos da classe I é estruturalmente distinto dos retro-vírus, denominando-se transposons "não-virais", os quais possuem extremidades repetidas. Em geral apresentam dois quadros de leitura aberta, incluindo uma possível transcriptase reversa. Na maioria dos casos há uma sequência rica em adenina na extremidade 3' de uma fita. Além disto, estes elementos freqüentemente, apresentam deleções de tamanhos variáveis na extremidade de esquerda (5'), mas têm a extremidade direita fixa (3'). Elementos que sofrem deleções provavelmente não podem transpor porque perdem sequências necessárias à transcrição de intermediários da transposição.

Estes eventos de transcrição reversa podem se constituir em eventos que geram duplicações porque o elemento doador pode não ser excisado do genoma. Como resultado, o número de elementos da classe I do genoma pode elevar-se após cada evento de transposição.

Os elementos transponíveis de classe II dependem de mecanismos mediados por DNA para sua transposição e apresentam um grupo com seqüências invertidas curtas em suas extremidades e codificam uma função necessária para a própria transposição (transposase). Além deste, um segundo grupo integra a Classe II, apresentando longas terminações repetidas e invertidas, de tamanhos diferentes. Não se sabe ainda se estes elementos codificam uma função necessária à transposição. Também não se conhece o mecanismo preciso pelo qual os elementos da Classe II se transpõem. Provavelmente as extremidades do elemento devem ser quebradas em contato com a seqüência alvo, de tal forma que uma nuclease, provavelmente uma transposase, pode fazer quebras em uma única fita tanto no sítio-alvo como na extremidade do próprio elemento. Em alguns casos, ambas as fitas podem ser quebradas, ocorrendo então a excisão e a transferência do elemento. Todos os elementos requerem alguma atividade de DNA polimerase para organizar a duplicação do sítio alvo e isto pode, em alguns casos,

produzir duas cópias do elemento, uma que permanece no sítio doador e outra, integrada no sítio alvo.

TERZAGHI & O'HARA (1990) acrescentam ainda que as resistências a drogas são o tipo de marcador mais comumente encontrado em associações com elementos transponíveis antes por serem fáceis de identificar e selecionar do que pela não existência de outros tipos de funções associadas aos Tn. Segundo estes autores, qualquer função pode ser flanqueada por um par de elementos transponíveis, o que lhe transmite a mobilidade do referido par de elementos, criando um novo transposon.

Quanto ao efeito da transposição sobre a expressão do genoma, os primeiros trabalhos sobre transposição sugerem que o efeito usual seja a interrupção da função normal do sítio alvo. Por outro lado, existem evidências de que alguns elementos transponíveis conduzem, em ao menos uma orientação, uma sequência promotora que pode iniciar a transcrição irregular de seqüências "downstream" ao sítio de inserção, agindo então como um promotor móvel. Desta forma, os elementos transponíveis poderiam, quando colocados num contexto de seqüência apropriada, originar seqüências parcialmente promotoras ou semelhantes a um amplificador ("enhancer") o qual pode estimular efetivamente um promotor próximo, ainda que este seja muito fraco (TERZAGHI & O'HARA, 1990). Um evento de

transposição pode portanto, determinar a ativação de um gene até então inexpressivo (críptico), que torna-se totalmente operacional em função do estabelecimento de uma nova seqüência de bases. O aumento da expressão pode ocorrer até mesmo pela amplificação de uma seqüência específica.

Deve-se a estes fatos que alterações ao acaso na seqüência de nucleotídeos, bem como inserções de elementos IS ou Tn possam tanto conduzir à perda da função quanto à aquisição de novas funções como consequência da nova organização estabelecida na seqüência do DNA.

Vários destes elementos podem ser funcionais em um grande número de hospedeiros, tendo sua propagação efetivada por um vetor (plasmídio) natural. Além disso, a própria tarefa de construir linhagens para atividades industriais específicas poderia ser feita muito mais facilmente mediante uma cuidadosa avaliação da capacidade críptica de um organismo e das vantagens totais conduzidas por este aspecto da plasticidade microbiana do que ao se pensar somente na introdução de genes exógenos. (TERZAGHI & O'HARA, 1990).

FINNEGAN (1989) assume que os elementos transponíveis podem ter desempenhado um importante papel na formação de genomas eucarióticos e discute as várias maneiras que estes podem alterar os genes e o genoma.

Em relação à mudança dos padrões de herança, lembra que os grandes rearranjos cromossômicos, tais como as inversões, translocações e deleções, podem ser estimuladas pelos eventos envolvendo elementos transponíveis; enfatiza que em alguns casos, estes rearranjos podem ser até mesmo resultados diretos da atividade de elementos transponíveis. Grandes mudanças na estrutura dos cromossomos podem alterar o padrão de herança de grupos de genes através da recombinação de grupos de ligação ou pela alteração da frequência de recombinação entre os genes. Inclusive, as frequências de inversões cromossômicas específicas são diferentes entre as populações. Tais inversões podem ser mantidas uma vez que inversões heterozigotas têm uma vantagem seletiva, provavelmente porque reduzem a recombinação entre genes co-adaptados mantidos pelas inversões. Reforçando esta hipótese, observa-se o fato de que grandes inversões com elementos transponíveis em seus pontos de quebra têm sido encontradas em *D. melanogaster*.

Conforme discutido por TERZAGHI & O'HARA (1990), também FINNEGAN (1989) assume que os rearranjos cromossômicos podem afetar a expressão de genes individuais e amplificar seqüências de DNA. Em relação a este último caso, FINNEGAN (1989) esclarece que a recombinação entre cromátides envolvendo os mesmos

elementos deletam porções de DNA de uma fita e o duplicam na outra. E, seqüências duplicadas, seja por recombinação, seja por transcrição reversa e integração, podem ser ainda modificadas por mutações e originar genes que codifiquem produtos que desempenham novas funções.

Em relação às mudanças nas seqüências dos genes, os elementos transponíveis que sofrem excisão, freqüentemente o fazem de modo impreciso, gerando variação nas seqüências dentro dos genes, o que pode ser vantajoso do ponto de vista evolutivo. Se por exemplo, o número de bases adicionadas ou deletadas do sítio de inserção é um múltiplo de 3 e a inserção original localizava-se em um exon, então o resultado poderá ser um alelo codificando para um produto gênico alterado. Um elemento transponível também pode modificar um produto gênico ao alterar os locais de remoção do intron, durante o processamento do RNAm. (FINNEGAN, 1989).

Este autor levanta questões sobre os elementos transponíveis, tais como se estes seriam mantidos por seleção positiva ou simplesmente pela elevação do número de cópias devido à transposição duplicativa, que compensaria as perdas devidas às pressões de seleção negativas. Estas poderiam ocorrer em função de efeitos deletérios causados por mutações ou devidas a inserções e/ou rearranjos cromossômicos resultantes de recombinações desbalanceadas

entre os elementos.

As alterações na expressão dos genes provavelmente são tão importantes na evolução quanto as mudanças nas seqüências. Mas também nestes casos é difícil avaliar o papel que os elementos transponíveis desempenham no processo como um todo.

Segundo FINNEGAN (1989), até a elaboração de seu trabalho não se conheciam genes que sejam normalmente regulados por seqüências derivadas de elementos transponíveis, mas pode ser difícil detectar a origem de tais seqüências. Um elemento transponível adjacente a um gene poderia ser lentamente deletado por mutações até que somente os próprios elementos regulatórios fossem deixados intactos.

De qualquer forma, esse autor considera que as mudanças ocorridas durante a evolução dos genomas eucarióticos não podem ser creditadas a simples substituições de bases e que algumas mutações mais complexas devem ter ocorrido também. Como os elementos transponíveis podem afetar a estrutura e a expressão de várias maneiras, os transposons podem ter contribuído para esses eventos evolucionários.

Por outro lado, o movimento dos transposons pode dar a impressão de mutações dirigidas pelo ambiente (o que contraria a teoria da evolução Neo-Darwinista). Tal

dúvida poderia ocorrer porque quando as células sofrem privação de alimentos, a taxa de excisão de transposons pode elevar-se. E, como em alguns casos a excisão de porções do DNA permite o crescimento de bactérias em ambientes onde não conseguiriam sobreviver de outro modo, pode-se ter a impressão de ter ocorrido mutação dirigida. Entretanto, o ambiente antes afeta a estabilidade do DNA do que propriamente dirige o curso da evolução de um organismo (GILLIS, 1991).

A mutagênese pela inserção de elementos transponíveis, bem como translocações cromossômicas envolvendo seqüências repetitivas dispersas pelo genoma podem efetivamente ser deletérias aos organismos que as contém, devendo existir portanto mecanismos que visem ao seu controle.

Segundo SELKER (1990) existem dois processos que agem sobre o DNA repetitivo em *Neurospora crassa*. O primeiro, a recombinação pré-meiótica, elimina duplicações em tandem. O segundo, mutações de ponto induzidas em seqüências repetitivas (RIP), atua tanto em seqüências duplicadas ligadas como não ligadas e freqüentemente deixa produtos metilados. A RIP se constituiria portanto em uma resposta à presença de seqüências duplicadas, uma vez que seqüências simples, presentes no genoma, não ativam o processo. Inclusive, este poderia ser empregado como uma

técnica adequada para mutagênese dirigida, in vivo, por atuar em regiões específicas dos cromossomos. Entretanto, o papel primário da RIP em *Neurospora crassa* deve ser o de proteger o organismo de transposons, vírus e DNA "egoísta" (auto-duplicante). Cabe ressaltar que, a RIP não elimina diretamente os genes "egoístas", simplesmente inativa-os e desta forma, gera pseudo-genes.

RIP age tanto sobre duplicações criadas pelas transformações, como duplicações naturais em tandem. Entretanto, opera com menos eficiência sobre seqüências muito longas e sobre seqüências não ligadas. Além disto, as observações do padrão de inativação de genes, devido à RIP, evidenciam a dependência do pareamento das seqüências duplicadas. (SELKER, 1990).

Em um primeiro momento, pode parecer que a RIP limita a diversidade entre os organismos. Entretanto, pode até promovê-la, uma vez que pode suprimir a geração de famílias de genes compostas de membros muito semelhantes e pode também incentivar o desenvolvimento de famílias de genes contendo integrantes mais diversificados.

Não se encontrou evidência de RIP em fungos homotáticos tais como *Sordaria macrospora*, *Aspergillus nidulans* ou *Podospora anserina*, embora os três apresentem altas freqüências de deleção de repetições em tandem. A recombinação pré-meiótica intracromossomal, que elimina

apenas um membro de duplicações em tandem é mais conservativa que a RIP e poderia ser mais adequada para organismos homotálicos cujas mutações devidas à RIP não poderiam ser complementadas por genes não afetados do outro tipo de núcleo, como é o caso em organismos heterotálicos. (SELKER, 1990).

As hipóteses sobre genes saltadores, acima descritas, envolvem a transposição de genes de um local para outro dentro de um mesmo genoma. MARX (1991) afirma que de acordo com os dogmas da biologia não se supõe que os genes sejam capazes de saltar de uma espécie para outra, já que é necessário o sexo para o intercâmbio de genes entre diferentes organismos.

Entretanto, geneticistas moleculares observaram em *Drosophila melanogaster* elementos P de alguma outra espécie. Estes elementos são seqüências móveis de DNA que se deslocaram pelo genoma causando mutações ao se introduzirem em genes ou em suas seqüências regulatórias comportando-se portanto, como um transposon.

Já se considerou a transferência de genes entre espécies através de vírus, mas neste caso as pesquisas indicam que os elementos P podem ter sido transferidos para *D. melanogaster* vindos de *D. willistoni*, através de um parasita minúsculo que vive em associação com as duas espécies, tendo-se excluído a hipótese dos vírus

porque estes são muito específicos quanto ao hospedeiro para infectar ambas as espécies de moscas de frutas, de tal forma que não poderiam ter transferido genes entre elas.

As pesquisas indicaram como agente de transferência do elemento P a traça *Proctolaelaps regalis* De Leon, entre outros porque esta alimenta-se de ovos de moscas de frutas movendo-se freqüentemente de um ovo a outro. Este comportamento poderia capacitá-la a retirar e injetar material genético dentre os ovos, de modo semelhante aos pesquisadores humanos em seus ensaios de transferência de genes.(HOUCK et alii, 1991).

Cabe observar que, se a traça *P. regalis* coletar um gene de *Drosophila* que codifique RNAr, pode ocorrer transferência de outros genes além dos elementos P e isto traria novas implicações evolucionárias já que elementos assim transferidos poderiam auxiliar a criar espécies ou a eliminar algumas existentes, numa escala de tempo ainda não considerada pelos evolucionistas(1). Além disto, se esta "transferência lateral" de genes entre as espécies ocorrer freqüentemente, tal fato questionaria as hipóteses teóricas que assumem a transferência de genes por meio de herança, de uma geração para outra, ocorrendo ao longo deste processo o acúmulo lento de mutações. Desta

(1) (ALLAN SPRADLING, da Carnegie Institution de Washington em Baltimore, citado em Marx,1991).

forma, seriam questionados também os trabalhos sobre as relações evolucionárias entre as espécies desenvolvidas a partir da comparação das seqüências de genes. Entretanto não se sabe ainda quão freqüentes são tais transferências laterais(2).

O processo de transposição dos elementos P foi estudado por GLOOR et alii (1991) que produziram o modelo "cut-and-paste" (corta-e-cola), no qual o elemento deixa uma lacuna no DNA quando salta. Tal lacuna tem que ser preenchida sendo utilizada como molde uma seqüência do genoma que une as extremidades formadas. Isto pode determinar a restauração do elemento P em seu antigo lugar.

Se um elemento P salta após os cromossomos terem se duplicado, mas antes da divisão celular, por exemplo, uma das cromátides-irmãs ainda terá o elemento P na posição original. De acordo com o modelo "cut-and-paste", esse elemento P cujas extremidades unem a lacuna deixada pode servir como molde para o reparo da outra cromátide, cujo elemento P moveu-se para uma nova posição que pode ser qualquer uma no genoma. Desta forma, observa-se que o salto de um elemento P pode determinar o aumento do seu número de cópias no genoma. Isto significa que os elementos P podem reproduzir-se mais rápido que o próprio

(2) (DAVID HILLS, da Universidade do TEXAS em Austin, citado em MARX, 1991)

DNA da mosca da fruta o que contribui para explicar porque eles se espalham tão rápido como têm-se verificado ocorrer.

Por outro lado, ressaltam HOUCK et al (1991) a atividade humana, através da importação de frutas com as moscas que as infestam, provavelmente também ajudou os elementos P a moverem-se para novas populações de moscas de frutas.

Devido às características acima apresentadas os elementos P vêm sendo utilizados para substituir ou modificar genes em *Drosophila* em sua própria localização cromossomal normal, o que permite fazer mudanças sistemáticas nos genes, verificando-se a seguir, como tais alterações afetam atividades biológicas tais como o desenvolvimento do embrião ou as funções do sistema nervoso.

Esta técnica de substituição de genes poderia ser aplicável a qualquer organismo que tenha um transposon com um modelo de deslocamento semelhante ao dos elementos P (MARX, 1991).

Também em seres humanos foram constadadas "instabilidades cromossômicas espontâneas". O estudo de EMERIT (1990) aborda a atividade clastogênica no plasma de pacientes em que se verificou este tipo de fenômenos. Entre estes incluem-se as síndromes de quebra congênita "ataxia-telangectasia" e síndromes do sangue, doenças inflamatórias

crônicas, tais como artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica progressiva, doenças de Crohn e escleroses múltiplas. Além destes casos, fatores clastogênicos podem ser isolados do sangue de pacientes submetidos à isquemia/reperfusão. Em todos estes exemplos, o dano aos cromossomos pode ser prevenido pela superóxido desmutase (SOD) indicando um papel para o radical ânion superóxido no fenômeno de quebra.

Cabe acrescentar que os fatores clastogênicos são liberados pelas células após a exposição a radicais de oxigênio livre, os quais podem ser gerados pela irradiação, pela quebra respiratória das células inflamatórias, ou outras reações químicas (EMERIT, 1990).

MENECHINI (1987) discute que embora o emprego de oxigênio tenha significado um marco na evolução, por aumentar consideravelmente a extração de energia dos alimentos consumidos, este teria também uma ação deletéria sobre o próprio organismo aeróbico, não deixando porém, de ser empregado na proteção contra bactérias e outros organismos invasores.

Ocorre que, em decorrência de sua configuração eletrônica, a molécula de oxigênio tende a formar espécies intermediárias durante os processos metabólicos dos quais participa. Tais moléculas são fortes oxidantes, constituindo-se nos seguintes radicais, extremamente

reativos: ânions radical superóxido (O_2^-); peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^\bullet$).

Embora o organismo possua meios de atuar contra grande parte destes radicais, graças à ação da enzima catalase ou da dieta rica em antioxidantes tais como as vitaminas E e C, entre outros meios; em alguns casos não se atinge o controle de uma produção elevada desses radicais. Assim, as células acabam morrendo e o tecido sofre lesões, desencadeando-se processos degenerativos provocados ou influenciados por estas espécies ativas do oxigênio (p. ex: artrite, catarata, enfisema, doença de Parkinson, mutações, transformação maligna, envelhecimento).

MENEGHINI (1987) ressalta que há indícios de que ocorre um aumento permanente, ainda que discreto, de lesões do DNA das células, devido às espécies ativas de oxigênio, formadas no próprio metabolismo celular. Sendo assim, à medida que uma célula envelhece, acumula mais lesões genômicas sem reparo, aumentando a probabilidade de ocorrerem mutações, transformações malignas e a morte celular. De fato, a probabilidade de um indivíduo contrair câncer, aumenta exponencialmente com a idade. Além disto, o DNA, ao acumular lesões desempenha com menos eficiência suas funções, o que pode contribuir para a degeneração das células.

Por outro lado, as taxas de mutação certamente variam entre as espécies dependendo de mecanismos protetores tais como a capacidade de reparo do DNA (ENGSTRÖM et alii, 1989). A ação destes mecanismos protetores provavelmente está sob controle genético, o que leva o autor acima citado a questionar a possibilidade de se expandir a duração da vida através da seleção de características favoráveis para as idades tardias.

Existem muitas teorias sobre as causas primárias do envelhecimento, mas pode-se discriminar duas visões contrastantes. A primeira considera o envelhecimento como um processo ao acaso de acumulação de danos celulares os quais resultam na elevação da vulnerabilidade de vários órgãos e a segunda assume o envelhecimento como uma degeneração programada do organismo e portanto sob controle genético.

O fenômeno do envelhecimento, entretanto é extremamente difícil de definir mas pode ser descrito como um processo que se inicia após a maturidade sexual e início da fase adulta, caracterizado por um constante declínio funcional que determina a elevação das dificuldades do indivíduo em fazer frente ao stress ambiental. (ENGSTRÖM, 1989).

REIK (1989), relaciona distúrbios genéticos no homem ao "imprinting" do DNA, o qual é definido como um processo epigênico que marca os cromossomos paternos e maternos, influenciando a expressão fenotípica de doenças geneticamente determinadas em função da herança ser maternal ou paternal.

Segundo este autor, várias observações sugerem que os genomas maternos e paternos têm informações epigênicas relacionadas ao "imprinting" de seus cromossomos ser diferenciado e que tais diferenças podem resultar em diferentes programas de desenvolvimento. A metilação poderia se constituir no mecanismo molecular pelo qual cromossomos homólogos sofrem "imprinting" de acordo com sua origem parental. Entretanto, REIK (1989) considera que modificações epigênicas outras além da metilação também podem estar envolvidas.

A penetrância e expressividade de mutações, no rato, podem ser influenciadas pelo restante do genoma em questão ("background" genético). Também nestes animais se observou que a expressão de transgenes está estreitamente correlacionada com a metilação do DNA, de tal forma que os menores níveis de expressão sempre correspondem aos mais altos níveis de metilação (REIK, 1989).

Paralelamente, existem evidências de que a metilação é um componente do processo relacionado ao "imprinting" nos seres humanos. Em conclusão a suas observações REIK (1989) acrescenta que os genes controladores do "imprinting" em mamíferos podem estar envolvidos em processos genéticos cruciais, tais como os relacionados à penetrância reduzida, à expressividade variável e à predisposição genética ao câncer.

O próprio programa genético por sua vez pode ser influenciado por meio de oncogenes cujos produtos agem "em rede".

Fatores de transcrição são codificados por oncogenes celulares (nucleares) e a atividade do fator de transcrição é modulada em resposta a estímulos extracelulares (HERRLICH & PONTA, 1989). As oncoproteínas nucleares parecem representar a extremidade proximal ao gene em relação a uma rede de onco-proteínas celulares que ligam os estímulos extracelulares aos mecanismos transcricionais e desta forma ao programa de genes que uma célula pode expressar. Os autores consideram surpreendente entretanto, que muitos produtos de oncogenes localizados em diferentes regiões celulares e apresentando propriedades funcionais diferentes, todos produzem alterações fenotípicas semelhantes.

Os oncogenes considerados no trabalho acima citado reagem a sinais incomuns do exterior das células. Os fatores transcricionais são influenciados aparentemente por mudanças relevantes externas ao núcleo como por exemplo, quando as células são estimuladas por fatores de crescimento ou radiações ultra-violeta. Tais sinais incomuns seriam transportados por onco-proteínas citoplasmáticas (HERRLICH & PONTA, 1989), evidenciando-se também nestes casos a complexidade da interação entre o genótipo e o ambiente, a plasticidade genômica e, conseqüentemente, a plasticidade fenotípica.

Desde 1968 já se estabeleceu que o reparo do DNA é um mecanismo de importância crucial para a manutenção das condições de saúde do homem. A identificação de deficiências celulares em relação à capacidade para reparar falhas no DNA em indivíduos com várias desordens genéticas que pré-dispõem ao câncer, tem conduzido à idéia de que deficiências no reparo de DNA conduzem ao câncer. Posteriormente entretanto, verificou-se a ocorrência de outros distúrbios em conseqüência de falhas no reparo do DNA, os quais poderiam não estar necessariamente associados ao câncer (LEHMAN, 1989)

KROWCZYNSKA et alii (1990) associam minissatélites humanos aos pontos de quebra nas translocações de oncogenes. Minisatélites hipervariáveis ou

repetições variáveis em tandem ("variable tandem repeats") (VTRs) apresentam-se dispersos por toda a extensão do genoma de vertebrados superiores, constituindo-se em seqüências de DNA altamente polimórficas com repetições em tandem. A gênese e a variação polimórfica destas estruturas parecem se dever a erros de duplicação do DNA ou a eventos repetitivos de recombinações.

Os minisatélites estudados no trabalho acima citado apresentam um grau de homologia com o ativador de recombinações de procariotos denominado *chi*, cuja seqüência é GCTGGTGG. É possível, consideram os autores, que um componente das unidades repetitivas VTR semelhante ao *chi* possa gerar seqüências repetitivas em tandem ou porque este determine recombinações em algum estágio do ciclo celular meiótico ou mitótico ou porque determine erros ao longo do processo de duplicação do DNA. Estes autores apresentam evidências de que este componente semelhante ao *chi* (consenso VTR) também está associado à recombinação sítio-específica numa região específica do locus da imunoglobulina humana.

Posteriormente, o exame dos pontos de quebra de translocações de oncogenes têm implicado o mesmo octâmero (o consenso VTR) na recombinação somática.

A existência destes elementos em sítios de translocação somática sugere uma "função **chi**" na recombinação sítio-específica, talvez agindo como um sinal de reconhecimento necessário ao rearranjo do gene da imunoglobulina. Cabe acrescentar também que três rearranjos **bcl 2**, os quais ocorreram a 2 pb um do outro foram localizados em regiões exatamente adjacentes a este consenso, o qual define a extremidade 5' do agrupamento ("cluster") do principal ponto de quebra dos oncogenes.

Segundo KROWCZYNSKA et alii (1990) suas observações associam dois processos distintos de recombinação, quais sejam: a geração de regiões hipervariáveis humanas e a translocação de oncogenes. Neste contexto propõem duas hipóteses sobre o papel funcional do octâmero VTR: (A) O octâmero influencia a probabilidade de rearranjos vizinhos, como o fazem os elementos **chi**, ou (B) ele altera a regulação da transcrição de oncogenes, uma vez tendo ocorrido o rearranjo em questão. Desta forma certas regiões vizinhas a oncogenes podem ser sítios favoráveis à translocação desde que estejam associados a fatores regulatórios da transcrição específica do tecido em que se alojam.

Embora a função **chi** seja o determinante principal sobre o rearranjo de oncogenes, sítios pequenos, de alta probabilidade enquanto pontos de quebra podem originar-se dentro de alvos grandes e funcionais por causa do potencial recombinogênico do próprio consenso. Os rearranjos **bcl 2** (citados acima) confirmam as hipóteses. Tais rearranjos têm determinado o mesmo fenótipo maligno, quer ocorram próximos ao consenso, em região não codificadora do exon 2 do gene **Ig**, quer ocorram dentro do intron do mesmo.

Uma hipótese alternativa seria a existência de um "hotspot" recombinacional no exon 2, determinado pelo consenso, o qual desempenharia um papel relevante na aceleração da recombinação sítio-específica, agindo como um amplificador ("enhancer"). Entretanto, para oncogenes semelhantes a **bcl 2**, o consenso **VTR** (GC [A/T] GG [A/T] GG), pode ser o principal determinante da localização do ponto de quebra.

Segundo KROWCZYNSKA et alii (1990) esperava-se que a variação polimórfica dos minisatélites ocorresse em função de crossing-over desigual, mediado pelo **chi**. Entretanto, estes autores obtiveram evidências de que novos alelos **VTR** originam-se por um mecanismo distinto do

crossing-over simples e desigual, porque não ocorre a visualização das marcas "upstream" ao VTR após a geração de um novo alelo.

Igualmente convincente é a evidência estrutural do seqüenciamento do VTR *apo3*, o qual apresenta pequenas inversões ou deleções em um grupo de alelos relacionados em termos de tamanho, o que se constitui num resultado mais correlacionável a erros de duplicação (ou duplos crossovers) que a recombinação simples.

Desta forma os autores propõem que a origem dos VTRs é mediada por recombinações, requerendo no mínimo a presença dos sinais *chi* nos sítios onde os VTRs eventualmente ocorram. Também sugerem que a diversificação polimórfica subsequente à formação de um locus VTR deva-se mais comumente a erros de duplicação ou duplos crossovers, do que a crossovers desiguais, conforme justificado acima.

Estudando a possibilidade de inativação de genes específicos através da ocorrência de transformação heteróloga TILBURN et alii (1990) caracterizaram vários transformantes de *A. nidulans*. Dentre estes o Tw1 o qual apresentou entre 150 e 200 cópias do plasmídio *pAN 222* integradas no cromossomo II. Isto equivale a uma elevação no tamanho do genoma em ao menos 2,43 megapares de base (Mpb).

BRODY & CARBON (1989) estimam que o tamanho do genoma de *A. nidulans* seja de aproximadamente 31 mpb e o tamanho do cromossomo II seja 4,2 mpb. As cópias do pAN222 no Tw1 (transformante; TILBURN et alii, 1990) correspondem a uma elevação de ao menos 7,8% no tamanho do genoma total e a uma elevação de 58% no tamanho do cromossomo II. Isto aparentemente é tolerado pelo organismo durante o crescimento vegetativo e não impede o cruzamento com outra linhagem do Tw1.

Na linhagem A de *A. nidulans* também se observou tolerância ao aumento do tamanho dos cromossomos. PAES DE BARROS (1977), testando a hipótese de que esta linhagem fosse portadora de duplicação cromossômica, utilizou uma linhagem haplóide como controle. Ao comparar o diâmetro médio dos núcleos da linhagem haplóide com os da linhagem A, obteve valores com divergências estatisticamente significativas (ao nível de 5% de probabilidade). Isto se constitui numa evidência de que existe material adicional na linhagem A e que o mesmo deve ser grande o suficiente para poder ser detectado a partir da coloração dos núcleos dos conídios. Desta forma, o autor concluiu que o segmento translocado deveria ser relativamente grande. Cabe acrescentar que as linhagens com duplicação (A) e as linhagens deterioradas apresentam médias não divergentes entre si, ao nível de 5% de

probabilidade, o que sugere que as linhagens deterioradas mantêm a duplicação da linhagem A, da qual se originam. Ambas as linhagens entretanto apresentam eventos de instabilidade mitótica, mais freqüentes nas linhagens deterioradas. Nestas últimas deve-se considerar a existência de algum outro fator além da duplicação cromossômica, que esteja intervindo na não-conformidade mitótica observada (PAES DE BARROS, 1977).

QUEIROZ (1993) comparou o cariótipo eletroforético de linhagens de *A. nidulans* normais e haplóides; normais com duplicação; deterioradas e melhoradas. Desta forma ela constatou que nas linhagens duplicadas de *A. nidulans* designadas de A e B, respectivamente, há material adicional e que este determina 1 Mpb a mais no cromossomo II. Em uma das linhagens melhoradas, o segmento duplicado foi completamente perdido, porque esta apresentou o mesmo cariótipo eletroforético que a linhagem normal haplóide. Seus resultados demonstraram também que os determinantes de deterioração presentes nos variantes deteriorados analisados em seu trabalho, (V₂, V₃, V₅ e V₁₇), mesmo que sejam transposons, não podem ser visualizados por cariótipo eletroforético. Isto estabeleceu, portanto, que não são comparáveis em termos de tamanho à duplicação do cromossomo II. Além disto, se duplicações em tandem ocorrem, originando novos

deteriorados, estas também não são detectáveis pelo método utilizado; ao menos não nestes deteriorados (V_2 , V_3 , V_5 e V_{17}).

Suas observações também evidenciam que, embora conservando o fenótipo deteriorado, o V_2 perdeu o segmento duplicado no cromossomo II e o V_5 , no cromossomo I. QUEIROZ (1993) acrescenta entretanto, que isto pode ter ocorrido em seus estoques em função das sucessivas repicagens destes variantes, não sendo necessariamente uma característica originalmente associada a estes variantes deteriorados específicos. O que se constata também nestes exemplos é o fato de que as linhagens estudadas (A, B e variantes deteriorados) apresentam tolerância ao aumento do tamanho do cromossomo II.

É possível, por outro lado, que a pobre autofertilidade observada no Tw1 (TILBURN et alii, 1990) derive do tamanho anormal do seu genoma. Observou-se ainda a ocorrência de segregação ligada dos fenótipos prn^+ e wA^- o que demonstrou que todas as cópias dos plasmídios prn^+ estavam integradas no mesmo sítio, sugerindo que elas formaram uma organização em tandem a qual continha rearranjos internos. Neste trabalho obteve-se artificialmente portanto, um desequilíbrio cromossômico numa linhagem de *A. nidulans*, sendo este introduzido e mantido, além de sofrer inclusive recombinações.

Os eventos de recombinações desempenham um importante papel na integração de DNA exógeno, conforme demonstrado no trabalho de KÖHLER et alii (1989). Através da irradiação de protoplastos tratados com DNA plasmidial e PEG estes autores obtiveram taxas de transformação mais altas que as obtidas com protoplastos não irradiados transformados pelos mesmos métodos. O elevado número de colônias transformantes estáveis após a irradiação de protoplastos pode ser o resultado de uma taxa de integração maior dos genes marcadores. A indução da quebra das fitas (de DNA) com o reparo subsequente poderia intensificar eventos de recombinação resultando no aumento das taxas de integração do DNA, conduzindo portanto à elevação do número de colônias transformantes estáveis após a irradiação dos protoplastos.

2.1.2. REVERSÃO DE MUTAÇÕES

A instabilidade genotípica e fenotípica, devida a mutações não se esgota necessariamente em um único evento mutacional. Uma dada mutação pode ser, por exemplo, suprimida por uma nova mutação no mesmo local ou em outro local do genoma, caso este em que se registra sua "supressão" ou a chamada "reversão por supressão".

Muitos estudos envolvem a reversão genética de mutações.

Um exemplo para supressão de mutação (reversão) indireta, também chamada "supressão extragênica" é apresentado em JAMIESON et alii (1991) cujo trabalho relata a mutação *spp 81.3* em *Saccharomyces cerevisiae* que suprime a mutação *prp 8-1* referente a uma deficiência em uma das proteínas envolvidas no processamento do pré-RNA_m, a qual está geneticamente ligada à mutação para sensibilidade ao frio. Os autores ressaltam entretanto, ainda não estar bem definido o papel da proteína *SPP 81*, sendo esta provavelmente uma RNA helicase dependente de ATP cujo papel no processamento do pré-RNA_m ainda está em discussão.

Mutações que determinam a supressão da expressão fenotípica de uma mutação anterior podem ser identificadas por meio de cruzamentos. Isto porque o fenótipo revertente depende da presença da mutação supressora quando também estiver presente a mutação do locus original. Desta forma, entre as possíveis recombinações na progênie, a ocorrência do gene mutado original na ausência da mutação supressora determina a expressão do fenótipo mutante anterior.

O objetivo do trabalho acima citado constitui-se na identificação de genes que codificam fatores para o processamento do RNA_m, que interagem com a

proteína PRP 8-1 o que foi efetivado através do isolamento do supressor extragênico de uma mutação *prp* 8-1.

A metodologia utilizada envolveu também a clonagem dos genes PRP e caracterização de seu produto protéico.

Um outro estudo envolvendo supressores de mutação foi desenvolvido por MURGOLA (1990), abordando a especificidade e precisão na decodificação da informação genética. Os mutantes supressores têm sido eficientemente empregados na identificação das várias macromoléculas envolvidas neste processo, bem como nos estudos sobre o papel do RNAm e RNAt e ainda na abordagem dos determinantes estruturais das funções e interações entre estes.

Segundo MURGOLA (1990) na supressão traducional um defeito celular causado por mutação em um gene é corrigido por um erro na tradução do RNAm do gene mutante sendo que esta correção pode ser determinada por uma forma mutante de qualquer macromolécula envolvida na tradução. Como exemplo cita um dos mecanismos possíveis, a supressão missense que é explicada pela ação de determinantes externos ao anticodon, o que permite a manutenção da especificidade de decodificação normal, porque estes alteram a identidade do RNAt. Isto, segundo MURGOLA (1990), antes de se constituir necessariamente em um "erro" pode na realidade ser uma "alternativa

traducional" intercambiável que teria por objetivo regular funções celulares específicas.

Através do uso da supressão missense e nonsense o contexto do codon tem sido definido como incluindo pelo menos 3 nucleotídeos "upstream" e 3 nucleotídeos "downstream" em relação ao codon em questão. MURGOLA (1990), supõe que muitos nucleotídeos mais estejam envolvidos e empregou a supressão traducional em seus estudos, testando suas hipóteses por procedimentos genéticos clássicos e modernos, "in vivo" e "in vitro". A busca de supressores missense conduziu a uma classe causada pela inserção de um nucleotídeo dentro de uma alça ("loop") do anticodon, um tipo de mutante que revelou a possibilidade de mudança do anticodon na decodificação. Cabe acrescentar que supressores de mutação que alteram o quadro de leitura (-1) podem corrigir mutações (+1) do quadro de leitura (MURGOLA, 1990).

ARST et alii (1989) estudaram a reversão intracistrônica da mutação *are* ^{AR}-18 a qual se deve a uma translocação recíproca envolvendo os braços direitos do cromossomo III, que contém *areA* e do cromossomo IV. As mutações designadas *areA*^{AR} provocam uma redução significativa nos níveis de muitas enzimas e permeases ativas na utilização de fontes de nitrogênio e conseqüentemente determinam a incapacidade de utilização de

outras fontes de nitrogênio que não o amônio. O reconhecimento inicial foi baseado sobre uma elevação na capacidade de utilizar todas as fontes de nitrogênio testadas sem qualquer das anormalidades morfológicas pleiotrópicas associadas com mutações que ativam *areB*. Este por sua vez é um gene regulatório críptico cujo produto pode aparentemente substituir o de *areA* e, pode provocar a expressão de todos os genes sob o controle de *areA*, suprimindo *areA^{R-18}* para utilização de todas as fontes de nitrogênio.

Em nenhum caso estudado a reversão do *areA^{R-18}* foi completa pois, a maioria dos possíveis revertentes intracistrônicos utilizados, provavelmente todos, utilizaram a fonte de nitrogênio com menos eficiência que o tipo selvagem, mas claramente o fizeram melhor que a linhagem *areA^{R-18}*.

Cada possível revertente intracistrônico *areA^{R-18}* continuou apresentando a translocação envolvendo os cromossomos III e IV além de conter novas translocações que provavelmente unem promotores funcionais, sítios de ligação de ribossomos e codons de iniciação à porção 3' do gene. Todos os quatro eventos de reversão detectados, envolveram a porção 3' de *areA*, sendo que a presença da porção 5' é completamente desnecessária para o fenótipo revertente. O ponto de quebra da translocação ocorre ao

centro da região codificadora, sendo provável que aspectos relevantes da proteína *areA* sejam codificados "downstream" ao ponto de quebra. Além disso, a ativação de genes estruturais sob o controle de *areA* ocorre igualmente se a extremidade 5' do gene é substituída ou a 3' é truncada, indicando que a região central de *areA* codifica a maioria das características essenciais da proteína regulatória.

O trabalho de SUDIRO, et alii (1991) empregou mutantes revertentes visando elucidar os fatores celulares envolvidos na transformação de células de rato pelos genes E6 e E7 de HPV 16. Para tanto foram isolados revertentes celulares de linhagem nº 7 de ratos, transformados por estes genes. Procedeu-se deste modo supondo que tais células revertentes possuíssem alterações genéticas em suas vias bioquímicas que fossem críticas para a transformação, hipótese que foi reforçada pelos dados obtidos.

Estudando as mutações dos revertentes, no sentido de determinar se eram recessivas ou dominantes, SUDIRO et alii (1991) procederam a fusões destas com células normais, verificando que o fenótipo assim obtido era normal o que indicou que os revertentes eram recessivos. Isto sugere que o mecanismo de reversão não se deveu à ativação de um gene supressor para transformação, mas sim à inativação de um gene celular que seja expressado em linhagens de células normais e que seja essencial à via

de transformação pelos genes HPV 16 - E6E7. Tal resistência, ao menos nos revertentes PR2 e PR10 não se constitui numa ausência geral de resposta à transformação por oncogenes, uma vez que estas linhagens ainda são eficientemente transformadas por outro retrovírus portador de oncogenes.

Em termos de localização as reversões de mutações podem ser agrupadas sob as seguintes hipóteses:

a) Reversão verdadeira, onde se encontram, em cruzamentos com indivíduos de fenótipo "selvagem" (não portadores da mutação original) 100% de descendentes normais devendo a mutação que causou a reversão do fenótipo ter ocorrido dentro do gene em questão.

b) Supressão, casos em que se verificam a reversão do fenótipo mutado ao "selvagem" (ou "normal") em função de mutações ocorridas em outro locus no genoma, que não o locus da mutação original. Caracterizam-se estes eventos da seguinte maneira:

b.1) Uma segunda mutação, determinante da supressão do fenótipo da primeira, apresenta-se ligada a esta, no mesmo cromossomo portanto. Neste caso, em cruzamento com indivíduos "selvagens" ocorreram na progênie tanto maior número de indivíduos "selvagens" quanto maior a proximidade entre os dois loci em questão. Isto, em função

da diminuição da taxa de recombinação entre os genes mutante e supressor.

b.2) A segunda mutação, determinante da supressão do fenótipo de primeira, localiza-se em outro cromossomo ou, se no mesmo, a uma distância grande, de forma que ambos os loci segregam independentemente. Nos cruzamentos com indivíduos "selvagens" devem ser encontrados tanto indivíduos selvagens como mutantes. (Proporção esperada, 3:1, respectivamente).

2.1.3. MUTAÇÕES CONDICIONAIS

O emprego de mutantes cuja expressão fenotípica pode ser alterada por condições ambientais é adequado, por exemplo, no estudo da mitose. MORRIS et alii (1989) empregaram vários mutantes condicionais de *A. nidulans*, quais sejam: os mutantes bim, que são bloqueados em mitose (blocked in mitosis), os mutantes nim que são bloqueados na intérfase (never in mitosis) e os mutantes rud, que exibem distribuição nuclear anormal (nuclear distribution) e são aparentemente bloqueados em relação ao movimento nuclear. Todos estes mutantes são temperatura sensíveis, dependendo a manifestação dos fenótipos acima descritos da temperatura de incubação dos mesmos.

Em outro trabalho, ENGLE et alii (1990) observaram que a mutação **bim E7** causa a referida interrupção da mitose em temperaturas restritivas. Mas, também constataram que a deleção do gene **bimE** devida a quebras gênicas também causa uma interrupção da mitose. Ou seja, o bloqueio mitótico também é observado em células contendo mutação nula em **bimE**, obtida pela quebra do gene, indicando que a perda da função **bimE** é responsável pelo fenótipo.

Quando as células são bloqueadas nas fases S ou G2 por drogas ou mutações condicionais, geralmente elas são impedidas de entrar em mitose por mecanismos regulatórios desconhecidos. Entretanto, quando contém **bimE7**, as células bloqueadas em intérfase ainda sofrem condensação cromossômica e formação de fuso na temperatura restritiva. Desta forma, a perda da função **bimE** determina que as células superem as restrições que normalmente asseguram a conclusão da intérfase antes do início da mitose. Desde que o produto da transcrição de **bimE** parece não variar ao longo do ciclo celular, ENGLE et alii (1990) supõem que mudanças na função **bimE** ou se devem à regulação traducional ou são efetuadas por modificações pós-transcricionais ou ainda, pela ligação de uma proteína de baixo peso molecular. Com base neste conjunto de informações os autores supõem que o produto do gene **bimE**

atue na regulação do ciclo celular, agindo como um regulador negativo da mitose.

Segundo MURRAY & KIRSCHNER (1991), a identificação de formas mutantes de leveduras que estacionam em pontos específicos do ciclo celular permitiu o estudo de genes cujos produtos são críticos à superação do ponto de interrupção. Estes genes cruciais são conhecidos coletivamente como genes *cdc* (cell-division cycle gene). As proteínas codificadas por estes genes têm sido identificadas como enzimas quinases, as quais transferem grupos fosfatos do ATP, um dos principais condutores de energia, para proteínas. A adição e remoção de fosfatos é um dos principais métodos de regulação da atividade das proteínas celulares. A remoção destes é efetuada por fosfatases.

Os reguladores do ciclo celular identificados em ovos de sapos e leveduras (*cdc* 2, ciclina e seus moduladores, tais como *cdc* 25) parecem ser os reguladores básicos do ciclo celular em todas as células eucarióticas. Inclusive, já se identificou duas classes, uma que regula a entrada na mitose e meiose e outra, estruturalmente semelhante, que regula a duplicação do DNA. Estes sistemas de regulação devem evitar a entrada na mitose ou na meiose até que os cromossomos tenham sido duplicados a fim de evitar que sejam formadas células com deficiência de algum

cromossomo, uma aberração que pode levar a célula à morte ou eventualmente provocar câncer. (MURRAY & KIRSCHNER, 1991).

Em seu trabalho sobre as respostas genéticas e fisiológicas das bactérias ao stress osmótico, CZONKA (1989) assume algumas definições cuja reprodução é útil à compressão do tema em questão. Desta forma, stress osmótico é definido como a elevação ou o decréscimo na intensidade osmótica do ambiente de um organismo. Já a regulação osmótica ou osmorregulação é compreendida como um processo ativo conduzido por organismos vivos para lutar contra stress osmótico.

Tais mecanismos se fazem necessários uma vez que, conforme ressaltado por GILKEY & STAHEHLIM (1989) a maioria das células devem controlar a concentração celular efetiva de solutos dentro de limites estreitos de modo a preservar um ambiente ótimo para as atividades metabólicas e para manter o volume celular.

Mutações osmorremediáveis por sua vez, definem-se no contexto de relações organismo-meio externo. Existem vários exemplos de proteínas mutantes cujas estruturas são anormalmente sensíveis à composição do citoplasma, a qual é em parte, determinada pela osmolaridade externa. Tais proteínas mutantes não são funcionais quando as células são cultivadas em meio de

baixa osmolaridade (baixa pressão osmótica) mas recuperam ao menos parcialmente sua atividade quando as células são cultivadas em meio de elevada osmolaridade .

As mutações resultantes neste fenótipo têm sido designadas como osmorremediáveis.

O fenótipo osmorremediável está associado a pequenas alterações na sequência de amino-ácidos das proteínas afetadas. CZONKA (1989) também observa que muitas mutações temperatura-sensíveis são também osmorremediáveis.

Segundo este autor a explicação mais plausível para o fenótipo osmorremediável seria que a elevação na concentração de um ou mais dos solutos compatíveis determinada pela osmolaridade externa elevada, aumenta a estabilidade de proteínas mutantes. Entretanto, não está claro se as diferenças na resposta "in vivo" dos mutantes osmorremediáveis a diferentes solutos são devidas a diferenças maiores na composição de solutos compatíveis obtidos a partir dos osmólitos externos específicos, ou se o fenótipo osmorremediável é o resultado de sutis mudanças na concentração de alguns metabólitos que deveriam ser retirados diferencialmente dos vários solutos extracelulares.

Inicialmente pensou-se que o fenótipo osmorremediável seria uma indicação de um defeito nas proteínas associadas às membranas. Entretanto, este não é

necessariamente o caso porque mutações osmorremediáveis que afetam várias enzimas solúveis têm sido identificadas. (CZONKA, 1989).

Por solutos compatíveis este autor assume moléculas que são acumuladas durante condições de estresse osmótico e não determinam inibições muito grandes nos processos celulares.

Como exemplo de solutos compatíveis CZONKA (1989) cita K^+ (potássio), glutamato (amino-ácido), glutamina, prolina, β -aminobutirato e alanina (uma amina glicina - betaína quaternária) e outros derivativos de amino-ácidos N-metilados, além dos açúcares trealose (α -D-glucopirano-sil- α -D-glucopiranosídeo) e glucosil-glicerol.

Tais solutos são acumulados em altas concentrações intracelulares e são incapazes de atravessar a membrana das células rapidamente sem a ajuda de um sistema de transporte. A maior parte desses solutos, não conduz corrente elétrica em pH próximo a 7. Este fato evita distúrbios às estruturas de macromoléculas celulares, mesmo se os solutos forem acumulados em grande quantidade, exceto no caso de stress hiperosmótico. Por isso K^+ e glutamato também são osmoprotetores. Alguns destes, auxiliam o crescimento celular quando adicionados à cultura (já sob alta osmolaridade) outros não o fazem. Os que permitem a superação da inibição osmótica são chamados osmoprotetores.

Quanto à influência da osmolaridade sobre a transcrição gênica CLARK & PARKER (1984) concluíram que existem poucos genes cuja transcrição é osmoticamente regulada. Estes autores conduziram uma análise eletroforética bidimensional sobre o efeito da osmolaridade do meio de crescimento sobre a composição da *E. coli*. Eles encontraram que somente 3 proteínas foram sintetizadas preferencialmente em taxas maiores em resposta ao choque hiperosmótico e nenhuma foi sintetizada em taxas com elevação detectada quando as células foram expostas ao choque hipo-osmótico.

Existem trabalhos sobre osmorregulação que indicam a prolina exógena como agente capaz de aliviar a inibição do crescimento imposto por estresse osmótico. Inclusive, bactérias podem acumular prolina em altas concentrações intra-celulares pela elevação da rede de síntese ou pelo aumento do transporte do meio.

Como visto, mutantes osmoticamente sensíveis somente se desenvolvem sob condições específicas de osmolaridade. KOPECKA et alii (1991) estudaram mutantes de *S. cerevisiae* cuja sensibilidade deve-se a mutações em genes cujas funções normais são desconhecidas. A razão para a sensibilidade osmótica dos mutantes tem sido procurada nas diferenças de qualidade e quantidade dos polímeros da parede quando comparadas às linhagens parentais. Neste

trabalho evidenciou-se que nas células osmoticamente sensíveis de *S. cerevisiae* (VY1160 e 139 srb1) a fragilidade verificada em suas paredes pode ser atribuída a uma deficiência geneticamente codificada na estrutura da parede. As células VY 1160 por exemplo, apresentaram uma redução de 2 vezes na quantidade de manana, quando submetidas à análise de manoproteínas, isto se devendo a uma redução significativa na porção polissacarídica do complexo de manoproteínas e considerável redução no tamanho de suas cadeias.

MUNRO et alii (1989) estudaram o efeito das condições osmóticas do meio em coliformes e patógenos entéricos. Estes organismos apresentam a característica de sofrerem alterações morfológicas e fisiológicas quando privados de alimentos, modificando-se então, rapidamente, para estágios viáveis mas não cultiváveis. Entretanto, a capacidade de crescimento destas bactérias continua a depender necessariamente da possibilidade de se manter a pressão osmótica citoplasmática em um ponto maior que o do ambiente.

Estes autores reuniram argumentos que estabelecem a capacidade de sobrevivência na água do mar enquanto fator dependente de processos regulatórios induzidos por sais, os quais possivelmente envolvem a acumulação de componentes orgânicos ou inorgânicos. Em

resposta ao estresse osmótico e a um decréscimo na pressão de turgor, as células de *E. coli* acumulam transitoriamente ions potássio e ativam sistemas para o transporte e síntese de vários osmólitos orgânicos compatíveis com seu metabolismo, os quais impedem a desidratação das células e estabilizam a atividade enzimática em soluções de alto poder iônico. Desta forma, podem ser produzidos altos ou baixos índices de tolerância osmótica pela síntese de trealose e transporte ou síntese de betainas e outras aminas.

O trabalho de MUNRO et alii (1989) desenvolveu-se portanto no sentido de estudar a sobrevivência de *E. coli* em água do mar, não apenas em termos de nutrientes, o que é feito tradicionalmente, mas em termos da influência dos mecanismos osmorreguladores. Assume-se, portanto, que a sobrevivência destes microrganismos poderia também depender de sua capacidade para superar os efeitos do estresse osmótico. Para tanto foram estudados mutantes que perderam componentes da resposta ao estresse osmótico, como por exemplo o transporte de potássio ou transporte e a acumulação de osmólitos orgânicos.

Seus resultados mostraram que a sobrevivência de *E. coli* em água do mar depende ao menos em parte da presença de gens que regulam a pressão osmótica, bem como

da possibilidade de se estimular previamente os genes envolvidos na osmorregulação antes da liberação das células na água do mar. Observou-se também que a expressão destes genes requer a presença dos substratos necessários aos correspondentes produtos gênicos.

Portanto, os processos que permitem a adaptação à escassez de nutrientes, e, conseqüentemente, a sobrevivência, também dependem da manutenção da integridade osmótica, a qual é essencial para a preservação da omeostase da célula. Em outras palavras, a adaptação de bactérias entéricas à água do mar depende de como elas alcançam um nível efetivo de osmorregulação, anterior à privação de nutrientes, tornando-se este um fator de extrema relevância quanto à possibilidade de sobrevivência destas bactérias (MUNRO et alii, 1989).

Um estudo que associa o estresse fisiológico às condições osmóticas foi desenvolvido com protoplastos de folhas de *Solanum eutuberosum*, *Populus alba* x *P. grandidentata* cv. crandon e *Betula platyphylba szechuanica*. SMITH et alii (1989), testaram vários agentes osmóticos (manitol, CaCl_2 , sucrose, KCl , $\text{KCl}.\text{CaCl}_2$) obtendo plasmólise das células doadoras (no tecido foliar) em concentrações que variaram de 500 a 800 mol/Kg. Estes autores concluíram que o estresse ocorrido durante o isolamento enzimático de protoplastos, embora não seja

detectável por sinais vitais, pode ser previsto pelo estudo da plasmólise do tecido doador. A inclusão de estabilizadores osmóticos constituídos por moléculas menores (CaCl_2 e KCl) que aquelas dos estabilizadores elaborados com açúcares teve como objetivo assegurar a penetração através da parede celular. Também foram empregadas soluções contendo potássio, visando auxiliar a liberação de aderências mais firmemente estabelecidas do plasmalema à parede celular.

Estudando o efeito de diferentes níveis de estresse osmótico sobre a morfologia da membrana plasmática em embriões de *Pelvetia*, GILKEY & STAEHELIN (1989) empregaram técnicas de congelamento ultra-rápido associado à microscopia eletrônica de criofraturas (freeze-fracture), cujas fotografias demonstraram a existência de um conjunto de vesículas planas em forma de disco no citoplasma cortical, as quais parecem sofrer fusões transitórias com a membrana plasmática. Verificou-se que o número de vesículas conectadas à membrana plasmática é uma função da osmolaridade do citoplasma ou seja, depende da diferença de osmolaridade entre o meio externo e o citoplasma.

Estes autores propuseram que estas vesículas poderiam integrar os mecanismos de osmorregulação porque o número de vesículas planas que sofrem fusão com a membrana plasmática altera-se rapidamente em resposta a súbitas

alterações na osmolaridade do meio que contém as células estudadas, caracterizando-se a ligação destas à membrana plasmática como um fenômeno reversível.

Estas vesículas parecem cercar um espaço aquoso livre de solutos, estando presentes em maior quantidade em regiões imediatas à membrana plasmática.

A densidade de conexões entre as vesículas e a membrana celular nas células expostas a um decréscimo súbito de 5% na osmolaridade, é 38% maior que no controle. Quando o decréscimo de osmolaridade é de 20% a densidade de conexão eleva-se a 75% e os autores propõem que a eficácia deste evento quanto à regulação osmótica deve ser atribuída à inserção reversível de canais de cloro na membrana plasmática através da fusão destas vesículas.

O mecanismo que determina a fusão destas vesículas estaria associado à identificação do estresse por desbalanço hipotônico entre as concentrações externas e interna de componentes osmoticamente ativos. A taxa constante destas vesículas planas que sofreriam fusão à membrana plasmática poderia por exemplo ser determinada pela taxa de influxo de cálcio e desta forma, indiretamente, da osmolaridade externa em relação à interna, como foi observado.

2.2. PROTOPLASTIZAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DA MEMBRANA PLASMÁTICA E DA PAREDE CELULAR

A membrana celular atua como a principal barreira osmótica da célula em relação ao meio. Isto porque, auxiliada por sistemas de permeases exerce durante o ciclo de vida uma função de permeabilidade seletiva da qual depende a vida da célula, mantendo um ambiente intracelular favorável (VILLANUEVA & GARCIA-ACHA, 1971). Inclusive, a existência de enzimas hidrolíticas externas em microrganismos deve ser atribuída à impermeabilidade da membrana celular a seus respectivos substratos (VAINSTEIN & PEBERDY, 1991).

QUINN et alii (1989), destacam que a função e a estabilidade da membrana dependem em grande parte dos resíduos graxos insaturados acil, de tal forma que quantidades consideráveis de energia metabólica das células é dedicada à inserção de duplas ligações nos lipídios das membranas, além de existirem mecanismos que protegem os lipídios insaturados da degradação.

Os lipídios polares são um dos principais componentes das membranas biológicas constituindo-se numa matriz para a união e suporte dos vários componentes proteicos. Desta forma a estrutura da membrana depende em grande parte do estado físico dos lipídios.

A presença de duplas ligações insaturadas em CIS nos ácidos graxos resulta em grande redução no ponto de fusão e determina um empacotamento molecular tal que estabelece um leve aumento na área de secção transversal da cadeia de hidrocarbonetos. Sendo assim, a maioria dos tipos de moléculas de lipídios com tais características formam uma fase lamelar cristalina-líquida dentro dos limites de temperatura na qual os organismos que os contém crescem normalmente.

A explicação para o efeito das duplas ligações em CIS nas cadeias de lipídios acil reside em seu efeito sobre a rotação das cadeias e a capacidade das cadeias em se estruturarem em blocos ordenados.

O movimento das cadeias de hidrocarbonetos no estado cristalino-líquido é conhecido por ser impedido pela interação com moléculas hidrofóbicas rígidas tais como segmentos helicoidais de proteínas transmembranas intrínsecas e esteróis tais como o colesterol.

Por causa da relativa constância dos tipos moleculares de lipídios nas membranas biológicas, mecanismos homeostáticos bioquímicos devem operar nas células para preservar a composição dos ácidos graxos dos lipídios das membranas dentro de limites relativamente estreitos.

Em relação à secreção de proteínas WICKNER (1989) ressalta que o trânsito de membrana requer energia, tal como a fornecida por fosfatos altamente energéticos e em alguns casos também é necessário um potencial eletroquímico. Este processo de transporte requer (A) proteínas citoplasmáticas acompanhantes ("chaperones"), (B) sistemas receptores ligados à membrana, os quais associam a hidrólise do ATP à translocação das proteínas, e, (C) peptidases líderes ("leader") para clivar proteínas que tenham atravessado a membrana.

WICKNER (1989) sugere ainda que as proteínas citoplasmáticas dobram-se rapidamente para internalizar seus resíduos apolares enquanto proteínas de membranas e proteínas secretadas não podem dobrar-se desta maneira. Estes domínios apolares e especialmente sua seqüência líder ("leader") apolar, permanecem sobre a superfície da proteína, mas são protegidas por proteínas acompanhantes "chaperones" especiais para prevenir a agregação.

Entretanto, segundo esse autor, ainda é uma questão aberta se as proteínas cruzam a membrana através de um poro ou através dos lipídios.

Supõe-se que as proteínas devam permanecer não dobradas para permitir o trânsito na membrana. Entretanto o termo "não-dobrada" tem sido usado imprecisamente porque não há nenhuma evidência para o estado não-dobrado. De

fato, proteínas verdadeiramente não-dobradas assumem uma estrutura secundária e terciária em questão de milisegundos a poucos segundos após a remoção do denaturante enquanto a síntese protéica e a reunião na membrana levam um período de tempo que varia de segundos a minutos. Por outro lado, precursores protéicos podem dobrar-se espontaneamente atingindo um estado competente para reunião à membrana e sua conformação pode ser estabilizada pelas proteínas solúveis acompanhantes ("chaperones").

Quanto às principais evidências sobre a função da seqüência líder ("leader"), WINCKNER (1989) acrescenta que estas se limitam à sua característica básica e hidrofóbica.

Em relação às alterações da membrana sob efeito do meio de crescimento, observou-se em vários organismos alterações fenotípicas (ao nível de membranas) em função da sub-alimentação.

SMIGIELSKI et alii (1989) observaram mudanças nas membranas respiratórias da bactéria marinha *Vibrio fluvialis*, as quais pareceram estar associadas ao conjunto de respostas desses organismos à fome por curto período de tempo. Nestas bactérias observou-se também o desenvolvimento de "células-anãs" o que pode ter sido relevante para a sobrevivência sob condições de pouca alimentação, sendo esta miniaturização caracterizada por um

aumento na taxa superfície-volume de modo a auxiliar a absorção de nutrientes em um ambiente pobre.

Estes estudos foram conduzidos mediante o emprego de agentes químicos marcados radioativamente. Assim, os autores verificaram que houve uma redução de 3 a 4 vezes nas atividades específicas de NADH oxidase, NADH desidrogenase e oxidase succínica nas células submetidas à privação de nutrientes por 24 horas se comparadas às células em crescimento (de -243 mV a -221 mV, respectivamente) em função de maior alcalinidade do meio interno (pH 8,5) das bactérias submetidas à privação de nutrientes em relação às bactérias em crescimento (pH 8,0). O nível de todos os quatro nucleosídeos-trifosfato caiu rapidamente durante o período de privação de nutrientes. Também observou-se a síntese de proteínas que normalmente não ocorrem nas células em crescimento: quatro peptídios foram identificados apenas nas membranas das células-anãs. Por outro lado, a concentração de vários peptídios comuns a ambos os grupos de bactérias foi menor nas membranas das células submetidas à privação de nutrientes que nas bactérias em crescimento.

Tal conjunto de alterações parece relacionar-se não só à capacidade de sobrevivência sob condições de privação de nutrientes como também à pronta recuperação do crescimento tão logo alterem-se as condições do meio

mediante a introdução de uma fonte de carbono. A reserva de energia (PMF) provavelmente é requerida para manutenção e talvez para a diferenciação para o estado "anão" (SMIGIELSKI, et alii, 1989). Quanto às novas proteínas observadas, estes autores sugerem que estejam envolvidas na alteração da estrutura ou função da membrana para elevar as chances de sobrevivência durante a privação de nutrientes, por exemplo pela redução da permeabilidade da membrana aos prótons.

Em seu trabalho com mutantes osmoticamente sensíveis de *S. cerevesiae*, KOPECKA et alii (1991) referem-se à parede celular enquanto um componente essencial das células de leveduras, o qual, por sua rigidez determina a forma da célula, capacita a divisão celular e previne a lise do compartimento interior (citoplasmático) em um meio hipotônico. A parede celular constitui-se portanto num fator de proteção à célula e sua estrutura. Cabe acrescentar que esta apresenta uma camada externa densa, com espessura em torno de $0,05\mu$ e uma camada menos densa, contendo aproximadamente $0,3\mu$. A porção interior da parede celular pode também ser subdividida em 3 camadas. A parede celular é composta de polímeros de glicose e manose e mais raramente de galactose, com quantidades menores de proteína, lipídio e quitina (VILLANUEVA & GARCIA-ACHA, 1971).

Quanto à localização, esta situa-se no periplasma, região da célula externa ao plasmalema, incluindo a parede celular e proteínas não ligadas (NOBEL et alii, 1991) e sua estrutura (e porosidade) estão em constante mudança.

A porção da parede celular dos fungos que está em crescimento parece ser altamente plástica e estender-se por causa da pressão hidrostática em seu interior (meio intracelular). Este processo de extensão permite a inserção de material novo à parede. Desde que a extensão da parede celular resulta em elevação da porosidade, as regiões das células que se encontram em crescimento deveriam ter mais poros que as regiões que não estão em crescimento e de fato, células em crescimento rápido têm porosidade mais elevada que células em crescimento lento, as quais por sua vez, apresentam maior porosidade em sua parede que células que não estão crescendo (NOBEL et alii, 1991).

Desta forma, ainda segundo estes autores, a porosidade de *S. cerevisiae* cresce exponencialmente, decrescendo acentuadamente quando as células estão na fase estacionária. O decréscimo na porosidade é acompanhado pela mudança na composição da parede celular. Por outro lado, as condições fisiológicas da célula são críticas em seu efeito sobre a porosidade das paredes.

O fato de uma proteína alojar-se no espaço periplasmático ou difundir-se no meio de cultura depende parcialmente de seu tamanho. A secreção no meio também pode-se dever à elevação de porosidade da parede celular e a liberação também é maior se a parede celular é altamente desorganizada. Algumas proteínas menores permanecem ligadas às células porque a secreção de várias proteínas depende entre outras coisas da composição do meio e da fase de crescimento, a qual, conforme citado acima, também afeta a porosidade da parede. Entretanto, como regra geral, quanto maior uma molécula mais lentamente irá difundir-se através da parede. Como os maiores poros existem em menor número a liberação destas no meio ocorre através de uma via radial preferencial, pela parede.

Em relação ao tamanho das proteínas cabe acrescentar que componentes assimétricos submetidos à filtração por gel tornaram-se semelhantes às moléculas maiores, em maior grau que os componentes globulares de mesma massa molecular. Portanto o raio hidrodinâmico de moléculas secretadas é mais importante em relação à porosidade da parede que a massa molecular. Entretanto, outras características importantes são a carga e a glicosilação de proteína, a qual por sua vez pode estar

relacionada à sua retenção na parede celular. A liberação de proteínas também parece ser afetada pela seqüência final.

O decréscimo na glicosilação das manoproteínas da parede celular eleva a porosidade porque a glicosilação aumenta o tamanho da proteína e portanto diminui a eficiência de secreção para o meio, afetando a porosidade apenas de maneira indireta.

No trabalho de NOBEL et alii (1991) consta que glucanas que determinam rigidez à parede celular de leveduras são protegidas de lise enzimática pelo revestimento de manoproteínas, desta forma a lise celular induzida por glucanase pode ser usada como medida da porosidade da parede.

Cabe acrescentar também que a parede celular exerce uma função permutadora de ions (regulação do ambiente iônico externo à membrana), de tal forma que o ponto isoelétrico de uma proteína e o pH do meio também devem ser fatores críticos para a passagem de uma proteína pela parede celular, influenciando conjuntamente com outros fatores tais como sua massa molecular, forma ou carga elétrica.

Segundo VILLANUEVA & GARCIA-ACHA (1971) protoplastos podem ser definidos como uma estrutura derivada de células vegetativas pela remoção total da

parede celular, ou alternativamente como a parte da célula que permanece dentro da parede celular e que, em alguns organismos pode ser plasmolisada longe dela.

Entretanto, a sensibilidade osmótica sozinha parece ser um critério insuficiente, porque o rompimento da membrana citoplasmática ocorre igualmente após a separação parcial da parede celular. Sendo assim, estes autores assumem como critério para ausência de parede os seguintes parâmetros: fragilidade osmótica, perda de rigidez, resultando em uma forma esférica e observação sobre a liberação dos protoplastos através de poro deixado na parede celular vazia.

As paredes das hifas de vários fungos por sua vez, variam em sua susceptibilidade ao ataque enzimático, embora muito freqüentemente as extremidades de crescimento tenham se mostrado mais susceptíveis a este ataque, de tal forma que a liberação de protoplastos freqüentemente ocorre de modo preferencial nestas extremidades. Sendo assim, concluiu-se que a liberação de protoplastos ocorre somente em células jovens e em divisão ativa e somente em local polar.

Em relação à digestão da parede celular para obtenção de protoplastos PEBERDY et alii (1985) ressaltam que, tendo-se o tempo ótimo de digestão, este é mais facilmente reproduzido pelo acompanhamento da sensibilidade

osmótica do protoplasto por espectrofotometria durante os passos da digestão, pela diluição de aliquotas do material em água, medindo-se então o decréscimo da densidade óptica a 600 nm.

Segundo VILLANUEVA & GARCIA-ACHA (1971) o conteúdo total de um compartimento de hifa geralmente forma um único protoplasto. Os protoplastos assim obtidos apresentam grande estabilidade e retêm sua morfologia externa por vários dias quando deixados sob condição estabilizadas (mas lisam-se quando colocados em água destilada) e as condições de incubação parecem ser bastante afetadas pela natureza das substâncias utilizadas para esta estabilização. Isto ocorre porque não sendo protegidos pela parede celular os protoplastos são osmoticamente sensíveis e devem ser estabilizados por soluções de carboidratos e sais ou seja, devido à perda da proteção externa os protoplastos lisarão imediatamente durante o processo de liberação da célula-mãe a menos que a concentração osmótica seja ajustada.

VILLANUEVA & GARCIA-ACHA (1971) ressaltam que o soluto empregado para tanto não deve ser capaz de penetrar a barreira osmótica do protoplasto em uma taxa elevada, a fim de protegê-lo de lise. Geralmente os agentes estabilizadores são adicionados a uma solução tampão em pH variando entre 5,8 e 6,8 e os agentes estabilizadores

preferidos vêm sendo manitol, ramnose, sorbitol, dentre os açúcares e cloreto de potássio e sulfato de magnésio entre os sais.

Estes autores também lembram que a concentração de solutos usada como estabilizador varia amplamente, podendo este fenômeno estar correlacionado em alguma extensão com diferenças na pressão osmótica interna entre as diferentes espécies. De qualquer forma, sem estabilizadores osmóticos nenhum protoplasto (intacto) foi liberado, verificando-se ao contrário a liberação de massas amorfas de protoplastos.

A permeabilidade de protoplastos de fungos, por sua vez, parece ser semelhante à de células intactas o que reforça as constatações de que a membrana celular age como uma barreira através da qual alguns açúcares e outros componentes não têm passagem livre (VILLANUEVA & GARCIA-ACHA, 1971). Segundo estes autores a eficiência da membrana, como barreira possivelmente depende do fungo em questão.

Também acrescentam que os protoplastos de fungos parecem conservar todas as propriedades das células intactas das quais elas são derivadas, incluindo a capacidade de fazer nova parede celular.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Proceder a estudos genéticos clássicos e moleculares com linhagens de *Aspergillus nidulans* normais e revertentes visando ampliar a compreensão dos fenômenos de instabilidade mitótica relacionados à origem dos variantes deteriorados e sua expressão fenotípica. Para tanto pretende-se desenvolver as seguintes etapas:

A. Obtenção de mutantes revertentes (com fenótipo normal) a partir de uma linhagem portadora de determinante de deterioração (Vs, de *Aspergillus nidulans*);

B. Obtenção de segregantes de cruzamento entre linhagens normais; normal e deteriorada; revertente e normal; por procedimentos clássicos (sexual e parassexual) e por fusão de protoplastos;

C. Proceder à análise genética destes segregantes;

D. Proceder à eletroforese de enzimas de segregantes e parentais;

E. Alterar componentes do meio de cultura de segregantes e parentais, verificando alterações fenotípicas;

F. Relacionar as informações obtidas aos fenômenos de instabilidade mitótica e fenocópia, buscando elucidá-los.

3.2. Objetivos Específicos

Pretende-se compreender porque a estabilidade osmótica do meio de cultura determina a fenocópia de variantes normais em variantes deteriorados, bem como caracterizar as reversões genotípicas obtidas durante o desenvolvimento do presente trabalho.

4. CARACTERIZAÇÃO DAS HIPÓTESES DE PESQUISA

4.1. Síntese do Problema

A instabilidade mitótica em fungos filamentosos, qual seja, a ocorrência de alterações fenotípicas verificadas no processo de multiplicação de células somáticas (portanto sem envolvimento de recombinação genética por meio de cruzamentos) vem sendo estudada em linhagens de *Aspergillus nidulans* portadoras de duplicações cromossômicas.

Tais linhagens originam setores portadores de determinantes de deterioração que lhes conferem fenótipo característico (deteriorado).

Este fenótipo é passível de correção por condições ambientais. Submetendo-se linhagens portadoras de determinantes de deterioração a meio de cultura contendo estabilizador osmótico, estas apresentam fenótipo normal (por ex: coloração verde ou amarela).

O estudo deste fato (fenocópia), associado à análise de mutantes revertentes (genotipicamente normais) pode elucidar aspectos relevantes na compreensão do fenômeno de instabilidade mitótica em fungos filamentosos.

Torna-se importante, então, compreender de que modo a estabilidade osmótica do meio de cultura permite o desenvolvimento do fenótipo normal em linhagens de *A. nidulans* portadoras de determinantes de deterioração; bem como, identificar quais componentes e produtos do metabolismo celular estão envolvidos na ocorrência da fenocópia.

Por outro lado, a análise genética envolvendo linhagens revertentes, inclusive por meio de fusão de protoplastos (de linhagens normais e deterioradas), permite estudos visando a localização do determinante de deterioração, bem como estudos mais completos de sua expressão fenotípica.

Pode-se utilizar também, técnicas de eletroforese que permitem a comparação entre "conteúdos" e entre a distribuição do DNA nos organismos estudados (estudos do genótipo) e de enzimas produzidas por tais organismos (estudo do fenótipo).

Sabe-se que o fenótipo que se observa é determinado pela interação do genótipo e do ambiente:

$$F = G + A$$

ou seja:

G e A = variáveis independentes, com pesos variáveis em função do tipo de caráter considerado (se apresenta maior ou menor herdabilidade; se é qualitativo ou quantitativo). Respectivamente genótipo (G) e ambiente (A).

F = variável dependente, fenótipo.

Introduzindo-se alterações específicas e controladas nestas variáveis (condições experimentais distintas) pode-se obter outros esquemas de relações, que permitem o estudo do problema proposto, ou seja, a verificação das hipóteses formuladas.

Uma primeira hipótese relaciona as variáveis genótipo, fenótipo e condições ambientais (dois aspectos destas):

H₁ - O fenótipo deteriorado ocorre em função de uma deficiência alimentar (na capacidade de captar nutrientes do meio) verificando-se o seguinte esquema de relações entre variáveis:

(variável contextual: condições osmóticas do meio de cultura de cada linhagem)

Por exemplo: espera-se que variando os nutrientes em meio osmoticamente equilibrado (diminuindo a quantidade ou retirando nutrientes essenciais) as linhagens deterioradas e as normais apresentarão fenótipo deteriorado.

Em meio de cultura não estabilizado osmoticamente apenas as linhagens normais poderão vir a apresentar fenótipo normal. Ou seja, alterando-se a composição do meio de cultura, verificar se deixa de ocorrer reparo de fenótipo deteriorado (em quais alterações, qual nutriente está envolvido).

A segunda hipótese relaciona o genótipo e o fenótipo controlando as condições ambientais:

H₂ - Reversões por fenocópia ocorrem por uma simulação ambiental de condições geneticamente determinadas em mutantes onde se verifica reversão genética.

Condições ambientais - padronizadas e constantes, podendo-se introduzir a variável contextual "estabilidade osmótica do meio de cultura", para efeito de controle maior sobre os dados obtidos.

Por exemplo: esta hipótese supõe determinação genética da capacidade de absorção de nutrientes do meio (supõe que em linhagens deterioradas, haja determinantes genéticos de deterioração).

O estudo de segregantes do cruzamento entre linhagens normais e deterioradas permite a obtenção de várias combinações gênicas e várias expressões fenotípicas, podendo-se chegar à caracterização e localização do gene determinante de deterioração (por análise genética).

Também a fusão de protoplastos entre linhagens diferentes (ex: revertentes e normais e/ou revertentes e deteriorados, etc.) permite, através de subsequente análise genética, a localização do elemento genético e o esclarecimento de sua função relacionada ao fenótipo deteriorado.

Estes aspectos também podem ser estudados utilizando-se outros indicadores, buscando-se testar a terceira hipótese (mantendo o modelo de relações entre variáveis anteriormente apresentado):

H₃ - O segmento duplicado presente na linhagem A, de fenótipo normal, determina geneticamente o fenótipo deteriorado, quando ocorrem eventos de translocação (explicando - ou demonstrando - eventos de instabilidade mitótica, verificados neste tipo de linhagem).

Ex: Leitura de padrões eletroforéticos que permite a comparação do DNA de diferentes linhagens e de enzimas (fenótipo).

No caso do DNA, compara-se a distribuição do genoma relacionando-o ao fenótipo - normal ou deteriorado - observado nas linhagens estudadas.

No caso de se observar padrões de enzimas de linhagens normais, revertentes genéticas, deteriorados crescidos em meio de cultura padrão e deteriorados crescidos em meio de cultura osmoticamente equilibrado (o qual pode

ser incluído como variável contextual para todos os padrões citados neste parágrafo) as alterações fenotípicas verificadas podem auxiliar na identificação, ao nível metabólico, de qual aspecto do metabolismo é influenciado por mudanças ambientais no evento de fenocópia.

Em termos analíticos temos:

- unidade de análise: fungo ***Aspergillus nidulans***
- atributos deste que podem variar (variáveis): genótipo, fenótipo, nutrientes do meio de cultura, estabilidade osmótica do meio de cultura.

Podendo ser representado da seguinte maneira:

X_1 e X_2 - variáveis independentes

Y - variável dependente

C - variável contextual

RELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS. (QUADRO SINÓTICO)

PRINCIPAIS VARIÁVEIS ANALÍTICAS	DEFINIÇÃO CONCEITUAL	RELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS	INDICADOR	VARIACAO
GENÓTIPO (DO FUNGO <i>A. nidulans</i>)	REFERE-SE A INFORMAÇÃO GENÉTICA DE CADA LINHAGEM, QUE A CARACTERIZA E DISTINGUE ENTRE AS DEMAIS LINHAGENS E ORGANISMOS VIVOS. DISTRIBUIÇÃO DO DNA : ORGANIZAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA, POR CROMOSSOMO. CONTEÚDO DE DNA : A PRÓPRIA INFORMAÇÃO GENÉTICA CARACTERÍSTICA DE CADA LINHAGEM.	INDEPENDENTE	. DNA TOTAL DE CADA LINHAGEM DE <i>A. nidulans</i> . CADA COLÔNIA SEGREGANTE DE CRUZAMENTOS ENTRE LINHAGENS DE <i>A. nidulans</i>	. PADRÃO ELETROFORÉTICO DE CADA LINHAGEM. . PROTOTIPO/ AUTO-TIPIA PARA CADA LÓCUS ANALISADO.
FENÓTIPO (DO FUNGO <i>A. nidulans</i>)	O FENÓTIPO DE UMA LINHAGEM (E DE QUALQUER ORGANISMO VIVO) É O RESULTADO DA INTERAÇÃO ENTRE SEU GENÓTIPO E O AMBIENTE,PODENDO VARIAR NUM ORGANISMO EM FUNÇÃO DESTE ÚLTIMO.	DEPENDENTE	. CADA COLÔNIA SEGREGANTE DE CRUZAMENTOS ENTRE LINHAGENS DE <i>A. nidulans</i> . CADA TIPO DE ENZIMA ANALISADA DE CADA LINHAGEM ESTUDADA (ELETROFORESE)	. PADRÕES MORFOLÓGICOS . PADRÕES ELETROFORÉTICOS DAS ENZIMAS DE CADA LINHAGEM.
ESTABILIDADE OSMÓTICA DO MEIO DE CULTURA (DO FUNGO <i>A. nidulans</i>)	CONDIÇÕES DE PRESSÃO DE SUÇÃO DE ÁGUA EQUILIBRADA ENTRE O MEIO EXTERNO E O INTRACELULAR.	CONTEXTUAL	. CADA COLÔNIA ESPECÍFICA DE <i>A. nidulans</i>	. FENÓTIPOS DAS LINHAGENS ESTUDADAS DE <i>A. nidulans</i>
NUTRIENTES DO MEIO DE CULTURA (DO FUNGO <i>A. nidulans</i>)	ELEMENTOS QUÍMICOS NECESSÁRIOS AO CRESCIMENTO DO FUNGO <i>A. nidulans</i> NITRATO DE SÓDIO, CLORETO DE POTÁSSIO, FOSFATO DE POTÁSSIO, SULFATO DE MAGNÉSIO, GLUCOSE OU DEXTROSE PEPTONA, EXTRATO DE LEVEDURA CASEÍNA HIDROLISADA, pH 6.8 .	INDEPENDENTE	. CADA ENSAIO ESPECÍFICO.	. PREPARAÇÕES ESPECÍFICAS.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Linhagens

As linhagens de *Aspergillus nidulans* utilizadas no presente trabalho, todas derivadas dos estoques da Universidade de Glasgow (Escócia) foram as seguintes:

- Linhagem A (NGA & ROPER, 1968): possui uma duplicação de parte do grupo de ligação I translocada para o grupo de ligação II, sendo deficiente nutricional para prolina e ácido para-aminobenzóico (proA₁; pabaA₆). (Figuras 1 e 6).

- Linhagem Master Strain E (MSE) (McCULLY & FORBES, 1965) com marcadores genéticos nos oito grupos de ligação (Figura 2). Quais sejam:

CROMOSSOMO I: suA₁adE₂₀ yA₂ adE₂₀

CROMOSSOMO II: wA₃ (conídios brancos)

CROMOSSOMO III: galA₁

CROMOSSOMO IV: pyroA₄

CROMOSSOMO V: facA₃₀₃

CROMOSSOMO VI: sB₃

CROMOSSOMO VII: nicB₈

CROMOSSOMO VIII: riboB₂

Além destas foram utilizadas:

- **Linhagem V₅**: Variante deteriorado derivado da linhagem A, acima descrita (AZEVEDO & ROPER, 1970). (Figura 6).

- **Linhagens V97, V98, V98.1, V99 e V100**, derivadas da linhagem A, acima descrita (MOLINA & AZEVEDO, 1989).

- **Linhagens C₁₀; C₁₂ e G[#]; G[#].1**; mutantes revertentes obtidos a partir da linhagem V₅ acima descrita, em ensaio de irradiação com luz ultra-violeta, obtidos e caracterizadas no presente trabalho.

- **Linhagem HV94**: segregante haplóide isolado do heterocário formado a partir da fusão de protoplastos entre as linhagens V94 e MSE, com marcas auxotróficas da linhagem MSE mas morfologia deteriorado (MONTEIRO, 1989). (Figura 6).

- **Linhagens diplóides**: Provenientes do heterocário estabelecido entre as linhagens MSE ou HV94 e cada uma das outras linhagens aqui relacionadas, obtidas e caracterizadas no presente trabalho.

Obs: As linhagens revertentes obtidas no presente trabalho, receberam, ao serem classificadas em nossos estoques, uma nova denominação, que não a utilizada ao longo deste texto, qual seja:

LINHAGEM REVERTENTE	DENOMINAÇÃO NO ESTOQUE
C ₁₀	RV5.1
C ₁₂	RV5.2
G [#]	RV5.3
G [#] .1	RV5.3.1

GRUPOS DE LIGAÇÃO	MARCADORES GENÉTICOS
I
II

o = Centrômero

Figura 1. Marcadores genéticos da linhagem A de
Aspergillus nidulans.

Figura 2. Marcadores genéticos da linhagem MSE de
Aspergillus nidulans

Símbolos e Fenótipos dos Mutantes

Símbolo	Fenótipo
Mutantes nutricionais	Requerem
ad.....	adenina
fac.....	acetato de amônio (capacidade de uso como fonte de carbo no)
gal.....	galactose (capacidade de uso-como fonte de carbono)
nic.....	ácido niotínico
paba.....	ácido para-amino- benzóico
pro.....	prolina
pyro.....	piridoxina
ribo.....	riboflavina
s.....	tiossulfato de sódio
w.....	conídios de cor branca
y.....	conídios de cor amarela

5.2. Meios de Cultura

Preparados de acordo com PONTECORVO et alii (1953), itens 5.2.1 a 5.3.5.

5.2.1. Meio Mínimo (MM)

Nitrato de sódio.....	6,0 g
Cloreto de potássio.....	0,5 g
Sulfato de magnésio heptahidratado.....	0,5 g
Fosfato dihidrogenado de potássio.....	1,5 g
Sulfato de ferro.....	traços
Sulfato de zinco.....	traços
Glicose.....	10,0 g
Água destilada.....	1,0 l

Ajustou-se o pH para 6,8 utilizando-se NaOH 10%, antes de autoclavar o meio. Para o meio sólido, adicionou-se 15 g de ágar Difco.

5.2.2. Meio Completo (MC)

(Modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

Foi preparado adicionando-se ao meio mínimo (MM), para cada litro :

Peptona.....	2,0 g
Caseína hidrolisada.....	1,5 g
Extrato de levedura.....	2,0 g
Solução de vitaminas.(item 5.3.1)	1,0 ml

Para o meio completo sólido utilizou-se 20g de ágar em rama por litro; pH = 6,8.

5.2.3. Meio Mínimo Líquido mais 2% de Meio Completo

Adicionou-se ao meio mínimo líquido, 2% de meio completo líquido. Distribuiu-se 2,5 ml em cada tubo de ensaio, sendo estes tubos autoclavados em seguida.

5.2.4. Meio de Acetato de Amônio (APIRION, 1962)

Acetato de amônio.....	12,0 g
Cloreto de sódio.....	2,0 g
Sulfato de magnésio heptahidratado.....	0,5 g
Fosfato dihidrogenado de potássio.....	3,0 g
Sulfato de ferro.....	traços
Sulfato de zinco.....	traços
Água	1,0 l

Ajustou-se o pH para 6,1 utilizando-se NaOH 10%. Para solidificar o meio utilizou-se 15 gramas de ágar.

5.2.5. Meio de Galactose (ROBERTS,1959)

Mesmos constituintes do meio mínimo, sendo que se substituiu a glicose por galactose, como única fonte de carbono.

5.2.6. Meio Completo Duas Vezes Concentrado

Preparado conforme o Meio Completo (item 5.2.2), onde cada componente foi adicionado em quantidade dobrada, exceto a água.

5.2.7. Meio Completo Líquido

Preparo conforme o Meio Completo (sólido) exceto pela não adição de ágar. (Item 5.2.2)

5.2.8. MCKC1TP (Meio Completo com Solução de Cloreto de Potássio em Tampão Fosfato)

Preparado conforme o item 5.2.6 do presente trabalho, onde este foi diluído no momento do uso em KCL 1,2 M em tampão fosfato pH 5,8 (item 5.3.7.) na proporção de 1:1.

**5.2.9. MCKCl (Meio Completo com Estabilizador
Osmótico Cloreto de Potássio)**

Preparado conforme o item 5.2.2. do presente trabalho, sendo alterada a quantidade de KCl para se obter uma concentração final desejada (0,2M; 0,4M; 0,6M; 0,8M; 1,0M; 1,2M; e 2,4M).

Obs.: Nos ensaios em que se empregou tampão fosfato além do estabilizador osmótico, preparou-se o MCTP conforme o item 5.2.13.

**5.2.10. MCMgSO₄ (Meio Completo com
Estabilizador Osmótico Sulfato de
Magnésio).**

Preparado conforme o item 5.2.2 do presente trabalho, sendo acrescentado MgSO₄ para se obter uma concentração final de 0,6M ou 1,2M.

Obs.: Nos ensaios em que se empregou tampão fosfato além do estabilizador osmótico, preparou-se o MCTP conforme o item 5.2.13.

**5.2.11. MC SORBITOL (Meio Completo Estabilizador
Osmótico Sorbitol).**

Preparado conforme o item 5.2.2. do presente trabalho, acrescentando-se a quantidade de Sorbitol necessária para se obter a concentração final de 0,6M ou 1,2M.

Obs.: Nos ensaios em que se empregou tampão fosfato além do estabilizador osmótico, preparou-se o MCTP conforme o item 5.2.13.

5.2.12. MC SACAROSE (Meio Completo com Estabilizador Osmótico Sacarose).

Preparado conforme o item 5.2.2. do presente trabalho, acrescentando-se a quantidade de Sacarose necessária para se obter a concentração final de 0,6M ou 1,2M.

Obs.: Nos ensaios em que se empregou tampão fosfato além do estabilizador osmótico, preparou-se o MCTP conforme o item 5.2.13.

5.2.13. MCTP (Meio Completo com Tampão Fosfato)

Preparado conforme o item 5.2.6. do presente trabalho sendo diluído no momento do uso em tampão fosfato pH 5,8 (item 5.3.7.) na proporção 1:1.

5.3. Soluções.

5.3.1. Solução de Vitaminas

ácido nicotínico.....	10,0 mg
Ácido p-aminobenzóico.....	1,0 mg
Aneurina (Tiamina).....	5,0 mg
Biotina.....	0,02 mg
Piridoxina.....	5,0 mg
Riboflavina.....	10,0 mg
Água destilada.....	10,0 ml

Adicionou-se as vitaminas à água destilada previamente esterilizada, levando-se a solução obtida ao banho-maria por 15 minutos, conservando-se depois a solução em refrigerador, em frasco escuro, com clorofórmio.

5.3.2. Solução Salina

Cloreto de sódio.....8,0 g
 Água destilada.....1,0 l

Colocou-se 9 ml desta solução por frasco, autoclavando-se em seguida.

5.3.4. Solução de "Tween" 80 (Solução Dispersante)

"Tween" 80.....0,1 ml
 Água destilada.....100,0 ml

Dissolveu-se o "tween" na água transferindo-se a solução para tubos de ensaio com 2,5 ml cada um. Autoclavou-se a uma atmosfera por 15 minutos.

5.3.5. Solução de Lisol (1:5).

lisofórmio.....1 ml
 água destilada.....5 ml

5.3.6. Solução de Benlate [Metil 1-(butil-carbamoil)-2- benzimidazol carbamato]

Benlate (50% de Benomyl).....20,0 mg
Água destilada.....10,0 ml

Adicionou-se benlate à água destilada previamente esterilizada, levou-se a solução ao banho-maria por 15 minutos. Depois de pronta a solução foi conservada em refrigerador.

5.3.7. Suplementos Adicionados ao Meio Mínimo

Fez-se uma solução estoque para cada um dos suplementos. Estas foram preparadas com água destilada na qual se adicionou a droga. Estas soluções foram então levadas ao banho-maria por 15 minutos e depois foram conservadas sob refrigeração.

**Adição dos Componentes dos Requisitos
Nutricionais ao Meio Mínimo (para Análise
Genética).**

Solução Estoque	mg/100ml de H ₂ O	Concentração final no Meio de Cultura (µg/ml)
Adenina.....	500,0.....	25,00
Acido Nicotínico.....	10,0.....	0,50
Acido p-Aminobenzóico.....	5,0.....	0,25
Biotina.....	4,0.....	0,20
Metionina.....	1000,0.....	50,00
Piridoxina.....	5,0.....	0,25
Prolina.....	1000,0.....	50,00
Riboflavina.....	10,0.....	0,50
Tiossulfato de Sódio....	2000,0.....	100,00

5.3.8. Tampão Fosfato 0,2 M pH 5,8

Solução A:

NaH₂PO₄.....24,0 g
 Água destilada.....1000 ml

Solução B:

Na₂HPO₄ . H₂O.....71,6 g
 Água destilada.....1000 ml

Misturou-se 920 ml de A e 80 ml de B (obtendo-se pH 5,8 0,2 M). Conservou-se as soluções A e B sob refrigeração, preparando-se o Tampão Fosfato no momento do uso.

5.3.9. Solução de KCl 1,2 M pH 5,8

Colocou-se 89,4 g de KCl em cerca de 350 ml de solução A. Aqueceu-se até dissolver o KCl, adicionando-se então solução B até pH 5,8. Acertou-se o volume próximo a 1.000 ml com Tampão Fosfato 0,2 M pH 5,8, ajustando-se o pH final para 5,8 com solução A ou B conforme o caso, até um litro (volume final). A solução foi autoclavada e conservada em refrigerador.

5.3.10. Solução de KCl 0,6 M pH 5,8

Diluiu-se a solução de KCl 1,2 M em Tampão Fosfato pH 5,8 na proporção de 1:1. A solução foi autoclavada e conservada em refrigerador.

5.3.11. Solução de Enzimas para produção de Protoplastos (HAMLIM et alii, 1981)

- .KCl 0,6 M em Tampão Fosfato 0,2 M (pH 5,8)
- .NOVOZYM 234 (Novo Industry - Dinamarca)
- .CELULASE CP (John & Sturge Ltd. Birmingham, Inglaterra)

Elaborada adicionando-se 5 mg de "solução litica" (2,5 mg de Novozym 234 e 2,5 mg de Celulase CP Sturge) por ml de KCl 0,6 M em Tampão Fosfato 0,2 M pH 5,8.

5.3.12. Solução de Polietileno Glicol (para fusão de protoplastos)

Solução A:

CaCl₂11,0 g

Água Destilada.....1000,0 ml

Solução B:

Glicina.....37,5 g

Água Destilada.....1000,0 ml

Adicionou-se 10,0 ml da Solução A em 10,0 ml da Solução B. Completou-se o volume para 100,0 ml com água destilada corrigido o pH para 8,0 com NaOH 4% (p/v). Adicionou-se PEG 6000 para uma concentração final de 30% (30,0 g). Esterilizou-se em autoclave.

5.3.13. Solução de Acrilamida

Acrilamida.....30 g

Bis acrilamida.....0,8g

Completou-se para 100ml com água destilada e deionizada

5.3.14. Tampão inferior (4x) Lower buffer

Tris-HCL 1,5M pH 8,8

Preparou-se a solução com 181,7g de tris por litro, porém inicialmente colocou-se apenas cerca de 400ml de água, e adicionou-se ácido clorídrico até alcançar o pH indicado. Então completou-se o volume para um litro com água destilada e deionizada.

5.3.15. Tampão superior (4x) - Upper buffer

Tris-HCL 0,5M pH 6,8

Preparou-se a solução com 60,6g de tris por litro, acertando-se o pH da mesma forma que no caso da solução anterior (5.3.13).

5.3.16. Solução de SDS

SDS.....10g
 água destilada e deionizada.....100 ml

5.3.17. Solução de Persulfato de amônio

Persulfato de amônio.....10g
 água destilada e deionizada.....100 ml

5.3.18. Estoque de tampão de corrida (TC) (4x)

Running buffer stock

Tris.....12g
 Glicina.....57,6g
 água destilada e deionizada.....1 litro

5.3.19. Tampão carregador (2x) - Loading buffer

2 Mercapto-etanol.....0,5 ml
 Azul de bromofenol 0,1%.....0,25 ml
 SDS 10%.....4,00 ml
 Tampão de peso (2x).....5,30 ml

5.3.20. Tampão de peso (2x) - Sample buffer

Tampão superior (4x).....12,5 ml

Glicerol.....20 ml

Completo-se para 60 ml com água

5.3.21. Soluções para método Biureto (Extração de Proteínas)

A. NaOH 3,0N

B. CuSO_4 2,5%

C. 2ml de suspensão proteica

2ml de NaOH 3N (A)

1ml de CuSO_4 2,5% (B)

5.3.22. Tampão Maleato pH 6.5

EDTA.....10 mM

TRIS.....100 mM

Acido Málico.....100 mM

Cloreto de Magnésio.....10 mM

Ajustou-se o pH com NaOH 1N

5.3.23. Géis Inferiores

5.3.23.1. Gel SDS - PAGE

5.3.23.1.1. Tampão de corrida 1x - Running buffer 1x

TC (item 5.3.17).....1 l
 Água.....3 l
 SDS 10%.....40 ml

5.3.23.1.2. Composição do Gel

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO DE ACRILAMIDA	
	3,0%	10%
(5.3.12)	1.0 ml	13.3 ml
(5.3.13)	10.0 ml	-
(5.3.14)	2.5 ml	-
(5.3.15)	0.1 ml	0.4 ml
(5.3.16)	0.1 ml	0.4 ml
Água	5.9 ml	15.8 ml
TEMED	10µl	10µl

5.3.23.2. PAGE-PROTEÍNAS

IGUAL AO SDS-PAGE, PORÉM SEM SDS

GEL SOLUÇÕES	LOWER GEL (40 ml)			UPPER GEL (10 ml)	
	7,5%	8,0%	9,0%	3,0%	4,5%
Tampão	10 ml	10 ml	10 ml	2.5 ml	2.5 ml
Acril-Bis	10 ml	10.6 ml	12 ml	1.0 ml	1.6 ml
Água	19 ml	18.4 ml	17 ml	6.0 ml	5.5 ml
Pers-Amonio 10%	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.1 ml	0.1 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Utilizou-se as concentrações de 7.5 e 3.0%

5.4. Obtenção de Revertentes

Irradiação com Ultra-Violeta

(AZEVEDO & COSTA, 1973)

5.4.1. Estabelecimento da Curva de Sobrevivência

Inoculou-se em cinco placas de Petri contendo Meio Completo (MC) a linhagem da qual se pretendeu obter mutantes, deixando-as no incubador a 37°C por sete dias.

Após este período, fez-se uma suspensão em "Tween" dos conídios obtidos (concentração de 10^7 conídios/ml).

Diluiu-se 1 ml desta suspensão em 9 ml de solução salina, obtendo-se uma concentração de conídios de 10^6 conídios/ml.

Verteu-se então a suspensão obtida em placa de Petri vazia e esterilizada.

Antes de iniciar a irradiação do material manteve-se ligada a lâmpada de ultra-violeta (U.V.) por período de 15 a 30 minutos.

No tempo zero (controle) anteriormente à irradiação, transferiu-se 1 ml da suspensão para um vidro contendo 9 ml de solução salina, preparando-se a seguir cinco diluições sucessivas.

Irradiou-se em seguida a suspensão inicial (10^6 conídios por 1 minuto e transferiu-se 1 ml desta suspensão para frasco com 9 ml de solução salina, diluindo-se a mesma por cinco vezes sucessivas. Continuou-se o tratamento, interrompendo a exposição do material nos tempos correspondentes respectivamente a dois, quatro e oito minutos de irradiação.

Transferiu-se 0,1 ml das suspensões obtidas para placas contendo MC (três diluições de cada tempo de exposição e três repetições em cada uma destas).

As suspensões foram semeadas com pipeta e espalhadas com alça de Drigalski.

Trabalhou-se sob luz do bico de Bunsen e lâmpada comum amarela.

A distância entre a fonte de U.V. e o material a ser irradiado foi constante, de 15 cm.

Durante a exposição a placa de Petri contendo a suspensão a ser irradiada foi mantida em constante movimento de modo a manter homogênea a exposição dos conídios à irradiação.

Após a irradiação as placas foram envolvidas com papel opaco de modo que as colônias em crescimento não ficassem expostas à luz. A seguir, as placas foram incubadas por um período de três a cinco dias, a 37°C.

Após este período, analisou-se o crescimento das colônias obtidas de conídios irradiados, em relação às obtidas de esporos não irradiados (controle).

5.4.2. Irradiação para Obtenção de Mutantes

Revertentes

Utilizou-se o mesmo procedimento anterior, adotando-se como tempo de irradiação o correspondente a 5% de sobrevivência. Os mutantes obtidos foram transferidos para placa de Petri contendo MC.

5.4.3. Caracterização preliminar dos revertentes obtidos (auxanografia)

Inoculou-se os revertentes para a cor verde nos seguintes meios de cultura: (1 ponto no centro das placas)

- MC
- MM
- MM com todos os suplementos nutricionais (item 5.3.5.) exceto paba
- MM com todos os suplementos nutricionais (item 5.3.5.) exceto pro
- MM + pro + paba.

As placas foram mantidas a 37°C por 7 dias.

5.4.4. Teste de estabilidade

Inoculou-se um ponto ao centro de dez placas de Petri contendo MC, sendo as colônias mantidas a 37°C por 7 dias, quando então se procedeu à contagem dos setores obtidos.

5.5. Análises Genéticas (todos procedimentos de acordo com PONTECORVO et alii, 1953).

5.5.1. Obtenção de Heterocário

Inoculou-se em tubos de ensaio contendo 2,5 ml de meio mínimo mais 2% de meio completo, conídios das linhagens MSE e deteriorada, sendo estes tubos incubados a 37°C por quatro dias, obtendo-se então uma película na superfície do meio constituída pela germinação incipiente dos conídios, com probabilidade de ocorrência de anastomose de hifas.

Transferiu-se esta película para uma placa de Petri contendo meio mínimo, dividindo-a em quatro partes. O crescimento em meio mínimo é possível devido à presença de núcleos diferentes geneticamente, em uma mesma hifa, o que constitui o heterocário.

5.5.2. Procedimentos para Análise Mitótica

5.5.2.1. Isolamento de Colônia Diplóide

Procedeu-se à suspensão 10^7 conídios e semeadura de 0,1 ml conídios obtidos a partir do heterocário em 5 placas de Petri por linhagens diplóide, contendo meio mínimo, as quais foram incubadas a 37°C por três dias. Repetiu-se estes procedimentos quando necessário para o isolamento da colônia diplóide.

Obtendo-se colônias diplóides, identificadas pela capacidade de crescimento em meio mínimo e pelo tamanho dos conídios - medidas feitas em microscópio com uso de ocular micrométrica, medindo-se cadeias de cinco conídios agregados com lisol diluído (1:5), sobre lâminas - esta colônia diplóide foi transferida para meio mínimo (inoculação com estrias e suspensão com a diluição necessária para se obter aproximadamente 100 colônias na placa) e destas colônias selecionou-se uma que foi estocada em duplicata, em tubos com meio mínimo inclinado e também em sílica.

Observação: adotou-se a convenção de separar os componentes de um núcleo diplóide pelo símbolo // .

5.5.2.2. Obtenção de Segregantes Haplóides (UPSHALL & KÄFER, 1974)

Adicionou-se Benlate em concentrações de 1 µg e 1,5 µg por ml de meio completo, para inoculação em placas de Petri, do diplóide obtido (item 5.5.2.1), inoculando-se quatro pontos por placa, incubando-as a 37°C por sete dias. O meio completo com benlate, nas concentrações usadas, inibe o crescimento dos diplóides, permitindo o crescimento de setores haplóides que surgem como segregantes.

5.5.2.3. Análise Mitótica e Meiótica

Para se fazer a análise genética mitótica e meiótica utilizou-se placas de Petri contendo diferentes meios: meio completo; meio mínimo; meio mínimo adicionado de todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento; meio mínimo e todos os requisitos menos um (a ser analisado); meio de galactose e meio de acetato de amônio, estes dois últimos adicionados de todos os requisitos nutricionais citados.

Com os setores obtidos e purificados foi feita uma placa mestra contendo até vinte e seis colônias (disposição 1+5x5). Incubou-se esta placa por três dias a 37°C, sendo transferida para as placas de análise através de um replicador multifio (Azevedo et alii, 1976).

Fez-se as leituras destas placas após 24, 48 e 72 horas de incubação, anotando-se o crescimento (ou ausência deste) para cada colônia da placa, em cada uma das diferentes combinações de requisitos nutricionais e fonte de carbono.

5.5.3. Procedimentos para Análise Meiótica

5.5.3.1. Obtenção e Isolamento de Cleistotécios

Após a transferência de heterocários para placa de Petri (item 5.5.1) vedou-se uma placa, criando condição de estresse, favorecendo portanto a formação de cleistotécios. Incubou-se esta placa vedada a 37°C por um período de sete a dez dias.

Foram selecionados os cinco maiores cleistotécios desta placa, retirando-se com fio de níquel-cromo (processo realizado sob microscópio estereoscópico) e transferindo-se para placas de Petri contendo meio mínimo, onde foram rolados até que se soltassem as células de Hülle e os conídios a elas aderidos.

Estes cleistotécios limpos foram colocados em tubos de ensaio com solução de "tween" 80, esmagados com o auxílio de pipeta pressionada contra a parede do tubo, obtendo-se assim uma suspensão dos ascósporos liberados. Colocou-se um cleistotécio em cada tubo de ensaio.

Semeou-se 0,1 ml destas suspensões em placas de Petri contendo meio completo, incubando-as por três dias para se fazer a seleção da suspensão de cleistotécios mais apropriada a partir da qual semear novas placas de Petri (contendo meio completo), diretamente da suspensão selecionada (duas placas); de uma diluição desta suspensão a 1:10 (três placas) e de 1:100 (três placas).

5.5.3.2. Análise Meiótica

As colônias assim obtidas (item 5.5.3.1) foram empregadas na elaboração de placas mestras, sendo a quantidade de placas determinada em função da quantidade de colônias obtidas, sendo estas agrupadas pelo critério de cor (para as colônias normais). Foi feita também uma placa com colônias deterioradas.

As placas foram incubadas por três dias a 37°C. Em seguida as colônias foram transferidas para placas de análise, utilizando-se o replicador multifio.

Fez-se as leituras das placas de análise após 24, 48 e 72 horas de incubação, anotando-se o desenvolvimento de cada uma das colônias em cada um dos tipos de placas (quanto aos nutrientes presentes e fonte única de carbono).

Para se verificar a ocorrência de ligação entre dois loci, empregou-se a seguinte fórmula:

$$C = \frac{R}{T} \times 100, \text{ onde:}$$

C = frequência de recombinação

R = número de colônias recombinantes

T = número total de colônias analisadas

Para o cálculo do Desvio Padrão utilizou-se a seguinte fórmula:

$$s = \sqrt{[c \times (1 - c)] \div N}$$

5.6. Obtenção de Protoplastos

(HAMLYN et alii, 1981)

Inoculou-se em placas com MC cada uma das linhagens utilizadas neste trabalho, sendo estas incubadas por 7 dias aproximadamente, a 37°C. Após este período fez-se uma suspensão dos conídios em "tween" e determinou-se sua concentração em conídios/ml por meio de Câmara de Neubauer. Inoculou-se as linhagens em frascos Erlenmeyer contendo 50 ml de MC líquido, em concentração final de 2×10^6 conídios por ml de meio. Os frascos foram colocados no agitador por 18 horas (200 rpm a 30°C).

O micélio desenvolvido foi coletado utilizando-se (em capela de fluxo laminar) funil de Büchner com papel filtro e em vácuo. Lavou-se o micélio no filtro por duas vezes com solução de KCl 1,2 M em Tampão Fosfato 0,2 M. Transferiu-se o micélio de cada linhagem para placa de Petri de plástico previamente tarada. As placas foram pesadas para estimar o peso do micélio úmido.

Para cada 50 mg de micélio foi utilizado 1 ml de KCl 0,6 M em Tampão Fosfato 0,2 M pH 5,8 contendo 5 mg de "Solução Lítica" (2,5 mg de Novozym 234 e 2,5 mg de Celulase CP Sturge). Agitou-se por 3 horas (120 rpm) a 28°C, obtendo-se a lise; verificou-se então a presença de protoplastos no microscópio pela observação de uma gota da suspensão acima.

Em se constatando a presença de protoplastos, transferiu-se a suspensão para tubos de centrifuga cônicos e centrifugou-se por aproximadamente 30 segundos a cerca de 500 rpm. Coletou-se o sobrenadante e este foi centrifugado por 10 a 15 minutos a 3.000 rpm. Ressuspendeu-se o precipitado em KCl 0,6 M em Tampão Fosfato 0,2 M pH 5,8 e repetiu-se o processo visando a adequada remoção da "Solução Lítica".

Da suspensão final fez-se a contagem dos protoplastos em Câmara de Neubauer, efetuando-se a seguir diluições adequadas para a verificação do crescimento de protoplastos e células que não são protoplastos e resistiram à lise. Semeou-se em MC sólido ("pour plate") 2 a 3 placas por diluição e em MC sólido + solução estabilizadora, também 2 a 3 placas por diluição. Nas primeiras (apenas MC sólido) cresceram apenas células que resistiram à lise (hifas e conídios) e em MCKCl cresceram estas e os protoplastos podendo-se então calcular a taxa de regeneração dos mesmos e a porcentagem de protoplastos em relação ao total de células viáveis.

5.7. Fusão de Protoplastos

Misturou-se protoplastos com marcas auxotróficas complementares em quantidades aproximadamente iguais (10^6 protoplastos por ml).

Centrifugou-se esta solução a 2500 g por 5 minutos e ressuspendeu-se o precipitado em 1,0ml de solução de polietileno-glicol (item 5.3.12), mantendo-se a 28°C por 10 minutos. Após este período, precipitou-se a solução por centrifugação (2500 g por 10 min) e então ressuspendeu-se o precipitado em 4,0 ml de solução osmótica (KCl 0,6M).

Procedeu-se às diluições apropriadas, semeando-se os protoplastos em MM+KCl 0,6M para regeneração dos possíveis diplóides e heterocários formados após fusão.

5.8. Extração de Proteínas

5.8.1. Maceração do micélio

Inoculou-se conídios das linhagens A, Vs, C₁₀, C₁₂, G[#] e G^{#.1} em 100 ml de MC líquido; MCKCl líquido e MCKClTP líquido. Manteve-se em incubador a 37°C por 7 dias, sem agitação.

Dispensou-se então o meio de cultura, lavando o micélio por duas vezes em água destilada deionizada. Transferiu-se o micélio para almofariz. Adicionou-se nitrogênio líquido para a maceração. Quando o material tornou-se homogêneo e pulverizado adicionou-se 5 ml de água destilada e deionizada transferindo-se a suspensão para tubos de centrifuga, procedendo-se então ao método Biureto (item 6.8.2.).

5.8.2. Método Biureto

Adicionou-se a 2 ml da suspensão proteica, 2ml de NaOH 3,0N. Ferveu-se por 5 minutos. Adicionou-se 1 ml de CuSO_4 2,5%. Centrifugou-se por 5 minutos a 5000 rpm. Coletou-se o sobrenadante. Procedeu-se então à leitura do sobrenadante a 555 nm.

Curva Padrão com Albumina Bovina:
 0, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/ml de Proteína.
 Branco: 2ml de água deionizada
 Padrão: 100mg/ml - albumina bovina

Padrão	Água	V.Final
100µl/ 1ml = 10mg/ml → 200µl	1.800µl	2000µl
80µl/ 1ml = 8mg/ml → 160µl	1.840µl	2000µl
60µl/ 1ml = 6mg/ml → 120µl	1.880µl	2000µl
40µl/ 1ml = 4mg/ml → 80µl	1.920µl	2000µl
20µl/ 1ml = 2mg/ml → 40µl	1.960µl	2000µl

5.9. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

(LAEMMLI, 1970)

Preparadas as amostras, alíquotas de 50 a 100 microlitros, a depender da concentração de proteínas, estas foram colocadas em banho-maria fervente por 5 minutos estando a partir desse momento prontas para a corrida eletroforética.

5.9.1. Corrida Eletroforética.

Inicialmente procedeu-se ao acoplamento do suporte na cuba de eletroforese, prendendo-o com as presilhas. Feito isso, adicionou-se o tampão de corrida ao tanque inferior, tendo-se o cuidado de inclinar a cuba para evitar a formação de bolhas.

O próximo passo foi a colocação das amostras anteriormente preparadas nas canaletas. É muito comum nessa fase a formação de bolhas, e para evitá-las preencheu-se a parte superior das canaletas com o tampão de corrida do tanque inferior. Estando as canaletas cheias, pôde-se encher o tanque superior com o tampão de corrida, e iniciar a eletroforese propriamente dita.

Para a corrida, a cuba de eletroforese foi colocada no refrigerador e os eletrodos ajustados. Em uma eletroforese de duas fases, como a que foi realizada trabalha-se com duas voltagens. A voltagem inicial, de 100v,

foi mantida até a frente de corrida alcançar o gel separador. A partir desse momento ela foi aumentada até 150v, permanecendo assim até o fim da corrida.

5.9.2. Coloração de Isoenzimas

5.9.2.1. Esterase Método de SOLTIS & SOLTIS (s/d).

Fixou-se o gel em 50 ml de tampão maleato mais metanol (1:1) durante 30 segundos. Em seguida, adicionou-se 1 ml de alfa-naftil acetato a 1% preparado em solução aquosa de acetona (1:1) e 25 mg de FAST GARNET GBC SULFATE.

Após o aparecimento de bandas marrom-clara, o gel foi fixado com o tampão Inferior (item 5.3.14).

5.9.2.2. Proteína Total

Após a corrida, corou-se o gel em solução de Acrilamida (item 5.3.12) mais 0,05% de COOMASIE BRILLIANT BLUE R-250 por 12 horas. Depois de corado lavou-se o gel com solução de Acrilamida (item 5.3.13), até o aparecimento das bandas.

5.10. Ensaaios de Fenocópia

5.10.1. Ensaio com estabilizador osmótico KCl (0,6M) e tampão fosfato sobre linhagens haplóides normal e deteriorada.

Inoculou-se um ponto ao centro de placas de Petri contendo MC (item 5.2.2.), MCKCl (item 5.2.9), MCTP (item 5.2.13) ou MCKClTP (item 5.2.8.) as linhagens haplóides A (normal), V5, V97, V98, V98.1, V99 ou V100, deterioradas, duas repetições por tratamento, mantendo-se as placas a 37°C por 7 dias. Ao final avaliou-se a cor, o diâmetro e a esporulação das colônias. Para se quantificar a esporulação retirou-se 3 discos de 0,7 cm de diâmetro de uma das placas de cada tratamento, suspendendo-se cada um, individualmente em tubo de ensaio com 2,5ml de tween 80 (item 5.3.4.). Procedeu-se à contagem dos esporos em câmara de Neubauer, sendo os dados finais obtidos pelo cálculo da média entre estas 3 contagens.

5.10.2. Ensaio com diferentes estabilizadores osmóticos com e sem tampão fosfato sobre linhagens diplóides normal e deteriorada.

Inoculou-se as linhagens diplóides DetC₁₂//MSE e C₁₂//MSE (um ponto ao centro da placa) em MM sólido (item 5.2.1.) contendo um dos tipos de estabilizadores osmóticos relacionados a seguir: KCl 0,6M e 1,2M (item 5.2.9.); MgSO₄ 0,6M (item 5.2.10); Sorbitol 0,6M, Sorbitol 1,2M (item 5.2.11), Sacarose 0,6M e 1,2M (item 5.2.12); em placas com ou sem tampão fosfato. Obteve-se 32 tratamentos com duas repetições (64 placas). O tempo de incubação foi de 7 dias a 37°C. Não se empregou MgSO₄ 1,2M em MC sem Tampão Fosfato porque nesta concentração o estabilizador osmótico impediu a solidificação do meio de cultura. Neste ensaio observou-se a cor e o crescimento das colônias.

Obs.: Acrescentou-se os estabilizadores osmóticos diretamente ao meio de cultura para se obter as concentrações estudadas.

5.10.3. Ensaio com diferentes estabilizadores osmóticos, com e sem tampão fosfato sobre as linhagens haplóides normal e deteriorada A e Vs (respectivamente)

Inoculou-se as linhagens haplóides A e Vs (um ponto ao centro da placa) em MC sólido (item 5.2.2.) contendo um dos tipos de estabilizadores osmóticos relacionados a seguir: KCl 0,6M e 1,2M (item 5.2.12); $MgSO_4$ 0,6M (item 5.2.10); Sorbitol 0,6M e 1,2M (item 5.2.11) e Sacarose 0,6M e 1,2M (item 5.2.12) em placas com ou sem tampão fosfato. O tempo de incubação foi de 7 dias a 37°C. Fez-se duas repetições por tratamento.

Obs.: Acrescentou-se os estabilizadores osmóticos diretamente ao meio de cultura para se obter as concentrações estudadas.

5.10.4. Ensaio com gradiente de concentração de KCl sobre linhagens normal, deteriorada e revertentes

Inoculou-se as linhagens haplóides A, Vs, C₁₀, C₁₂, G[#] e HV₉₄ (um ponto ao centro da placa) em MC sólido (item 5.2.2.) contendo uma das seguintes concentrações do estabilizador osmótico KCl: 0,2M; 0,4M; 0,6M; 0,8M; 1,0M; 1,2M e 2,4M (item 5.2.9). O tempo de incubação foi de 7 dias a 37°C. Fez-se duas repetições por tratamento.

Obs.: Acrescentou-se o estabilizador osmótico KCl diretamente ao meio de cultura para se obter as concentrações estudadas.

5.10.5. Ensaio de privação de nutrientes (a partir de MC) sobre linhagens normal e deteriorada em presença e ausência do estabilizador osmótico KCl.

Inoculou-se as linhagens haplóides A e Vs (um ponto ao centro da placa) em MC sólido contendo MC menos um de seus componentes (item 5.2.2.). O tempo de incubação foi de 7 dias a 37°C. Fez-se duas repetições por tratamento.

5.10.6. Ensaio de privação de nutrientes (a partir de MM) sobre linhagens normal e deteriorada em presença e ausência do estabilizador osmótico KCl 0,6M ou MgSO₄ 0,6M.

Procedeu-se como no item 5.10.5, exceto que se retirou cada um dos nutrientes do MM (item 5.2.1.), empregando-se nas placas com estabilizador osmótico KCl 0,6M ou MgSO₄ 0,6M.

5.11. Estoques de Linhagens de Fungos Filamentosos em Sílica.

Utilizou-se tubos com tampa de rosca contendo aproximadamente 2/5 de seu comprimento preenchido com sílica. Conduziu-se este material ao forno de vidraria por 4 horas deixando as tampas de rosca levemente frouxas.

Preparou-se a seguinte solução:

- leite em pó desnatado - 10g
- água destilada (completando o volume até 100 ml)

Esta solução foi transferida para tubos de ensaio (aproximadamente 2ml/por tubo) e esterilizada em autoclave.

Fez-se uma suspensão densa de esporos no leite. Conduziu-se os tubos com sílica para um depósito com gelo. Quando resfriados, adicionou-se a cada um 0,2ml da suspensão de leite, contendo esporos da linhagem que se pretende estocar. Vedou-se os tubos com as tampas de rosca. A seguir transferiu-se os tubos do gelo para o vortex, e deste de volta ao gelo, até se obter um material seco e solto.

Conduziu-se então os tubos com estoques em sílica para dessecador sendo este mantido sob refrigeração.

6. RESULTADOS

6.1. OBTENÇÃO DE REVERTENTES

6.1.1. ESTABELECIMENTO DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

Submeteu-se o variante deteriorado V_5 à irradiação com Luz Ultra-Violeta (U.V.), para a determinação da curva de sobrevivência. Obteve-se o tempo correspondente a quatro minutos de exposição à irradiação como relativo à taxa de 5% de sobreviventes em relação à concentração de colônias no tratamento que não sofreu irradiação. Os dados obtidos (Tabela 1) permitiram a elaboração da curva de sobrevivência aqui apresentada (Figura 3).

TABELA 1 - TAXAS DE SOBREVIVENCIA DA LINHAGEM V_5 A IRRADIAÇÃO U.V.

TRATAMENTOS	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (Minutos)	% SOBREVIVENCIA
0	0	100,000
1	1	78,700
2	2	27,900
3	4	5,070
4	8	0,001

FIGURA 3 - CURVA DE SOBREVIVENCIA DA LINHAGEM V₅ A IRRADIAÇÃO U.V

6.1.2. Obtenção de Mutantes Revertentes para a Cor Verde

Os tratamentos que se seguiram tiveram portanto, um tempo de exposição de quatro minutos. Dentre os mutantes obtidos selecionou-se três, por apresentarem coloração verde, embora com aspecto deteriorado (superfície enrugada).

Conduziu-se 2 tratamentos (item 5.4.1) com um nº de 10^6 esporos para se obter os três mutantes revertentes para a cor verde.

Estes três mutantes foram denominados C₁₀, C₁₂ e G[#]; sendo este último diferente dos anteriores. C₁₀ e C₁₂ caracterizam-se por apresentar colônias semelhantes ao V₅ exceto pela cor, verde. G[#] produz maior quantidade de esporos e apresenta elevada incidência de setores de coloração marrom.

Posteriormente obteve-se um setor verde estável derivado espontaneamente de G[#], ao qual se denominou G[#].1.

6.1.3. Caracterização Preliminar dos Revertentes Obtidos (C₁₀, C₁₂ e G[#])

Testando-se as marcas auxotróficas destas colônias obteve-se resultados que indicaram serem todas Pro⁻ paba⁻ e portanto, realmente mutantes revertentes para a cor verde, derivados de V₅, excluindo-se hipótese de possíveis contaminantes (Tabela 2).

Tabela 2. Teste de Auxotrofia (pro⁻ paba⁻) para as linhagens C₁₀, C₁₂, G[#] e V₅.

LINHAGEM	M E I O S D E C U L T U R A					
	MC	MM	MM+Tudo s/PRO PABA	MM PRO	MM PABA	MM PRO PABA
V ₅	+	-	-	-	R	+
C ₁₀	+	-	-	-	R	+
C ₁₂	+	-	-	-	R	+
G [#]	+	-	-	-	R	+

+ = crescimento vigoroso
- = ausência de crescimento
R = crescimento residual

6.1.4. Teste de Estabilidade de G[#]

Os setores produzidos por G[#] variam muito entre si, sendo o centro da colônia caracterizado por uma coloração verde amarelada, com fase intermediária verde e bordas marrom esbranquiçadas. Conforme observado (Tabela 3), obteve-se aproximadamente 6 setores por colônia.

Tabela 3. Setores formados em colônias G[#]

nº Setores	Característica
7	fluffy
41	marrom c/ bordas verdes
8	verdes
1	amarelo
2	brancos

Total 59 (10 placas) ~ 5.9 setores por placa

6.2. Ensaios de Fenocópia

6.2.1. Efeito do estabilizador osmótico KCl 0,6 e tampão fosfato sobre linhagens haplóides normal e deterioradas.

A descrição do fenótipo cor encontra-se na Tabela 4; a contagem de esporos na tabela 5. Neste ensaio obteve-se 100% de crescimento em todas as colônias exceto no V₁₀₀ em MCKCl que cresceu 93,4% em relação ao diâmetro da placa. Para se verificar novamente apenas o diâmetro das colônias conduziu-se uma repetição, obtendo-se os dados apresentados na Tabela 6.

Tabela 4 - Fenótipo cor em função do tampão fosfato e estabilizador osmótico (KCl 0,6M) em linhagens haplóides normal e deterioradas

LINHAGENS	M E I O S D E C U L T U R A			
	MC	MCKCl	MCTP	MCTPKCl
A	verde-ocre	verde-ocre amarelado	verde amarelado	verde bem escuro
V ₅	Det típico (avermelhado e enrugado)	verde-ocre	deteriorado ocre e enrugado	verde escuro não homogêneo enrugado
V ₉₇	Det típico (marrom claro e liso)	amarelo levemente ocre-liso	amarelo com setores palha deteriorado	amarelo com poucos setores palha
V ₉₈	Det típico (marrom claro e liso)	amarelo levemente ocre-liso	amarelo com superfícies granulosa e estrias palha, deteriorado	amarelo mais vivo com estrias palha
V _{98.1}	Det "branco" (palha palido) enrugado, sulcos do centro para bordas	amarelo-ocre centro levemente enrugado, sulcos do centro para bordas	amarelo pálido enrugado, sulcos do centro para bordas deteriorado	amarelo vivo com sulcos do centro para bordas
V ₉₉	marrom pálido	ocre-liso bordas marrom claro	ocre-liso deteriorado	ocre bastante amarelado e compacto
V ₁₀₀	Det marrom amarelado com estrias	ocre com sulcos do centro para bordas	amarelo pálido sulcos do centro para bordas deteriorado	amarelo mais vivo uma das repetições c/ sulcos do centro c/ bordas

Legenda:

MC - meio completo

MCKCl - meio completo + KCl 0,6M

MCTP - meio completo + tampão fosfato

MCTPKCl - meio completo + KCl 0,6M + tampão fosfato

Tabela 5 - Médias da contagem de esporos de colônias normal e deterioradas em função do crescimento com e sem tampão fosfato e estabilizador osmótico (KCl 0,6M). Concentração: $\times 10^7/\text{ml}$ (3repetições/tratamento).

LINHAGENS	M E I O S D E C U L T U R A			
	MC	MCKCl	MCTP	MCTPKCl
A	0,512	1,255	1,297	1,371
V ₅	0,006	0,285	0,038	0,488
V97	0,013	0,153	0,233	0,465
V98	0,003	0,308	0,119	0,392
V98.1	0,009	0,156	0,172	0,777
V99	0,016	0,006	0,167	0,244
V100	0,073	0,049	0,094	0,324

Legenda:

MC - meio completo

MCKCl - meio completo + KCl 0,6M

MCTP - meio completo + tampão fosfato

MCTPKCl - meio completo + KCl 0,6M + tampão fosfato

Tabela 6 - Avaliação do crescimento das colônias normal e deterioradas em função da presença e ausência de tampão fosfato e estabilizador osmótico (KCl 0,6m) - % de crescimento em relação ao diâmetro da placa (*).

LINHAGENS	M E I O S D E C U L T U R A				
	MC	MCKCl	MCTP	MCTPKCl	m
A	80,11	85,74	84,79	87,86	84,63
V ₅	86,59	86,96	93,96	95,70	90,80
V97	84,86	88,34	91,76	85,32	87,57
V98	85,95	84,79	92,26	86,81	87,45
V98.1	86,96	83,15	90,77	86,41	86,82
V99	89,02	84,96	93,20	84,05	87,81
$\bar{m}$	85,58	85,66	91,12	87,70	87,52

(*) dados referentes a um ensaio independente. Os dados correspondentes ao ensaio das Tabelas 4 e 5 para crescimento das colônias foram de 100% para todas exceto para Det5 em MCKCl que cresceu 93,4% apenas.

MC - meio completo

MCKCl - meio completo + estabilizador osmótico KCl 0,6m

MCTP - meio completo + tampão fosfato

MCTPKCl - meio completo + tampão fosfato + estabilizador osmótico KCl 0,6 m.

6.2.2. Efeito de Diferentes Estabilizadores Osmóticos, com e sem Tampão Fosfato sobre as Linhagens Diplóides Det C₁₂ // MSE e C₁₂ // MSE.

A descrição dos fenótipos encontra-se na Tabela 7; o crescimento das colônias na Tabela 8.

Tabela 7 - Fenótipo cor em função do estabilizador osmótico e tampão fosfato - Linhagens diplóides normal e deteriorada.

Linhagem	C ₁₂ //MSE		Det C ₁₂ //MSE	
Estab. Osmótico	T A M P ã O F O S F A T O			
	PRESENTE	AUSENTE	PRESENTE	AUSENTE
MM controle	verde amarelado setores brancos e deteriorados	amarelo esverdeado bordas irregulares c/ setores deteriorados	Deteriorado	Deteriorado
KCl (0,6M)	verde	verde c/ bordas irregulares	verde c/bordas esbranquiçadas	verde em tom pastel
KCl (1,2M)	verde c/bordas em tom pastel	verde c/bordas irregulares e em tom pastel	verde c/bordas em tom pastel	verde c/bordas irregulares e em tom pastel
MgSO ₄ (0,6M)	verde	verde	verde c/bordas em tom pastel	verde
SORBITOL (0,6M)	amarelo com setores deteriorados e brancos	amarelo com setores deteriorados	Deteriorado amarelado com bordas levemente irregulares	Deteriorado c/setores deteriorados e enrugados Centro marrom avermelhado, bordas pastel

continuação Tabela 7

Linhagem	C ₁₂ //MSE		Det C ₁₂ //MSE	
Estab. Osmótico	T A M P A O F O S F A T O			
	PRESENTE	AUSENTE	PRESENTE	AUSENTE
SORBITOL (1,2M)	amarelo	amarelo com setores tam- bém amarelos bordas irre- gulares	Deteriorado amarelado com setores deteriorado e bordas irregulares	Deteriora- do enru- gado c/cen- tro acin- zentado c/ bordas pas- tel
SACAROSE (0,6M)	amarelo tom pastel enru- gado com se- tor amarelo mais forte	amarelo tom pastel enru- gado, bordas levemente irregulares	marrom acin- zentado com bordas tom pastel ama- relado. Seto- res deterio- rados	Deteriora- do marrom acinzenta- do e enru- gado bor- das pas- tel
SACAROSE (1,2M)	amarelo tom pastel enru- gado no cen- tro bordas lisas	amarelo forte enrugado com pequenos seto- res deteriora- dos	centro mar- rom liso c/ bordas ama- relas	deteriora- do marrom acinzenta- do enru- gado bordas em tom pastel

Tabela 8 - Avaliação do crescimento* em função de estabilizadores osmóticos e tampão fosfato sobre colônias diplóides normal e deteriorada.

Linhagem	C ₁₂ //MSE		Det C ₁₂ //MSE	
Estab. Osmótico	T A M P ã O		F O S F A T O	
	PRESENTE	AUSENTE	PRESENTE	AUSENTE
MM controle	93,5	90,2	100,0	80,6
KCl (0,6M)	85,2	58,5	68,2	69,8
KCl (1,2M)	59,5	35,5	48,8	39,8
MgSO ₄ (0,6M)	100,0	100,0	94,3	100,0
SORBITOL (0,6M)	100,0	85,2	85,2	75,9
SORBITOL (1,2M)	88,2	73,9	68,2	64,4
SACAROSE (0,6M)	100,0	87,0	82,2	71,6
SACAROSE (1,2M)	64,7	43,7	63,2	40,2

* (% crescimento = diâmetro da placa/diâmetro da colônia)

6.2.3. Efeito dos Estabilizadores osmóticos e
tampão fosfato sobre as linhagens
haplóides A e V₅

A descrição dos fenótipos encontra-se na Tabela 9; a contagem de esporos na Tabela 10 e o crescimento das colônias na Tabela 11.

Tabela 9 - Fenótipo cor em função do tampão fosfato e diferentes estabilizadores osmóticos em diferentes concentrações em linhagens haplóides A e V₅, respectivamente normal e deteriorada.

Meio	Tampão Fosfato	L I N H A G E N S	
		A	V ₅
MC	Ausente	verde amarelado	deteriorado típico avermelhado.
	Presente	verde mais intenso	menos deteriorado que o padrão com alguns pigmentos verdes.
MC KCl	Ausente	verde pastel	verde pastel com tons marrom superfície levemente rugosa.
	Presente	verde mais intenso em 1,2M ocorreu setor amarelo e verde.	verde pastel
MC MgSO ₄	Ausente	verde amarelado, levemente enrugado (obs: 1,2M sem tampão PO ₄ ⁻³ não solidificou o meio	verde pouco intenso com tons amarelados, superfície irregular e levemente enrugada.
	Presente	verde	verde pouco intenso
MC SORB	Ausente	marrom amarelado com alguns tons verdes ou somente amarelo	altamente enrugado; 0,6M semelhante ao deteriorado, 1,2M ocre amarelado
	Presente	verde acinzentado amarelado superfície bastante rugosa.	altamente enrugado tom ocre semelhante ao deteriorado.
MC SAC.	Ausente	amarelo levemente esverdeado, em 0,6M tom mais marrom.	centro marrom, borda amarelada passando pelo verde, altamente enrugado.
	Presente	amarelo levemente esverdeado, em 0,6M tom mais marrom.	altamente enrugado, marrom ocre com tons verdes ou amarelados.

Legenda: página seguinte

Legenda Tabela 9

MC - meio completo;

MCKCl - meio completo + KCl 0,6M e meio completo + KCl
1,2M;

MCMgSO₄ - meio completo + MgSO₄ 0,6M e meio completo +
MgSO₄ 1,2M;

MC SORB. - meio completo + Sorbitol 0,6M e meio
completo + sorbitol 1,2M;

MC SACA. - meio completo + sacarose 0,6M e meio
completo + sacarose 1,2M;

Tampão PO⁻³₄ - tampão fosfato 0,2M presente ou ausente
no meio de cultura.

Tabela 10 -Contagem de esporos de colônia normal e deteriorada em função do crescimento com e sem tampão fosfato em diferentes estabilizadores osmóticos ($\times 10^7/\text{ml}$)

Linhagens:		A		V ₅	
Meio	TAMPÃO FOSFATO	CONCENTRAÇÃO DO ESTABILIZADOR OSMÔTICO			
		0,6M	1,2M	0,6M	1,2M
MC	Ausente	1,140		0,030	
	Presente	1,185		0,120	
MC KCl	Ausente	0,730	0,390	0,170	0,110
	Presente	1,270	0,650	1,170	0,360
MC MgSO ₄	Ausente	0,53	ñ solidif.	0,230	ñ solidif
	Presente	0,700	1,050	0,230	0,47
MC SOR	Ausente	0,030	0,060	0,007	0,004
	Presente	0,230	0,090	0,003	0,003
MC SAC	Ausente	0,200	0,140	0,010	0,460
	Presente	0,100	0,050	0,001	0,010

Legenda:

MC - meio completo

MCKCl - meio completo + KCl 0,6M e meio completo + KCl 1,2M

MCMgSO₄ - meio completo + MgSO₄ 0,6M e meio completo + MgSO₄ 1,2M

MC SORB - meio completo + SORBITOL 0,6M e meio completo + SORBITOL 1,2M

MC SACA - meio completo + SACAROSE 0,6M e meio completo + SACAROSE 1,2M

TAMPÃO PO⁻³₄ - Tampão fosfato 0,2M presente ou ausente no meio de cultura

CONC. EST. OSM. - concentração do estabilizador osmótico adicionado ao meio completo

Tabela 11 - Avaliação do crescimento de colônias normal e deterioradas em função da presença e ausência de tampão fosfato e diferentes tipos de estabilizadores osmóticos (% de crescimento em relação ao diâmetro da placa).

Linhagens:		A		V5	
Meio	TAMPÃO FOSFATO	CONCENTRAÇÃO DO ESTABILIZADOR OSMÓTICO			
		0,6M	1,2M	0,6M	1,2M
MC	Ausente	84,25		80,60	
	Presente	87,95		91,75	
MC	Ausente	85,90	85,70	71,40	71,70
	Presente	90,00	88,40	90,10	91,30
MC MgSO ₄	Ausente	89,10	ñ solidif.	92,40	ñ solidif
	Presente	88,40	88,60	94,50	100,00
MC SORB	Ausente	100,00	93,30	100,00	95,70
	Presente	100,00	100,00	100,00	100,00
MC SAC	Ausente	93,50	85,90	100,00	71,40
	Presente	100,00	100,00	100,00	100,00

Legenda:

MC - meio completo

MCKCl - meio completo + KCl 0,6M e meio completo + KCl 1,2M

MCMgSO₄ - meio completo + MgSO₄ 0,6M e meio completo + MgSO₄ 1,2M

MS SORB - meio completo + SORBITOL 0,6M e meio completo + SORBITOL 1,2M

MC SACA - meio completo + SACAROSE 0,6M e meio completo + SACAROSE 1,2M

TAMPÃO PO₄⁻³ - Tampão fosfato 0,2M presente ou ausente no meio

CONC. EST. OSM. - concentração do estabilizador osmótico adicionado ao meio completo.

**6.2.4. Efeito do gradiente de concentração de
KCl sobre o fenótipo das linhagens
normal, deterioradas e revertentes.**

A descrição dos fenótipos encontra-se na Tabela 12, a contagem de esporos na Tabela 13, e o crescimento na Tabela 14.

Tabela 12 - Fenótipo cor em função do gradiente de concentração de KCl sobre linhagens normal, deterioradas e revertentes. (2 repetições/tratamento)

CONC.ESTAB. OSMÓTICO	L I N H A G E N S					
	A	V ₅	C ₁₀	C ₁₂	G [#]	HV94
MC (controle)	verde amare lado	Deterio- rado	verde amarela do	Deteriora- do com cen tro esver- deado su- perfície ~ ao V ₅ tom marrom ã avermelha- do.	amarela- da com setores diversos	marrom pastel lisa por ções gra nulosas amarela- da (+)
0,2M	verde	Deterio- rado c/ poucos setores verdes e estreito fenótipo =C ₁₂ /MC	verde amarela do c/se tores verde escuro	verde no centro per dendo a cor para deteriora- do no sen- tido das bordas	verde	marrom pastel lisa.Por ções gra nulosas amarela- das (++)
0,4M	verde	Deterio- rado com grandes setores verdes	verde amarela do c/se tores escuros	verde ama- relado (+)	centro a marelo esverdea do	marrom pastel lisa.Por ções gra nulosas amarela- das (++)
0,6M	verde	verde c/ setores verdes(~ fenótipo C ₁₀ e G [#] 1 em MC)	verde amarela do c/ 2 setores verde claro em tom pastel	verde ama- relado(++)	verde ho mogênea em quase toda a placa se tores brancos	marrom pastel liso com porções granulo- sas

continuação - Tabela 12

CONC. ESTABILIZ. OSMÓTICO	L I N H A G E N S					
	A	V ₅	C ₁₀	C ₁₂	G#	HV94
0,8M	verde	totalmen <u>te</u> verde	verde escuro c/1 se- tor ver- de cla- ro em tom pas- tel	verde ama- relado (+++) c/ 1 mancha ir- regular verde escu- ra	centro verde bordas brancas e super- fície co- tonosa e homoge- nea	marrom pastel liso com porções granulo- sas
1,0M	verde	totalmen <u>te</u> verde	verde	verde ama- relado(+++ +)c/1 se- branco co- tonoso	~ à 0,8M 1 repeti- ção mar- rom es- verdeada com seto- res em relevo, brancos	marrom pas- tel liso c/ porções granulosas e 1 setor
1,2M	verde	verde	verde com se- tores indefi- nidos	verde ama- relado(+++ +)c/bordas amarelo pá- lido	branco com cen- tro es- verdeado superfí- cie coto- nosa	marrom pas- tel liso c/ porções granulosas
2,4M	verde	verde c/ setor de- teriora- do bran- co	creme enruga- do	creme enru- gado	branco superfí- cie coto- nosa	marrom pas- tel claro

Obs: Os símbolos (+), (++) ; (+++) e (++++) refere-se à intensidade do amarelo no fenótipo de colônias.
Foram conduzidas 2 repetições por tratamento.

Tabela 13 - Esporulação em função do gradiente de concentração de KCl sobre linhagens normal, deterioradas e revertentes (3 repetições/tratamento valores $\times 10^7/\text{ml}$).

CONC.ESTAB OSMÓTICO	L I N H A G E N S					
	A	V ₅	C ₁₀	C ₁₂	G [#]	HV94
MC (controle)	0,112	0,002	0,675	0,063	0,080	0,011
0,2M	0,123	0,004	1,388	0,535	0,555	0,012
0,4M	0,098	0,022	1,075	0,685	0,187	0,040
0,6M	0,050	0,023	0,888	0,743	0,408	0,041
0,8M	0,013	0,041	0,520	0,551	0,253	0,029
1,0M	0,013	0,018	0,605	0,628	0,123	0,050
1,2M	0,018	0,016	0,248	0,320	0,015	0,036
2,4M	0,003	0,008	0,013	0,050	0,001	0,011

Tabela 14 - Crescimento em função do gradiente de concentração de KCl sobre linhagens normal, deterioradas e revertentes (2 repetições por tratamento; valores % = diâmetro da colônia/diâmetro placa).

CONC. ESTABIL. OSMÓTICO	L I N H A G E N S					
	A	V ₅	C ₁₀	C ₁₂	G [#]	HV94
MC controle	91,8	88,2	92,3	89,9	100,0	100,0
0,2M	94,6	97,1	94,0	92,3	96,7	100,0
0,4M	89,2	94,3	94,0	92,0	98,9	100,0
0,6M	88,6	91,2	88,9	90,1	96,3	100,0
0,8M	80,5	94,1	91,2	88,7	93,9	94,0
1,0M	75,0	97,1	87,7	81,2	89,7	90,0
1,2M	65,8	91,4	71,8	81,5	77,8	80,0
2,4M	24,3	44,1	27,2	22,2	25,9	15,0

6.2.5. Efeito da privação de nutrientes (a partir de MC) sobre linhagens normal e deteriorada em presença e ausência do estabilizador osmótico KCl 0,6M.

A descrição dos fenótipos encontra-se na Tabela 15 e o crescimento na Tabela 16.

Tabela 15 - Fenótipo cor em função da privação de nutrientes (a partir de MC). Sobre linhagens normal e deteriorada em presença e ausência do estabilizador osmótico KCl 0,6M.

ESTABILIZ. OSMÓTICO (KCl 0,6M)	L I N H A G E N S			
	A		V ₅	
	AUSENTE	PRESENTE	AUSENTE	PRESENTE
CONTROLE (MC)	verde amarelado (++)	verde intenso	deteriorado (típico ao V ₅)	verde intenso
S/NaNO ₃	verde amarelado (++++), com 3 setores	verde intenso	deteriorado com centro ocre, bordas esbranquiçadas e irregulares	verde intenso
S/KCl	verde amarelado (+++)	verde intenso e escuro	deteriorado menos enrugado	verde intenso =MC+KCl 0,6M
S/KH ₂ PO ₄	verde com tons avermelhados 1 setor	verde intenso	deteriorado avermelhado e enrugado	verde intenso
S/MgSO ₄	verde amarelado (+) com 3 setores	verde intenso	deteriorado amarelado (++), menos enrugado	verde intenso centro um pouco enrugado
S/ZnSO ₄	deteriorado enrugado com centro esverdeado	verde intenso	deteriorado muito enrugado e esbranquiçado	verde intenso
S/FeSO ₄	enrugado com tons verdes	verde intenso	deteriorado pouco avermelhado com tons esbranquiçados	verde intenso
S/Glucose	verde pastel com crescimento ralo	verde intenso com crescimento ralo	marrom pastel liso crescimento ralo	verde intenso com crescimento ralo

continuação da Tabela 15

Linhagem	A		V ₅	
	AUSENTE	PRESENTE	AUSENTE	PRESENTE
EST.0SM. KCl 0,6M MEIO COMPLETO				
S/Pepitona	verde com tons avermelhados	verde escuro	deteriorado enrugado	verde intenso não muito escuro
S/Extrato de levedura	verde com tons avermelhados	verde intenso com 1 setor deteriorado	deteriorado c/ centro ocre amarelado (+), mais liso	verde intenso levemente enrugado ao centro
S/Caseína Hidrolisada	verde amarelado (+++)	verde intenso	deteriorado amarelado (++) e menos enrugado	verde intenso
S/Vitaminas	verde amarelado (+)	ocre amarelo esverdeado c/ bordas marrom	deteriorado ocre; bordas lisas	deteriorado c/ centro esverdeado
S/Vitaminas+ PABA	verde amarelado (++)	ocre amarelo-esverdeado	deteriorado ocre; bordas lisas	deteriorado c/ centro esverdeado

Obs: Os símbolos (+); (++) ; (+++) e (++++) referem-se à intensidade do amarelo no fenótipo das colônias. Foram conduzidas 2 repetições por tratamento.

Tabela 16 - Crescimento em função da privação de nutrientes (a partir de MC) sobre linhagem normal e deteriorada em presença e ausência do estabilizador osmótico KCl 0,6M (2 repetições/tratamento; valores % = diâmetro da colônia/diâmetro placa).

Linhagem	A		V ₅	
	AUSENTE	PRESENTE	AUSENTE	PRESENTE
EST.OSM. KCl 0,6M MEIO COMPLETO				
CONTROLE (MC)	89,2	86,6	88,5	87,9
S/NaNO ₃	89,2	88,9	90,1	91,3
S/KCl	91,5	88,9	92,8	91,1
S/KH ₂ PO ₄	90,5	89,1	93,2	90,3
S/MgSO ₄	90,1	87,8	90,4	89,3
S/ZnSO ₄	93,0	85,9	91,0	87,6
S/FeSO ₄	95,5	80,2	92,2	87,0
S/Glucose	71,1	64,3	77,7	64,7
S/Pepitona	88,6	84,9	91,1	89,8
S/Extrato Levedura	86,5	89,0	88,9	91,7
S/Caseína Hidrolis.	88,6	89,2	92,8	93,3
S/Vitam.	90,5	83,1	96,2	91,0
S/Vitam. + PABA	88,8	88,8	94,4	91,0

6.2.6. Efeito da Privação de Nutrientes (a partir de MM) sobre linhagens normal e deteriorada em presença e ausência do estabilizador osmótico KCl 0,6M ou MgSO_4 0,6M.

A descrição dos fenótipos encontra-se na Tabela 17 e o crescimento na Tabela 18.

Tabela 17 - Fenótipo cor em função da Privação de Nutrientes (a partir de MM) sobre linhagens normal e deteriorada em presença e ausência do estabilizador osmótico KCl 0,6M ou MgSO₄ 0,6M. (2 repetições/tratamento)

ESTABILIZ. OSMOTICO	LINHAGEM A			LINHAGEM V5		
	AUSENTE	KCl 0,6M	MgSO ₄ 0,6M	AUSENTE	KCl 0,6M	MgSO ₄ 0,6M
MEIO						
MM (controle)	sem crescimento	sem crescimento	crescimento residual com muito poucos esporos	sem crescimento	sem crescimento	crescimento residual sem esporos
MM + PROPABA	verde escuro amarelado c/bordas verde escuro	verde escuro 1 setor amarelo	verde musgo	centro deteriorado bordas avermelhadas e granulosas	verde amarelado c/1 setor s/ esporos borda amarelada c/ex-tremidades deterioradas esbranquiçadas	verde opaco centro cinza esverdeado
MM + PROPABA S/ NaNO ₃	leve crescimento micelial c/muito poucos esporos verdes	crescimento residual branco e transparente c/poucos esporos verdes	crescimento quase residual poucos esporos verdes na placa toda mais concentrada ao centro	leve crescimento micelial em tom marrom suave no centro um pouco de verde homogeneamente distribuidos	crescimento residual c/esporos verdes distribuidos	crescimento residual ocre-esverdeado poucos esporos na placa toda mais concentrados ao centro
MM + PROPABA S/ KCl	verde mais escuro levemente amarelado	verde escuro MM PROPABA+KCl	verde intenso bordas um pouco irregulares	centro deteriorado esverdeado e granulosa bordas irregulares avermelhadas e granulosa	ocre esverdeado MM PROPABA+KCl	ocre com setor fluffy, superfície lisa
MM + PROPABA S/ KH ₂ PO ₄	crescimento quase residual branco poucos esporos verdes espessos	crescimento quase residual fundo branco c/poucos esporos brancos próximos ao centro	crescimento próximo a residual poucos esporos verdes na placa toda mais concentrados no centro	crescimento quase residual fundo marrom poucos esporos marrons	crescimento quase residual c/fundo marrom e poucos esporos verdes ao centro	crescimento próximo a residual poucos esporos verdes na placa toda mais concentrados no centro

Tabela 18 - Crescimento em função de Privação de Nutrientes (a partir de MM) sobre linhagens normal e deteriorada em presença e ausência de estabilizador osmótico KCl 0,6M ou MgSO₄ 0,6M (2 repetições/tratamento; valores %= diâmetro da colônia/diâmetro placa).

ESTABILIZ. OSMOTICO	LINHAGEM A			LINHAGEM V5		
	AUSENTE	KCl 0,6M	MgSO ₄ 0,6M	AUSENTE	KCl 0,6M	MgSO ₄ 0,6M
MEIO						
MM (controle)	—	—	38,2	—	—	20,9
MM + PROPABA	45,1	69,5	88,7	60,0	50,0	94,8
MM + PROPABA S/ NaNO ₃	85,5	84,2	89,8	78,2	66,6	97,1
MM + PROPABA S/ KCl	59,5	100,0	100,0	63,2	100,0	100,0
MM + PROPABA S/ KH ₂ PO ₄	92,0	95,4	100,0	84,3	85,7	100,0
MM + PROPABA S/ ZnSO ₄	83,3	74,4	91,1	83,3	80,7	100,0
MM + PROPABA S/ FeSO ₄	50,5	70,7	80,4	74,7	69,6	100,0
MM + PROPABA S/ GLUCOSE	86,7	65,0	100,0	66,3	58,4	100,0
MM + PABA	38,4	60,8	55,0	36,5	31,4	35,5
MM + PRO	—	—	—	—	—	—

6.3. Análises Genéticas

Tabela 19. Auxanografia das Linhagens Parentais

Linhagem Marcador	A	V5	C10	C12	G#	G#.1	HV94	MSE
PRO (I)*	-	-	-	-	-	-	+	+
PABA (I)	-	-	-	-	-	-	+	+
GAL (III)	+	+	+	+	+	+	-	-
PYRO (IV)	+	+	+	+	+	+	-	-
FAC (V)	+	+	+	+	+	+	-	-
S (VI)	+	+	+	+	+	+	-	-
NIC (VII)	+	+	+	+	+	+	-	-
RIBO (VIII)	+	+	+	+	+	+	-	-
AD (I e II)	+	+	+	+	+	+	R	R
COR	vde	mar	vde	vde	vde	vde	mar	bra

* os algarismos entre parênteses referem-se ao grupo de ligação ao qual está associado o marcador em questão.

Legenda:

+ = crescimento vigoroso

- = ausência de crescimento

R = crescimento residual

vde = verde

mar = marrom

bra = branco

TABELA 20 - Análise meiótica - Linhagem A

Cruzamento A x MSE					
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias	χ^2	C	S
I	pro ⁺	59	0,62 n.s.		
	pro	45			
	paba ⁺	58	2,46 n.s.		
	paba	46			
II ⁺⁺					
III	gal ⁺	44	2,46 n.s.		
	gal	60			
IV	pyro ⁺	57	0,35 n.s.		
	pyro	47			
V	fac ⁺	36	9,85*		
	fac	68			
VI	s ⁺	58	1,39 n.s.		
	s	46			
VII	nic ⁺	53	0,04 n.s.		
	nic	51			
VIII	ribo ⁺	63	4,65*		
	ribo	41			

n.s. : não significativo

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

+ : valores de χ^2 considerando-se proporção 1:1

++ : dados na tabela 54

TABELA 21 - Análise mitótica - Linhagem V₅

Linhagem V ₅ // MSE			
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias	χ^2
I	pro ⁺	17	5,26*
	pro	06	
	paba ⁺	17	5,26*
	paba	06	
II	w ⁺	01	
	w	22	
III	gal ⁺	13	0,39 n.s.
	gal	10	
IV	pyro ⁺	08	2,13 n.s.
	pyro	15	
V	fac ⁺	09	1,09 n.s.
	fac	14	
VI	s ⁺	12	0,04 n.s.
	s	11	
VII	nic ⁺	14	1,09 n.s.
	nic	09	
VIII	ribo ⁺	16	3,52*
	ribo	07	

n.s. : não significativo

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

+ : valores de χ^2 considerando-se proporção 1:1

TABELA 22 - Estudo da Associação dos Grupos de Ligação ao Determinante de Deterioração - Análise Mitótica - Linhagem V₅.

MARCADORES	SEGREGAÇÃO	Nº DE COLÔNIAS ANALISADAS
ribo ⁺ pro ⁺	15	16
ribo ⁺ pro ⁻	01	
ribo ⁺ paba ⁺	15	15
ribo ⁺ paba ⁻	00	
ribo ⁺ gal ⁺	12	12
ribo ⁺ gal ⁻	04	
ribo ⁺ pyro ⁺	05	16
ribo ⁺ pyro ⁻	11	
ribo ⁺ fac ⁺	06	16
ribo ⁺ fac ⁻	10	
ribo ⁺ s ⁺	07	16
ribo ⁺ s ⁻	09	
ribo ⁺ nic ⁺	09	16
ribo ⁺ nic ⁻	07	

TABELA 23 - Análise meiótica - Linhagem V₅

Cruzamento V ₅ x MSE							
Grupo de Ligação	Marcadores	Número de Colônias			χ ²	C(%)	s%
		Normal	Det	Total			
I	pro ⁺	74	15	89	52,65*	25,0	4,25
	pro ⁻	11	4	15			
	paba ⁺	75	13	88	49,85*	22,0	4,06
	paba ⁻	10	6	16			
II ⁺⁺							
III	gal ⁺	70	13	83	36,93*	73,0	4,35
	gal ⁻	15	6	21			
IV	pyro ⁺	63	13	76	22,15*	66,4	4,63
	pyro ⁻	22	6	28			
V	fac ⁺	55	10	65	6,5*	61,5	4,77
	fac ⁻	30	9	39			
VI	s ⁺	83	19	102	96,15*	79,8	3,94
	s ⁻	2	0	2			
VII	nic ⁺	64	12	76	22,15*	68,3	4,56
	nic ⁻	21	7	28			
VIII	ribo ⁺	60	13	73	16,93*	63,3	4,72
	ribo ⁻	25	6	31			

+ : valores de χ^2 considerado proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

++: dados na tabela 54

n.s.: não significativo

N : fenótipo normal

Det : fenótipo deteriorado

Tabela 24. Teste de 3 Pontos - $V_5 \times$ MSE

	PRO	PABA	DET	Nº DE COLÔNIAS	TOTAL
P	-	-	-	4	76
	+	+	+	72	
SC I	+	-	-	8	21
	-	+	+	13	
SC II	-	-	+	2	5
	+	+	-	3	
DCO	+	-	+	2	2
	-	+	-	0	
TOTAL GERAL					104 colônias

Legenda:

PRO - auxotrofia para prolina
 PABA - auxotrofia para ácido p-aminobenzóico
 DET - morfologia deteriorada
 P - sem recombinação
 SC - crossing over simples
 DCO - crossing over duplo

Cálculos:

$$\text{PRO-PABA} = \frac{8 + 13 + 2}{104} = 22,12\%$$

$$\text{PRO-Det} = \frac{8 + 13 + 2 + 3}{104} = 25,00\%$$

$$\text{PABA-Det} = \frac{2 + 3 + 2}{104} = 6,73\%$$

$$F. (D.C.O.) = 0,2212 \times 0,0673 = 1,49\%$$

$$F. (D.C.O.) = \frac{2}{104} = 1,92\%$$

Tabela 25. Frequências de Recombinação - Cromossomo I - $V_5 \times$ MSE

Recombinação	Frequência
PROPABA	22,12%
PRO DET	25,00%
PABA DET	6,73%

ordem dos genes: PRO-PABA-Det

Legenda:

PRO - auxotrofia para prolina

PABA - auxotrofia para ácido p-aminobenzóico

Det - morfologia deteriorada

Dist.pro-paba + Dist.paba-det = 28,85 u.r.

Dist.pro-det + [2 x F(D.C.O. obs)] = 25,00 + 3,84 = 28,84

$$cc = \frac{F. (D.C.O)_{obs}}{F (D.C.O)_{esp}} = \frac{1,92}{1,49} = 1,29$$

$$\begin{aligned} \text{FATOR DE INTERFERENCIA} &= 1 - cc = 1 \\ &= 1 - 1,29 = -0,29 \end{aligned}$$

Figura 4 - Esquema dos Marcadores no Cromossomo I (V_5)

TABELA 26 - Análise mitótica - Linhagem C₁₀

Linhagem C ₁₀ //MSE					
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias			x ²
		N	Det	TOTAL	
I	pro ⁺	38	1	39	0.34ns
	pro	33	1	34	
	paba ⁺	38	1	39	0.34ns
	paba	33	1	34	
II	w ⁺	14	2	16	
	w	57	0	57	
III	gal ⁺	47	1	48	7.25*
	gal	24	1	25	
IV	pyro ⁺	55	2	57	23.03*
	pyro	16	0	16	
V	fac ⁺	58	0	58	25.33*
	fac	13	2	15	
VI	s ⁺	42	2	44	3.08ns
	s	29	0	29	
VII	nic ⁺	41	1	42	2.00ns
	nic	29	1	30	
VIII	ribo ⁺	40	1	41	1.11ns
	ribo	31	1	32	

+ : valores de x² considerado proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s.: não significativo

N : fenótipo normal

Det : fenótipo deteriorado

TABELA 27 - Auxanografia de Segregantes Haplóides Deteriorados Originados de C₁₀//MSE

Linhagens	C ₁₀ // MSE	
	HD1	HD2
PRO-PABA (I)*	+	-
RIBO (VIII)	+	-
GAL (III)	-	+
PYRO (IV)	+	+
FAC (V)	-	-
S (VI)	+	+
NIC (VII)	-	+

OBS:

HD = colônia haplóide deteriorada

* os Algarismos entre parênteses referem-se ao grupo de ligação ao qual está associado o marcador em questão.

TABELA 28 - Estudo da Associação dos Grupos de Ligação ao Determinante de Deterioração Análise Mitótica - Linhagem C₁₀.

MARCADORES	SEGREGAÇÃO		Nº DE COLÔNIAS
ribo ⁺ pro ⁺ paba ⁺	37	67	73
ribo ⁺ pro ⁻ paba ⁻	04		
ribo ⁻ pro ⁻ paba ⁻	30	06	73
ribo ⁻ pro ⁺ paba ⁺	02		
ribo ⁺ gal ⁺	22	37	73
ribo ⁺ gal ⁻	19		
ribo ⁻ gal ⁻	15	36	73
ribo ⁻ gal ⁺	17		
ribo ⁺ pyro ⁺	34	30	73
ribo ⁺ pyro ⁻	07		
ribo ⁻ pyro ⁻	09	43	73
ribo ⁻ pyro ⁺	23		
ribo ⁺ fac ⁺	36	53	73
ribo ⁺ fac ⁻	05		
ribo ⁻ fac ⁻	17	20	73
ribo ⁻ fac ⁺	15		
ribo ⁺ s ⁺	28	44	73
ribo ⁺ s ⁻	13		
ribo ⁻ s ⁻	16	29	73
ribo ⁻ s ⁺	16		
ribo ⁺ nic ⁺	28	46	73
ribo ⁺ nic ⁻	12		
ribo ⁻ nic ⁻	18	26	73
ribo ⁻ nic ⁺	14		

TABELA 29 - Análise meiótica - Linhagem C₁₀

Cruzamento C ₁₀ x MSE			
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias	χ ² +
I	pro ⁺	84	39,38 *
	pro ⁻	20	
	paba ⁺	81	32,35 *
	paba ⁻	23	
II ⁺⁺			
III	gal ⁺	76	22,15 *
	gal ⁻	28	
IV	pyro ⁺	71	13,68 *
	pyro	33	
V	fac ⁺	79	28,04 *
	fac	25	
VI	s ⁺	101	92,35 *
	s ⁻	003	
VII	nic ⁺	66	7,54 *
	nic	49	
VIII	ribo ⁺	76	22,15 *
	ribo	28	

+ : valores de χ^2 considerado proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

++ : dados na tabela 54

n.s.: não significativo

TABELA 30 - Análise mitótica - Linhagem C₁₂

Linhagem C ₁₂ // MSE					
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias			χ^2 +
		N	Det	Total	
I	pro ⁺	42	02	44	9,92 *
	pro	18	02	19	
	paba ⁺	42	02	44	9,92 *
	paba	18	01	19	
II	w ⁺	04	03	07	
	w	56	00	56	
III	gal ⁺	24	03	27	1,92 n.s.
	gal	36	00	36	
IV	pyro ⁺	38	01	39	3,57 *
	pyro	22	02	24	
V	fac ⁺	41	01	42	7,00 *
	fac	19	00	21	
VI	s ⁺	41	01	42	7,00 *
	s	19	02	21	
VII	nic ⁺	28	00	28	0,78 n.s.
	nic	32	03	35	
VIII	ribo ⁺	41	02	43	8,39 *
	ribo	19	01		

n.s. : não significativo

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

+ : valores de χ^2 considerando-se proporção 1:1

N : fenótipo normal

Det : fenótipo deteriorado

TABELA 31 - Estudo da Associação dos Grupos de Ligação ao Determinante de Deterioração Análise Mitótica - Linhagem C₁₂ - Diplóide C₁₂ // MSE

MARCADORES	SEGREGAÇÃO		Nº DE COLÔNIAS
ribo ⁺ pro ⁺ paba ⁺	42	60	63
ribo ⁺ pro ⁻ paba ⁻	01		
ribo ⁻ pro ⁻ paba ⁻	18	03	63
ribo ⁻ pro ⁺ paba ⁺	02		
ribo ⁺ gal ⁺	20	34	63
ribo ⁺ gal ⁻	23		
ribo ⁻ gal ⁻	14	29	63
ribo ⁻ gal ⁺	06		
ribo ⁺ pyro ⁺	27	35	63
ribo ⁺ pyro ⁻	16		
ribo ⁻ pyro ⁻	08	28	63
ribo ⁻ pyro ⁺	12		
ribo ⁺ fac ⁺	31	40	63
ribo ⁺ fac ⁻	12		
ribo ⁻ fac ⁻	09	23	63
ribo ⁻ fac ⁺	11		
ribo ⁺ s ⁺	30	38	63
ribo ⁺ s ⁻	13		
ribo ⁻ s ⁻	08	48	63
ribo ⁻ s ⁺	12		
ribo ⁺ nic ⁺	23	48	63
ribo ⁺ nic ⁻	20		
ribo ⁻ nic ⁻	15	25	63
ribo ⁻ nic ⁺	05		

Tabela 32. Auxanografia de Segregantes Haplóides Deteriorados Originados de C₁₂//MSE

Linhagens	C ₁₂ // MSE		
	HD1	HD2	HD3
PRO-PABA (I)*	-	+	+
RIBO (VIII)	-	+	+
GAL (III)	+	+	+
PYRO (IV)	-	-	+
FAC (V)	-	-	+
S (VI)	-	-	+
NIC (VII)	-	-	-

OBS:

HD = colônia haplóide deteriorada

* os organismos entre parênteses referem-se ao grupo de ligação ao qual está associado o marcador em questão.

TABELA 33 - Análise mitótica - Linhagem C12

Linhagem Det C12 // MSE			
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº Colônias	χ^2
I	pro ⁺	14	0,36 n.s.
	pro	11	
	paba ⁺	14	0,36 n.s.
	paba	11	
III	gal ⁺	00	25*
	gal	25	
IV	pyro ⁺	12	5,54*
	pyro	13	
V	fac ⁺	11	0,36 n.s.
	fac	14	
VI	s ⁺	15	0,15 n.s.
	s	10	
VII	nic ⁺	23	17,64 *
	nic	02	
VIII	ribo ⁺	13	0,04 n.s.
	ribo	12	

n.s. : não significativo

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

+ : valores de χ^2 considerando-se proporção 1:1

TABELA 34 - Análise meiótica - Linhagem C₁₂

Cruzamento C ₁₂ X MSE							
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias			χ ² +	c (%)	s (%)
		N	Det	Total			
I	pro ⁺	65	25	90	57,56*	33,98	4,67
	pro	10	03	13			
	paba ⁺	65	24	89	52,65*	33,65	4,63
	paba	11	04	15			
II ⁺⁺							
III	gal ⁺	45	18	63	04,65*	52,88	4,62
	gal	31	10	41			
IV	pyro ⁺	65	17	82	34,62*	73,67	4,35
	pyro	11	11	22			
V	fac ⁺	47	10	57	00,96n.s.	62,50	4,75
	fac	29	18	47			
VI	s ⁺	60	27	87	47,12*	58,65	4,83
	s	16	01	17			
VII	nic ⁺	59	20	79	28,04*	64,42	4,69
	nic	17	08	25			
VIII	ribo ⁺	56	16	72	15,38*	65,38	4,66
	ribo	20	12	32			

+ : valores de χ^2 considerado proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

++: dados na tabela 54

n.s.: não significativo

N : fenótipo normal

Det : fenótipo deteriorado

Tabela 35. Teste de 3 Pontos - C₁₂ x MSE

	PRO	PABA	DET	Nº DE COLÔNIAS	TOTAL
P	-	-	-	2	64
	+	+	+	62	
SC I	+	-	-	2	4
	-	+	+	2	
SC II	-	-	+	8	31
	+	+	-	23	
DCO	+	-	+	3	4
	-	+	-	1	
TOTAL GERAL					103 colônias

Legenda:

PRO - auxotrofia para prolina
 PABA - auxotrofia para ácido p-aminobenzóico
 DET - morfologia deteriorada
 P - sem recombinação
 SC - crossing over simples
 DCO - crossing over duplo

Cálculos:

$$\text{PRO-PABA} = \frac{2 + 2 + 3 + 1}{103} = 7,77\%$$

$$\text{PRO-Det} = \frac{2 + 2 + 8 + 23}{103} = 33,98\%$$

$$\text{PABA-Det} = \frac{8 + 23 + 3 + 1}{103} = 33,98\%$$

$$F. (D.C.O.) = 0,0874 \times 0,3398 = 2,97\%$$

$$F. (D.C.O.) = \frac{4}{103} = 3,88\%$$

Tabela 36. Frequências de Recombinação - Cromossomo I - C₁₂ x MSE

Recombinação	Frequência
PROPABA	7,77%
PRO DET	33,98%
PABA DET	33,98%

ordem dos genes: PRO-PABA-Det ou Det-PRO-PABA

Legenda:

PRO - auxotrofia para prolina

PABA - auxotrofia para ácido p-aminobenzóico

Det - morfologia deteriorada

$$\text{Dist.pro-paba} + \text{Dist.paba-det} = 7,77 + 33,98 = 41,75\text{u.r.}$$

$$\text{Dist.pro-det} + [2 \times F(\text{D.C.O. obs})] = 33,98 + [2 \times (3,88)] = 41,74$$

$$cc = \frac{F. (\text{D.C.O}) \text{ obs}}{F (\text{D.C.O}) \text{ esp}} = \frac{3,88}{2,97} = 1,31$$

$$\begin{aligned} \text{FATOR DE INTERFERENCIA} &= 1 - cc = I \\ I &= 1 - 1,31 = - 0,31 \end{aligned}$$

OU

$$2,97 \text{ ----- } 100$$

$$3,88 \text{ ----- } X$$

$$X = 130,63$$

Portanto a freqüência de duplos crossing-overs observada é 31% (30,63%) superior à freqüência esperada.

OBS: O GENE "Det" também pode ser representado 33,9 u.r. à direita de PABA

Figura 5 - Esquema dos Marcadores no Cromossomo I (C₁₂)

TABELA 37 - Análise mitótica - Linhagem G[#]

Linhagem G [#] // MSE					
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias			x ² +
		N	Det	Total	
I	pro ⁺	0	1	1	12,25*
	pro	10	5	15	
	paba ⁺	0	2	2	9,00*
	paba	10	4	14	
II	w ⁺	1	4	5	
	w	9	2	11	
III	gal ⁺	5	1	6	1,00n.s.
	gal	5	5	10	
IV	pyro ⁺	4	4	8	0,00n.s.
	pyro	6	2	8	
V	fac ⁺	10	4	14	9,00*
	fac	0	2	2	
VI	s ⁺	2	1	3	6,25*
	s	8	5	13	
VII	nic ⁺	4	5	9	0,25n.s.
	nic	6	1	7	
VIII	ribo ⁺	0	6	6	1,00n.s.
	ribo	10	0	10	

+ : valores de x² considerado proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

++ : dados na tabela 54

n.s.: não significativo

N : fenótipo normal

Det : fenótipo deteriorado

TABELA 38 - Estudo da Associação dos Grupos de Ligação ao Determinante de Deterioração - Análise Mitótica - Linhagem G[#]

MARCADORES	SEGREGAÇÃO		Nº DE COLÔNIAS
ribo ⁺ pro ⁺	1	11	16
ribo ⁺ pro ⁻	5		
ribo ⁻ pro ⁻	10	5	16
ribo ⁻ pro ⁺	0		
ribo ⁺ paba ⁺	2	12	16
ribo ⁺ paba ⁻	4		
ribo ⁻ paba ⁻	10	4	16
ribo ⁻ paba ⁺	0		
ribo ⁺ gal ⁺	1	6	16
ribo ⁺ gal ⁻	5		
ribo ⁻ gal ⁻	5	10	16
ribo ⁻ gal ⁺	5		
ribo ⁺ pyro ⁺	4	8	16
ribo ⁺ pyro ⁻	2		
ribo ⁻ pyro ⁻	4	8	16
ribo ⁻ pyro ⁺	6		
ribo ⁺ fac ⁺	4	14	16
ribo ⁺ fac ⁻	2		
ribo ⁻ fac ⁻	10	2	16
ribo ⁻ fac ⁺	0		
ribo ⁺ s ⁺	1	3	16
ribo ⁺ s ⁻	5		
ribo ⁻ s ⁻	2	13	16
ribo ⁻ s ⁺	8		
ribo ⁺ nic ⁺	4	8	16
ribo ⁺ nic ⁻	2		
ribo ⁻ nic ⁻	4	8	16
ribo ⁻ nic ⁺	6		

TABELA 39 - Análise meiótica - Linhagem G[#]

Cruzamento G# x MSE							
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias			χ ² +	c (%)	s (%)
		N	Fluffy	Total			
I	pro ⁺	12	40	52	0,004n.s.	64,1	4,73
	pro	26	25	51			
	paba ⁺	11	40	51	0,004n.s.	65,0	4,70
	paba	27	25	52			
II ⁺⁺							
III	gal ⁺	34	55	89	54,61*	42,7	4,87
	gal	4	10	14			
IV	pyro ⁺	35	56	91	60,59*	42,7	5,64
	pyro	3	9	12			
V	fac ⁺	27	52	79	29,34*	38,83	4,80
	fac	11	13	24			
VI	s ⁺	38	63	101	95,20*	38,83	4,80
	s	0	2	2			
VII	nic ⁺	37	60	97	80,40*	40,78	4,84
	nic	1	5	6			
VIII	ribo ⁺	38	63	101	95,20*	38,83	4,80
	ribo	0	2	2			

+ : valores de χ^2 considerado proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

++ : dados na tabela 54

n.s.: não significativo

N : fenótipo normal

Fluffy : fenótipo cotonoso

TABELA 40 - Análise meiótica - Linhagem G#.1

Linhagem G#.1 // MSE			
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias	χ^2 +
I	pro ⁺	79	28,04
	pro	25	
	paba ⁺	67	30,16*
	paba	24	
II ⁺⁺			
III	gal ⁺	67	8,65*
	gal	37	
IV	pyro ⁺	60	2,46n.s.
	pyro	44	
V	fac ⁺	59	1,88n.s.
	fac	45	
VI	s ⁺	91	58,50*
	s	13	
VII	nic ⁺	63	4,65*
	nic	41	
VIII	ribo ⁺	77	24,04*
	ribo	27	

+ : valores de χ^2 considerando proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s.: não significativo

++ : dados na tabela 54

TABELA 41 - Análise mitótica - Linhagem A

Linhagem A // HV94		
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias
I	pro ⁺	0
	pro	37
	paba ⁺	0
	paba	37
II	w ⁺	37
	w	0
III	gal ⁺	37
	gal	0
IV	pyro ⁺	37
	pyro	0
V	fac ⁺	34
	fac	2
VI	s ⁺	37
	s	0
VII	nic ⁺	37
	nic	0
VIII	ribo ⁺	37
	ribo	0

+ : valores de χ^2 considerando proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s.: não significativo

TABELA 42 - Análise meiótica - Linhagem A

Cruzamento A x HV94							
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias			χ^2	c (%)	s (%)
		N	Det	Total			
I	pro ⁺	45	16	61	4,37*	53,5	4,96
	pro	31	9	40			
	paba ⁺	51	18	69	13,55*	57,4	4,92
	paba	25	7	32			
II ⁺⁺							
III	gal ⁺	61	13	74	21,90*	27,72	4,45
	gal	15	12	27			
IV	pyro ⁺	56	18	74	37,62*	37,62	4,82
	pyro	20	7	27			
V	fac ⁺	55	11	66	9,51	31,68	4,63
	fac	21	14	35			
VI	s ⁺	75	16	91	64,96	16,83	3,72
	s	1	9	10			
VII	nic ⁺	54	15	69	13,55*	36,63	4,79
	nic	22	10	32			
VIII	ribo ⁺	40	10	50	0,01n.s.	45,50	4,96
	ribo	36	15	51			

+ : valores de χ^2 considerando proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s.: não significativo

++ : dados na Tabela 54

N : fenótipo normal

Det : fenótipo deteriorado

TABELA 43 - Análise mitótica - Linhagem V₅

Cruzamento V ₅ // HV94					
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de		Colônias Total	χ ² +
		N	Det		
I	pro ⁺	85	2	87	47,12*
	pro	17	0	17	
	paba ⁺	86	2	88	49,85*
	paba	16	0	16	
II	w ⁺	50	1	51	
	w	52	1	53	
III	gal ⁺	89	1	90	55,54*
	gal	13	1	14	
IV	pyro ⁺	78	1	79	28,04*
	pyro	24	1	25	
V	fac ⁺	76	2	78	26,00*
	fac	26	0	26	
VI	s ⁺	89	2	91	60,59*
	s	12	0	12	
VII	nic ⁺	82	2	84	39,38*
	nic	20	0	20	
VIII	ribo ⁺	90	2	92	61,54*
	ribo	12	0	12	

+ : valores de χ² considerando proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s.: não significativo

N : fenótipo normal

Det : fenótipo deteriorado

TABELA 44 - Análise meiótica - Linhagem V₅

Linhagem V ₅ x HV94					
Grupo de Ligação	Marcadores	Número de Colônias			χ ²
		N	Det	Total	
I	pro ⁺	49	18	67	8,65*
	pro	35	2	37	
	paba ⁺	56	16	72	15,38*
	paba	28	4	32	
II ⁺⁺					
III	gal ⁺	55	13	68	9,85*
	gal	29	7	36	
IV	pyro ⁺	61	17	78	26,00*
	pyro	23	3	26	
V	fac ⁺	47	11	58	1,38n.s.
	fac	37	9	46	
VI	s ⁺	79	19	98	81,38*
	s	5	1	6	
VII	nic ⁺	64	14	78	26,00*
	nic	20	6	26	
VIII	ribo ⁺	66	15	81	32,34*
	ribo	18	5	23	

+ : valores de χ^2 considerando proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s.: não significativo

++ : dados na tabela 54

N : fenótipo normal

Det : fenótipo deteriorado

TABELA 45 - Análise mitótica - Linhagem C₁₀

Linhagem C ₁₀ // HV94					
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº N	de Det	Colônias Total	χ^2 +
I	pro ⁺	14	7	21	9,84*
	pro	4	1	5	
	paba ⁺	14	7	21	9,84*
	paba	4	1	5	
II	w ⁺	14	2	16	1,35n.s.
	w	4	6	10	
III	gal ⁺	17	2	19	5,54*
	gal	1	6	7	
IV	pyro ⁺	18	6	24	18,62*
	pyro	0	2	2	
V	fac ⁺	12	7	19	5,54*
	fac	6	1	7	
VI	s ⁺	17	6	23	15,38*
	s	1	2	3	
VII	nic ⁺	15	1	16	1,38n.s.
	nic	3	7	10	
VIII	ribo ⁺	16	6	22	12,46*
	ribo	2	2	4	

+ : valores de χ^2 considerando proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s.: não significativo

N : fenótipo normal

Det : fenótipo deteriorado

TABELA 46 - Análise meiótica - Linhagem C₁₀

Cruzamento C ₁₀ x HV94							
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias			χ ² +	c (%)	s (%)
		N	Det	Total			
I	pro ⁺	64	13	77	24,04*	70,19	4,49
	pro	18	9	27			
	paba ⁺	63	15	78	26,00*	67,31	4,60
	paba	19	7	26			
II ⁺⁺							
III	gal ⁺	71	14	85	41,88*	24,04	4,19
	gal	11	8	19			
IV	pyro ⁺	61	17	78	27,27*	35,58	4,69
	pyro	20	5	25			
V	fac ⁺	68	12	80	30,15*	25,00	4,25
	fac	14	10	24			
VI	s ⁺	79	22	101	92,35*	24,04	4,19
	s	3	0	3			
VII	nic ⁺	54	13	67	8,65*	39,42	4,79
	nic	28	9	37			
VIII	ribo ⁺	63	16	79	28,04*	33,65	4,63
	ribo	19	6	25			

+ : valores de χ² considerando proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s.: não significativo

++ : dados na Tabela 54

N : fenótipo normal

Det : fenótipo deteriorado

TABELA 47 - Análise mitótica - Linhagem C₁₂

Linhagem C ₁₂ // HV94					
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº N	de Det	Colônias Total	χ^2 +
I	pro ⁺	21	0	21	11,56*
	pro	2	2	4	
	paba ⁺	23	0	23	17,64*
	paba	0	2	2	
II	w ⁺	7	1	8	
	w	16	1	17	
III	gal ⁺	21	2	23	17,64*
	gal	2	0	2	
IV	pyro ⁺	14	1	15	1,00n.s.
	pyro	9	1	10	
V	fac ⁺	20	0	20	9,00*
	fac	3	2	5	
VI	s ⁺	15	0	15	1,00n.s.
	s	8	2	10	
VII	nic ⁺	12	0	12	0,04n.s.
	nic	11	2	13	
VIII	ribo ⁺	14	0	14	0,36n.s.
	ribo	9	2	11	

+ : valores de χ^2 considerando proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s.: não significativo

N : fenótipo normal

Det : fenótipo deteriorado

TABELA 48 - Análise meiótica - Linhagem C₁₂

Cruzamento C ₁₂ x HV94							
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias			χ ²	c (%)	s (%)
		N	Det	Total			
I	pro ⁺	50	39	89	30,51*	52,54	4,60
	pro	23	6	28			
	paba ⁺	60	34	94	40,00*	40,33	4,50
	paba	14	11	25			
II ⁺⁺							
III	gal ⁺	54	21	75	8,07*	65,55	4,35
	gal	20	24	44			
IV	pyro ⁺	49	33	82	17,93*	51,69	4,60
	pyro	24	12	36			
V	fac ⁺	49	18	67	1,89n.s.	63,87	4,40
	fac	25	27	52			
VI	s ⁺	68	38	106	72,03*	63,03	4,43
	s	6	7	13			
VII	nic ⁺	55	27	82	17,02*	61,34	4,46
	nic	19	18	37			
VIII	ribo ⁺	49	22	71	4,88*	59,66	4,50
	ribo	25	22	47			

⁺ : valores de χ^2 considerando proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s.: não significativo

++ : dados na Tabela 54

N : fenótipo normal

Det : fenótipo deteriorado

TABELA 49 - Análise mitótica - Linhagem G[#]

Linhagem G [#] // HV94					
Grupo de Ligação	Marcadores	<u>Nº</u> N	<u>de</u> Det	<u>Colônias</u> Total	χ^2 +
I	pro ⁺	0	0	0	11,00*
	pro	10	1	11	
	paba ⁺	0	0	0	11,00*
	paba	10	1	11	
III	gal ⁺	3	1	4	0,82n.s.
	gal	7	0	7	
IV	pyro ⁺	7	0	7	0,82n.s.
	pyro	3	1	4	
V	fac ⁺	9	1	10	7,36*
	fac	1	0	1	
VI	s ⁺	6	1	7	0,82n.s.
	s	4	0	4	
VII	nic ⁺	4	1	5	0,10n.s.
	nic	6	0	6	
VIII	ribo ⁺	7	0	7	0,82n.s.
	ribo	3	1	4	

+ : valores de χ^2 considerando proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s.: não significativo

++ : dados na Tabela 54

N : fenótipo normal

Det : fenótipo deteriorado

TABELA 50 - Análise meiótica - Linhagem G[#]

Cruzamento G [#] x HV94							
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias			χ ²	c (%)	s (%)
		N	Det	Total			
I	pro ⁺	36	20	56	0,62n.s.	63,46	4,72
	pro	46	2	48			
	paba ⁺	38	21	59	1,88n.s.	62,50	4,75
	paba	44	1	45			
II ⁺⁺							
III	gal ⁺	67	7	36	22,15*	80,76	3,87
	gal	13	15	28			
IV	pyro ⁺	67	12	79	28,02*	74,04	4,30
	pyro	15	10	25			
V	fac ⁺	65	14	79	28,04*	70,19	4,49
	fac	17	8	25			
VI	s ⁺	73	10	83	36,98*	81,73	3,79
	s	9	12	21			
VII	nic ⁺	72	10	82	34,62*	80,77	3,86
	nic	10	12	22			
VIII	ribo ⁺	72	8	80	30,15*	82,69	3,31
	ribo	25	22	47			

+ : valores de χ^2 considerando proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s.: não significativo

++ : dados na Tabela 54

N : fenótipo normal

Det : fenótipo deteriorado

TABELA 51 - Análise meiótica - Linhagem G[#]

Cruzamento G# x HV94							
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias			χ ²	c (%)	s (%)
		N	Fluffy	Total			
I	pro ⁺	15	41	56	0,62n.s.	46,15	4,89
	pro	7	41	48			
	paba ⁺	16	43	59	1,88n.s.	47,12	4,89
	paba	6	39	45			
II ⁺⁺							
III	gal ⁺	12	64	76	22,15*	28,85	4,44
	gal	10	18	28			
IV	pyro ⁺	14	65	79	28,04*	29,81	4,49
	pyro	8	17	25			
V	fac ⁺	17	62	79	28,04*	35,58	4,71
	fac	5	20	25			
VI	s ⁺	15	69	84	39,38*	26,92	4,35
	s	7	13	20			
VII	nic ⁺	11	71	82	34,62*	21,15	4,00
	nic	11	11	22			
VIII	ribo ⁺	11	69	80	30,15*	23,08	4,13
	ribo	11	13	24			

+ : valores de χ^2 considerando proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s.: não significativo

++ : dados na Tabela 54

N : fenótipo normal

Fluffy: fenótipo cotonoso

TABELA 52- Análise mitótica - Linhagem G^{#.1}

Linhagem G ^{#.1} // HV94				
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias	χ^2	
I	pro ⁺	22	16,67*	
	pro	2		
	paba ⁺	23	20,17*	
	paba	1		
II	w ⁺	2		
	w	22		
III	gal ⁺	15	1,4n.s.	
	gal	9		
IV	pyro ⁺	11	0,17n.s.	
	pyro	13		
V	fac ⁺	21	13,5*	
	fac	3		
VI	s ⁺	13	0,17n.s.	
	s	11		
VII	nic ⁺	15	1,50n.s.	
	nic	9		
VIII	ribo ⁺	18	6,00*	
	ribo	6		

+ : valores de χ^2 considerando proporção 1:1

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s.: não significativo

TABELA 53 - Análise meiótica - Linhagem G[#].1

Cruzamento G [#] .1 x HV94				
Grupo de Ligação	Marcadores	Nº de Colônias	χ^2	
I	pro ⁺	80	43,47*	
	pro	21		
	paba ⁺	82	39,29*	
	paba	19		
II ⁺⁺				
III	gal ⁺	82	39,29*	
	gal	19		
IV	pyro ⁺	73	21,16*	
	pyro	27		
V	fac ⁺	74	21,87*	
	fac	27		
VI	s ⁺	99	93,16*	
	s	2		
VII	nic ⁺	78	31,36*	
	nic	22		
VIII	ribo ⁺	89	58,70*	
	ribo	12		

+ : valores de χ^2 considerando proporção 1:1

++: dados na tabela 54

* : significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s.: não significativo

Tabela 54 - Segregantes Obtidos no Ciclo Sexual

Proporção de Morfologias

CRUZAMENTOS	S E G R E G A N T E S		TOTAL	χ^2
	NORMAIS	DETERIORADOS		
V ₅ x MSE ⁺	433	247	680	50,88*(1:1)
C ₁₀ x MSE	723	14	740	685,00*(1:1)
C ₁₂ x MSE	273	95	368	0,13n.s. (3:1)
C ₁₀ x HV94	98	44	144	2,71n.s. (3:1)
C ₁₂ x HV94	244	156	400	19,368(1:1)
G [#] x HV94	159	36	195	4,44*(3:1)
CRUZAMENTOS	Y + G	W	Total	χ^2
A x MSE ⁺	692	752	1444	2,49n.s. (1:1)
V ₅ x MSE ⁺	501	670	1171	24,39* (1:1)
C ₁₀ x MSE ⁺	697	497	1194	33,50* (1:1)
C ₁₂ x MSE ⁺	290	162	452	36,24* (1:1)
G [#] x MSE	52	30	82	5,90* (1:1)
G ^{#.1} x MSE	906	566	1472	78,53* (1:1)
C ₁₀ x HV94	48	50	98	0,04n.s. (1:1)
C ₁₂ x HV94	64	136	200	25,92* (1:1)

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s. = não significativo

+ = dados de dois cruzamentos

+ G = amarelos e verdes

W = brancos

6.4. Obtenção de Protoplastos

Obteve-se de cada linhagem protoplastizada a seguinte concentração de protoplastos (Tabela 55); suficiente para se proceder à fusão, conforme metodologia adotada nas linhagens A, V₅, C₁₂, G[#] e MSE.

Tabela 55 - Concentração de protoplastos

Linhagem	Concentração / ml
A	$4,8 \times 10^7$
V ₅	$4,0 \times 10^6$
C ₁₀	*
C ₁₂	$3,2 \times 10^6$
G [#]	$1,0 \times 10^7$
MSE	$8,0 \times 10^8$

* Não se considerou o valor obtido porque a suspensão de protoplastos apresentou muitas impurezas (restos de micélio) de forma que isto dificultou a estimativa precisa da concentração de protoplastos/ml.

6.5. Fusão de Protoplastos

Procedeu-se à fusão de protoplastos conforme o esquema da Tabela 56. Entretanto observou-se apenas a formação de heterocários, inclusive da linhagem C₁₀, em ambas as repetições deste experimento.

Tabela 56 - Esquema para fusão de protoplastos

Linhagens revertentes p/ cor verde	C ₁₀	e	MSE	(Linhagem Normal)
	C ₁₂	e	MSE	(Linhagem Normal)
	G [#]	e	MSE	(Linhagem Normal)
Linhagem Deteriorada	V ₅	e	MSE	(Linhagem Normal)
Linhagem Normal c/ Duplicação	A	e	MSE	(Linhagem Normal)

6.6. Eletroforese de Proteínas

Submeteu-se as linhagens A, V₅, C₁₀, C₁₂, G[#] e G^{#.1} à eletroforese de proteínas totais e esterases, comparando-se os valores padrões obtidos no cultivo em MC, MC KCl e MC KClTP. Os resultados são apresentados na tabela 57 e Figuras 4 a 9.

Tabela 57 - Concentração de proteínas totais nos extratos de micélio (µl/ml)

Meio de cultura/ Linhagem	MC	MC KCl	MCKClTP
A	452	374	129
V ₅	339	374	471
C ₁₀	904	293	278
C ₁₂	319	132	301
G [#]	542	102	82
G [#] .1	362	181	139
HV94	132	178	190

FIGURA 6. Linhagens HV94, A e V5 (esquerda para direita) em Meio Completo (linha inferior) e Meio Completo com KCl 0,6M (linha superior).

FIGURA 7 - Linhagem A (foto superior) e V₅ (foto inferior) cultivadas em: linha superior MC; MCKC1 0,2M; MCKC1 0,4M; MCKC1 0,6M - inferior MCKC1 0,8M; MCKC1 1,0M; MCKC1 1,2M e MCKC1 2,4M (esquerda para direita).

FIGURA 8 - Linhagens Cultivadas em Meio Completo
Eletoforese: α - Esterase (foto superior) Proteínas Totais (foto inferior)
Linhagens:
A, G[#], G[#].1, V₅, C₁₀, C₁₂, HV94, (esquerda para direita), na foto inferior o padrão encontra-se na primeira coluna a esquerda.

FIGURA 9 - Linhagens Cultivadas em Meio Completo com Estabilizador Osmótico (KCl 0,6M)
 Eletroforese: α - Esterase (foto superior) Proteínas Totais (foto inferior)
 Linhagens:
 A, G[#], G[#].1, V5, C10, C12, HV94, (esquerda para direita), na foto inferior o padrão encontra-se na primeira coluna a esquerda.

FIGURA 10 - Linhagens Cultivadas em Meio Completo com Estabilizador Osmótico (KCl 0,6M) e Tampão Fosfato
 Eletroforese: α - Esterase (foto superior) Proteínas Totais (foto inferior)
 Linhagens:
 A, G[#], G[#].1, V₅, C₁₀, C₁₂, HV94, (esquerda para direita), na foto inferior o padrão encontra-se na primeira coluna a esquerda.

7. Discussão:

7.1. Caracterização preliminar das linhagens estudadas.

Os ensaios integrantes do presente trabalho envolveram a linhagem A, de fenótipo normal verde, portadora de duplicação cromossômica, variantes deteriorados originados da linhagem A e linhagens revertentes para a cor verde, obtidas a partir de V₅, por exposição à luz ultra-violeta.

As linhagens revertentes foram caracterizadas quanto à auxotrofia para prolina e ácido p-aminobenzoico para se afastar a hipótese destas serem contaminantes e não revertentes do V₅. Os resultados obtidos (Tabela 2) confirmaram marcas auxotróficas iguais às da linhagem V₅ (pro⁻, paba⁻).

Conduziu-se também um teste de estabilidade com a colônia revertente G[#], a qual apresentou em média 6 setores por colônia (Tabela 3). Os setores obtidos caracterizaram-se enquanto "fluffy", verdes, amarelos, brancos ou marrons. Devido a esta instabilidade procurou-se

obter, a partir de colônias monospóricas de G[#], uma linhagem verde mais estável, a qual foi obtida e isolada com a designação de G[#].1. Esta passou a integrar alguns dos ensaios conduzidos posteriormente, junto com as demais linhagens revertentes estudadas.

Antes das análises genéticas, efetuou-se uma auxanografia para os marcadores de todos os cromossomos visando conferir as deficiências nutricionais das linhagens que seriam utilizadas como parentais. Os resultados confirmaram seus fenótipos anteriores.(Tabela 19).

7.2. Ensaios de Fenocópia

7.2.1. Fenótipo cor em função do Tampão Fosfato e Estabilizador Osmótico (KCl 0,6M) em Linhagens Haplóides Normal e Deterioradas.

Neste ensaio foram empregados 6 variantes deteriorados além da linhagem A de fenótipo normal, portadora de duplicação cromossômica.

Em ensaios anteriores aos deste trabalho (MOLINA & AZEVEDO, 1989) sempre que se empregou algum estabilizador osmótico, este foi adicionado ao meio de cultura juntamente com o tampão fosfato, de modo que não

foi possível isolar o efeito dos diferentes estabilizadores osmóticos já testados, de um possível efeito do Tampão Fosfato.

Desta forma, no presente ensaio foram utilizados 4 meios de cultura diferentes: MC (5.2.2); MCKCl (5.2.9) MCTP (5.2.13) e MCTPKCl (5.2.8).

Os resultados indicaram que a reversão para a cor verde (V₅) ou amarela (demais linhagens deterioradas) só se verificou em presença de KCl, ou seja do estabilizador osmótico. A presença do tampão fosfato entretanto, determinou uma reversão parcial para a cor amarela (Tabela 4, Texto).

É interessante observar que as linhagens deterioradas V97 e V98 foram previamente caracterizadas em MCKClTP(5.2.8) como sendo verdes. As linhagens V98.1, V99 e V100, por sua vez, já se apresentaram amarelas anteriormente (MOLINA, não publicado, IC/FAPESP, 1987/88). Talvez o tempo de estoque associado à instabilidade mitótica característica às linhagens deterioradas não tenha possibilitado a manutenção das características originais destas linhagens (a duplicação cromossômica necessária à cor verde). Por outro lado a expressão desta (cor) pode estar sendo impedida por algum outro fator (provavelmente ambiental) não considerado, de forma que se verificou

nestas linhagens (V97 e V98) a correção do fenótipo apenas até o nível da cor amarela.

A análise estatística dos valores de esporulação (Tabela 5, Texto ; 1 e 2, Anexo) demonstrou que a linhagem A manteve-se superior em todos os meios estudados. As demais linhagens não diferiram entre si (Tabela 2, Anexo). Entretanto, observou-se que as médias obtidas entre os diferentes meios apresentaram valores diferindo significativamente entre si. Neste caso, a esporulação obtida em MCKC1TP (5.2.8) foi superior às demais; a seguir, verificaram-se os valores para MCKC1 (5.2.9) e MCTP (5.2.13) e por último, estatisticamente inferior aos demais meios, a esporulação obtida no MC (5.2.2). (Tabela 3, Anexo).

A alteração no meio de cultura não interferiu significativamente para as linhagens V98, V99 e V100 (Tabelas 3 a 10, Anexo). Entretanto, a presença de Tampão Fosfato e estabilizador osmótico (KCl 0,6 M) no meio de cultura influenciou positivamente na esporulação das linhagens, quando consideradas em conjunto. (Tabela 3, Anexo).

Os valores referentes ao diâmetro das colônias (Tabela 6, Texto) demonstraram que as maiores médias de crescimento ocorreram no MCTP (5.2.13) e MCKC1TP (5.2.8), (Tabela 13, Anexo). Por outro lado, as médias obtidas no próprio MCKC1TP (5.2.8), no MCKC1 (5.2.9) e MC

(5.2.2), também não diferiram estatisticamente entre si. O mesmo ocorreu para a linhagem V5, especificamente. Para as demais linhagens o fator meio de cultura não determinou alterações significativas na esporulação (Tabelas 13 a 19, Anexo).

A adição simultânea de Tampão Fosfato (5.3.8) e KCl 0,6M, (5.2.9) ao meio de cultura determinou maior crescimento das colônias e maior produção de esporos, não superando entretanto, as diferenças observadas entre a linhagem normal (A) e as deterioradas, constatadas em MC (5.2.2).

7.2.2. Fenótipo Cor em Função do Estabilizador Osmótico e Tampão Fosfato em Linhagens Diplóides Normal e Deteriorada.

Para se testar o efeito de diferentes estabilizadores osmóticos em presença e ausência de Tampão Fosfato (5.3.8) sobre o fenótipo de linhagens diplóides empregou-se dois isolados obtidos de um mesmo tipo de heterocário, constituído pelas linhagens haplóides MSE e C₁₂ ; C₁₂//MSE e Det C₁₂//MSE respectivamente com fenótipo normal e deteriorado.

Observou-se que diferentes estabilizadores osmóticos interferem na expressão da cor verde, constatada originalmente em MM para a linhagem C₁₂//MSE. (Tabela 7, Texto). Os polissacarídeos quando empregados como estabilizadores osmóticos determinaram a expressão da cor amarela (conferir item 7.2.1).

No diplóide deteriorado a reversão total do fenótipo ocorreu apenas para os sais, sendo parcial no caso dos polisacarídeos empregados como estabilizadores osmóticos. Por outro lado, a expressão da cor verde ocorreu apenas em presença dos sais inorgânicos, verificando-se somente tons amarelados mediante o emprego de polissacarídeos. Uma vez que a correção até a cor verde ou apenas até o amarelo ocorreu respectivamente para dois diferentes sais inorgânicos e dois diferentes polissacarídeos, pode-se sugerir que a correção do fenótipo esteja associada antes à estrutura molecular, inclusive a seu tamanho, do que à ação específica de componentes dos estabilizadores osmóticos enquanto nutrientes, por exemplo. Talvez o pequeno tamanho das moléculas dos sais permita maior eficiência de transporte pela membrana, em relação aos polissacarídeos.

Cabe ressaltar a ação epistática entre os genes que determinam a cor amarela e verde, de tal forma que a expressão do gene responsável pela transformação do

pigmento amarelo em verde pode envolver características específicas aos estabilizadores osmóticos constituídos por sais enquanto que a ação gênica necessária à transformação da cor branca em amarela pode eventualmente ocorrer em presença de estabilizadores osmóticos constituídos de sais inorgânicos ou de polissacarídeos.

Neste ensaio foram comparadas as médias dos diâmetros das colônias (Tabela 8, Texto) obtendo-se, do mesmo modo que para as linhagens haplóides (item 7.2.1) um desempenho superior da linhagem normal em todos os tratamentos (Tabela 21, Anexo). Entretanto, considerando-se cada um dos meios testados (Tabelas 22 a 29, Anexo), seu desempenho só se mostrou estatisticamente superior para os estabilizadores sorbitol 1,2M (5.2.11) e sacarose 0,6M (5.2.12).

Comparando-se as médias dos meios de cultura (Tabela 30, Anexo) obteve-se que o MMgSO_4 0,6M (5.2.10, para MM); MM (5.2.1); MMSORBITOL 0,6M (5.2.11, para MM) e MMSACAROSE 0,6M (5.2.12, para MM) apresentaram as médias superiores não diferindo estatisticamente entre si. Os níveis inferiores foram observados em MMSACAROSE 1,2M (5.2.12, para MM) e MMKCl 1,2M (5.2.9, para MM).

De um modo geral observou-se que a adição de estabilizadores osmóticos não aumentou significativamente a esporulação, com exceção do $MgSO_4$ 0,6M (Tabela 30, 31 e 32, Anexo).

A presença de Tampão Fosfato (5.3.8), por sua vez, elevou significativamente a esporulação (Tabela 33, Anexo), tanto na linhagem normal, C_{12}/MSE (Tabela 34, Anexo), como na deteriorada, $Let C_{12}/MSE$ (Tabela 35, Anexo).

7.2.3. Efeito dos Estabilizadores Osmóticos e Tampão Fosfato sobre as Linhagens Haplóides A e V_5 .

Este ensaio foi conduzido com o objetivo de estabelecer comparações em relação a linhagens diplóides (item 7.2.2) e de confirmar e quantificar as observações efetuadas por MOLINA & AZEVEDO (1989) com linhagens haplóides.

Da mesma forma que em linhagens diplóides, o tipo de estabilizador osmótico utilizado interferiu na cor que se manifestou pela reversão do fenótipo deteriorado para normal. Além disto, os polissacarídeos atuam com menos eficiência na redução das irregularidades características da superfície de colônias deterioradas (Tabela 9, Texto).

Como nos ensaios anteriores (7.2.1. e 7.2.2) a esporulação média da linhagem A foi superior à média de V_5 . (Tabela 10, Texto; 37, Anexo). Tal superioridade deve-se à significância estatística nos meios MCKCl 0,6M e 1,2M (5.2.9); $MCMgSO_4$ 0,6M e 1,2M (5.2.10). (Tabelas 38 a 46, Anexo).

Entre os meios observou-se produção superior em MCKCl 0,6M (5.2.9), seguido de MC (5.2.2) que não diferem estatisticamente entre si (Tabela 47, Anexo) para as médias gerais de ambas as linhagens. O mesmo se verificou para a linhagem A (Tabela 48, Anexo). Na linhagem V_5 observou-se superioridade estatística para a esporulação no MCKCl 0,6M (5.2.9) a qual diferiu dos valores obtidos em todos os outros meios. Os demais meios de cultura não diferiram entre si, sendo que o MC (5.2.2) apresentou-se em sexto lugar. (Tabela 49, Anexo).

As Tabelas 50 e 51 (Anexo) evidenciam a interferência do Tampão Fosfato (5.3.8) na eficiência relativa de cada meio de cultura sobre a esporulação. O mesmo se verificou para cada linhagem individualmente (Tabelas 52 a 55, Anexo). No cômputo geral, a presença de Tampão Fosfato determinou divergências estatisticamente significativas nas médias de esporulação (Tabela 56, Anexo).

A análise da variável diâmetro das colônias, demonstrou não haver diferenças significativas entre as linhagens normal e deteriorada (Tabela 57, Anexo).

Entre os diferentes meios entretanto, houve diferenças significativas para as médias de crescimento, conforme demonstrado nas Tabelas 58, 59 e 60 (Anexo).

A presença do Tampão Fosfato por sua vez, demonstrou influir positiva e significativamente no diâmetro das colônias (Tabelas 61, 62 e 63, Anexo). Isto se confirma também na observação das médias de crescimento em cada meio, em presença e ausência de Tampão Fosfato (5.3.8), Tabelas 64 e 65 (Anexo). Nestas duas últimas tabelas observou-se que em presença de Tampão Fosfato o MC (5.2.2) determina uma média de crescimento significativamente inferior às demais, as quais, por sua vez, não diferem entre si.

Cabe acrescentar ainda que o MCSORBITOL 0,6M (5.2.11) apresentou crescimento superior em todos os tratamentos observados.

7.2.4. Fenótipo Cor em Função do Gradiente de Concentração de KCl em Linhagens Deterioradas e Revertentes.

Na Tabela 12 e Figura 7, pode-se observar que a linhagem A manteve seu fenótipo verde quando submetida a diferentes concentrações do Estabilizador Osmótico KCl (5.2.9), entretanto, este se apresentou caracteristicamente mais escuro .

A linhagem V₅, deteriorada no MC (5.2.2) apresentou uma progressiva correção do fenótipo cor, acompanhando o gradiente de concentração do estabilizador osmótico empregado, (Tabela 12, Texto; Figura 7).

As linhagens revertentes verdes C₁₀ e G[#] mantiveram sua cor, exceto a 2,4M, quando a concentração do estabilizador osmótico determinou sua alteração, bem como, demais características morfológicas características das linhagens deterioradas (Tabela 12, Texto).

A linhagem C₁₂, revertente para a cor verde, com fenótipo instável (sensível à temperatura), apresentou um padrão de correção para o verde amarelado, tanto mais normal quanto maior a concentração do estabilizador osmótico (Tabela 12, Texto).

A partir de 1,2M entretanto, esta tendência se inverteu e as colônias tornaram a apresentar superfície "enrugada".

A linhagem HV94, aparentemente deteriorada embora apresentando marcadores genéticos da linhagem normal haplóide MSE, não apresentou reversão do fenótipo cor em nenhum dos meios aqui estudados (Tabela 12, Texto e Figura 6).

A produção de esporos difere estatisticamente entre as linhagens estudadas (Tabela 13, Texto; 66 e 67, Anexo), sendo sempre superiores as médias apresentadas pela linhagem C₁₀ (revertente) e inferiores as médias de esporulação de linhagem V₅ (Tabela 67 a 71, Anexo). Isto se verifica no MC (5.2.2) e nos demais meios, de KCl 0,2M até 0,6M (5.2.9)

Para os meios com KCl 0,8M e 1,0M (5.2.9), a linhagem A passa a ser inferior e C₁₂ a superior (Tabelas 72 e 73, Anexo).

Nas concentrações de KCl 1,2M e 2,4M (5.2.9) ocorreu drástica e progressiva redução da esporulação e as médias das linhagens não diferiram entre si (Tabelas 74 e 75, Anexo).

Nas linhagens A e V₅, as médias de esporulação não diferiram em função do gradiente na concentração do estabilizador osmótico (Tabelas 77 e 78 respectivamente; Anexo). Entretanto em A ocorreu um decréscimo progressivo da produção de esporos à medida em que foi aumentada a concentração do estabilizador osmótico. Em V₅, ao contrário, o MC (5.2.2) apresentou a menor produção de esporos. As maiores médias, por sua vez, ocorreram à concentração de 0,8M de KCl. Para a linhagem deteriorada V₅ as melhores médias de esporulação ocorreram nas faixas de concentração intermediárias.

As linhagens revertentes verdes, C₁₀, C₁₂ e G[#] apresentaram, em todos os casos, diferenças estatisticamente significativas quanto à produção de esporos, concentrando-se as menores médias nas maiores concentrações de KCl. Em C₁₂, entretanto, MC (5.2.2) ocorreu uma baixa esporulação, intermediária à verificada em KCl 1,2M e 2,4M (5.2.9). (Tabelas 79 a 81, Anexo).

A Tabela 82 (Anexo) apresenta as médias de esporulação para a linhagem HV94, que não diferem estatisticamente entre si.

Em síntese, a esporulação das linhagens revertentes é afetada significativamente pela alteração da concentração do estabilizador osmótico, chegando a superar a produção da linhagem normal A (Tabela 67 e seguintes,

Anexo). A partir da concentração 0,4M de KCl até 1,2M (5.2.9), todas as linhagens revertentes apresentam médias de esporulação superiores às da linhagem A, cujos valores passam a ser os menores.

As linhagens V₅ e HV94, com fenótipo deteriorado em MC (5.2.2), bem como a linhagem duplicada A, com fenótipo normal em MC (5.2.2) não tiveram sua produção de esporos afetada pela concentração de KCl, a níveis estatisticamente significativos.

Em relação ao diâmetro das colônias (Tabela 14, Texto) observou-se diferenças estatísticas entre as médias das linhagens (Tabelas 82 e 83, Anexo). Entretanto em MC (5.2.2), MC 0,2M a 0,8M (5.2.9) estas não diferem estatisticamente entre si (Tabelas 85 a 89, Anexo). Nas concentrações de KCl 1,0M e 1,2M, a linhagem V₅ apresentou-se superior e a linhagem A, inferior (Tabelas 90 e 91, Anexo).

De um modo geral observou-se que a presença do estabilizador osmótico favorece a linhagem deteriorada (V₅), já que esta apresentou-se com os menores diâmetros em MC (5.2.2). (Tabelas 85 a 92, Anexo).

Para todas as linhagens estudadas entretanto as maiores concentrações (acima de 1,0M de KCl) corresponderam aos menores diâmetros (Tabelas 93 a 99, Anexo).

7.2.5. Fenótipo Cor em Função da Privação de Nutrientes (a partir de MC), em Linhagens Normal e Deteriorada em Presença e Ausência do Estabilizador Osmótico KCl 0,6M.

Retirando-se componentes do MC (5.2.2) em presença ou ausência do estabilizador osmótico KCl 0,6M (5.2.9), verificou-se na linhagem A, verde e portanto normal, a FENOCÓPIA DE DETERIORADO em MC (5.2.2) sem $ZnSO_4$ e sem KCl 0,6M. Na presença deste não ocorreu a citada fenocópia. O mesmo se verificou, ainda que parcialmente, para a ausência de $FeSO_4$ (Tabela 15, Texto). É possível entretanto, estabelecer um paralelo entre este fenótipo e aquele verificado na ausência de cobre, co-fator da enzima lacase, ativa na síntese do pigmento verde.

A retirada da glicose determinou um crescimento residual, completamente atípico em relação aos padrões das linhagens estudadas, parecendo à primeira vista, ausência de crescimento. Isto ocorreu inclusive em presença de KCl 0,6M (5.2.9). (Tabela 15, Texto).

Na ausência de KCl 0,6M (5.2.9), a retirada de Pepitona ou Extrato de Levedura determinou o aparecimento de tons avermelhados nas colônias da linhagem A (Tabela 15, Texto).

A alteração de nutrientes do MC (5.2.2) não provocou mudanças relevantes no fenótipo de V_5 quanto à reversão para a cor verde, em presença de KCl 0,6M (5.2.9). (Tabela 15 , Texto).

Neste ensaio quantificou-se o diâmetro das colônias em função das alterações no meio de cultura, em presença e ausência de KCl 0,6M (Tabela 16, Texto).

A análise estatística (Tabela 100 e seguintes, Anexo) demonstrou crescimento estatisticamente superior para a linhagem V_5 , considerando-se o conjunto dos tratamentos (Tabela 101, Anexo).

As alterações no crescimento das duas linhagens, em função da retirada de nutrientes do meio de cultura, não são significativas exceto para a retirada da glicose (Tabela 102, Anexo).

A presença ou ausência do Tampão Fosfato (5.3.8), por sua vez, determinou divergências no efeito de cada variação do MC (5.2.2) sobre o crescimento (Tabelas 103 e 104, Anexo), bem como sobre as médias de crescimento das colônias, influenciando negativamente neste sentido (Tabela 105, Anexo). Entretanto, isto se deve ao seu efeito sobre a linhagem normal (A). Por sua vez, a ação do Tampão Fosfato sobre V_5 é positiva (Tabelas 106 e 107, Anexo).

7.2.6. Efeito da Privação de Nutrientes (a partir de MM) em Linhagem Normal e Deteriorada na Ausência ou Presença do Estabilizador Osmótico $MgSO_4$ 0,6M ou KCl 0,6M.

A fenocópia de deteriorado já observada na linhagem A, normal (item 5.2.5.) caracterizada em função de retirada de $ZnSO_4$ ou $FeSO_4$ do MC (5.2.2) não se verificou completamente a partir de MM+PROPABA (5.2.1) . No presente ensaio ocorreu apenas alteração no tom da cor verde original verificado em MC (5.2.2), tanto na presença quanto na ausência dos estabilizadores osmóticos utilizados.

Os valores de crescimento em função da privação de nutrientes apresentaram-se superiores em V_5 (Tabela 108 e 109, Anexo). As diferentes composições do meio de cultura também afetaram significativamente o crescimento das colônias (Tabela 110, Anexo). Por outro lado, em presença do estabilizador osmótico $MgSO_4$ 0,6M (5.2.10) ocorreram as maiores médias de crescimento, diferindo de KCl 0,6M e de AUSÊNCIA do estabilizador osmótico (Tabela 111, Anexo). Tal constatação deve-se às diferenças significativas verificadas na linhagem V_5 (Tabela 112 e 113, Anexo).

Desta forma, verificou-se que a linhagem deteriorada V₅ reage melhor que a linhagem normal A à privação de nutrientes. Tal comportamento pode ser associado inclusive, ao fato de que o efeito positivo dos estabilizadores osmóticos sobre o crescimento da linhagem deteriorada V₅, é maior que o efeito destes na linhagem A (Tabela 112 e 113, Anexo).

7.3. Análises Genéticas

7.3.1. Análises Genéticas a partir dos Ciclos Sexual e Parasexual.

7.3.1.1. Linhagens A e V₅

Efetuuou-se o cruzamento entre as linhagens A e MSE e entre V₅ e MSE (Tabelas 20, 21 e 22, Texto) visando o controle dos procedimentos técnicos para as análises genéticas subseqüentes.

Na linhagem V₅, já analisada por AZEVEDO (1971), verificou-se envolvimento dos grupos de ligação I, II e VIII (Tabelas 21 a 25 e 54, Texto). Não se verificou ligação do marcador ribo ao determinante de

deterioração , mas sim dos marcadores propaba, do grupo de ligação I. Observou-se também a ocorrência de duplo crossing-over a uma taxa 29% superior à esperada.

7.3.1.2. Linhagem Revertente C₁₀

Na linhagem C₁₀, revertente verde, foram isoladas duas colônias deterioradas entre os setores haplóides originados de C₁₀ // MSE. Entretanto, entre os segregantes do cruzamento C₁₀ x MSE não se encontrou nenhum deteriorado. (Tabelas 26 e 29, Texto).

Como C₁₀ originou-se de V₅ mediante irradiação com luz ultra-violeta, conferiu-se o envolvimento do grupo de ligação VIII em relação aos demais, numa possível determinação de deterioração cuja expressão estivesse suprimida por um outro gene. Os valores observados (Tabela 28, Texto) indicam, como no caso de V₅, o envolvimento das marcas pro,paba e ribo. Cabe ressaltar que os variantes deteriorados haplóides obtidos a partir de C₁₀ // MSE apresentam fenótipo pro⁺paba⁺ribo⁺ e pro⁻paba⁻ribo⁻ ou seja, gal⁻fac⁻nic⁻ e pro⁻paba⁻ribo⁻fac⁻, respectivamente. (Tabela 27, Texto). Isto sugere o envolvimento do cromossomo V (fac como marcador) , associando talvez o determinante de deterioração e seu

supressor. Tal hipótese é reforçada pelos valores observados para a relação entre ribo e fac. (Tabela 28, Texto).

Por não terem ocorrido segregantes deteriorados, a análise dos segregantes do cruzamento sexual estudado não acrescentou informações neste sentido. Pode-se constatar entretanto a predominância das marcas protopróficas entre os segregantes de $C_{10} \times MSE$. A análise da proporção de cores destes segregantes indicou o envolvimento do cromossomo II também. Já a proporção entre colônias normais e deterioradas, reforça a hipótese de ocorrência de reversão por supressão. (Tabela 54, Texto). Neste caso o supressor deve estar situado no mesmo grupo de ligação que o determinante de deterioração. Além disso deve estar situado próximo a este, de tal forma que poucas recombinações pudessem ocorrer entre os dois loci. Isto se confirmou pela ocorrência de apenas dois isolados deteriorados originados a partir do diplóide $C_{10} // MSE$ e nenhum deteriorado ter ocorrido entre os segregantes do cruzamento utilizado para a análise genética. Em um cruzamento anterior, efetuado apenas para a avaliação da proporção de fenótipo normal e deteriorado obteve-se apenas 14 fenótipos deteriorados contra 723 colônias de fenótipo normal.

7.3.1.3. Linhagem Revertente C₁₂

A linhagem revertente C₁₂ caracteriza-se pela sensibilidade à temperatura, sendo a expressão de seu fenótipo normal, verde, inibida a 37⁰ C.

Do heterocário constituído pelas linhagens C₁₂ e MSE isolou-se um diplóide normal, verde, e outro, deteriorado (C₁₂ // MSE e Det C₁₂ // MSE, respectivamente).

A ocorrência de segregantes deteriorados no cruzamento de C₁₂ e MSE indicou que a reversão do fenótipo deteriorado para normal deveu-se à presença de supressão gênica. Isto foi confirmado pela ocorrência de setores haplóides deteriorados isolados de C₁₂ // MSE, e pela ocorrência do próprio diplóide deteriorado DetC₁₂ // MSE. Este, além de crescer em meio mínimo e ser inibido por benlate como é característico às linhagens diplóides, teve seu fenótipo revertido em presença de estabilizador osmótico (6.2.2), o que não ocorreria se este isolado devesse seu fenótipo à aneuploidia, por exemplo. (MOLINA & AZEVEDO, 1989).

Também nas análises genéticas de C₁₂, estudou-se o envolvimento do cromossomo VIII em relação aos demais, supondo-se um possível determinante de deterioração sob a ação de supressão gênica. Os valores observados indicam o envolvimento das marcas pro, paba, e ribo. Além

disso, também pode estar envolvido o cromossomo VII (nic). (Tabela 31, Texto).

Observando-se as marcas auxotróficas dos setores deteriorados isolados de C₁₂ // MSE (Tabela 32, Texto) constata-se a associação dos fenótipos pro⁻, paba⁻ e ribo⁻, além da prototrofia para galactose e auxotrofia para ácido nicotínico; este último marcador, confirmando as observações expostas acima.

A análise meiótica indicou ligação do determinante de deterioração de C₁₂ aos marcadores do cromossomo I (Tabelas 34, 35 e 36, Texto). O estudo da proporção de cores entre os segregantes deste cruzamento também indicou o envolvimento do cromossomo II (Tabela 54, Texto).

A proporção observada entre segregantes normais e deteriorados por sua vez, confirma a hipótese de reversão por supressão, estando o gene supressor em cromossomo distinto ao do determinante de deterioração ou, se no mesmo cromossomo, suficientemente distante para que ocorram recombinações sem interferência entre um locus e outro. Em C₁₂ pôde-se supor que ambos os genes (determinante de deterioração e supressor) encontram-se no mesmo cromossomo, a uma distância suficiente para a ocorrência de recombinações sem interferências mútuas em função da ocorrência de DETC₁₂ // MSE.

A ocorrência deste diplóide deteriorado pode ser explicada por um evento de permuta dupla, o primeiro ocorrendo entre o gene gal (ver Tabelas 31,32,33 e 34, Texto) e o determinante de deterioração v₅ ; o segundo, entre v₅ e o gene supressor , designado por rev. (Figura 9).

Figura 9 . Esquema de permuta - DETC₁₂//MSE

Tal evento seria possível, uma vez que o gene gal, embora envolvido no evento de deterioração (Tabela 33, Texto), não se mostrou ligado ao gene y, determinante de deterioração. (Tabela 34, Texto). Além disto o alelo y-precisaria ser dominante sobre y+, quando localizados no cromossomo III. Sendo assim, um diplóide constituído pelas cromátides "c", após a permuta, e "d", seria deteriorado. Pode-se supor também, por não terem ocorrido segregantes normais, que y+, presente no cromossomo III, seja uma mutação nula de tal forma que fossem inviáveis os segregantes normais, na ausência do gene rev+

7.3.1.4. Linhagem G[#]

Dentre os segregantes do cruzamento G[#]xMSE e setores haplóides originados de G[#] // MSE, não ocorreu nenhuma colônia de fenótipo deteriorado. Isto indica uma reversão verdadeira ou evento de supressão devido a um gene estreitamente ligado ao locus do determinante de deterioração. Entretanto, registrou-se a ocorrência de colônias com fenótipo "fluffy" além de colônias com fenótipo normal. Assim sendo, optou-se por mapear o gene "fluffy" e relacioná-lo ao evento de reversão genotípica em questão.

As Tabelas 37 e 38 (Texto) demonstram associação dos cromossomos I e VIII ao determinante "fluffy". Relacionou-se o cromossomo VIII aos demais em função dos valores da Tabela 37 (Texto) e da origem de G[#], um mutante de V₅. Além disto, todas as colônias "fluffy" eram ribo⁺ e todas as colônias normais, ribo⁻. Constatou-se desta forma o envolvimento dos cromossomos VI e VIII. É possível que tenha ocorrido uma reversão do v₅ em "fluffy".

A análise meiótica por sua vez, só não indicou ligação do determinante genético para "fluffy" no cromossomo I, o que tende a afastar a hipótese de estar envolvido apenas um gene cromossomal enquanto responsável pela determinação deste caráter. (Tabela 39, Texto). De qualquer forma, a proporção de cores observada entre os segregantes deste cruzamento indicou o envolvimento do cromossomo II na determinação do caráter analisado.

7.3.1.5. Linhagem G[#].1

A linhagem G[#].1, verde e estável, originou-se da linhagem G[#]. Não foi possível realizar um estudo mais completo desta linhagem porque não ocorreu formação de diplóide a partir de heterocário constituído pelas linhagens G[#].1 e MSE. Os segregantes do cruzamento sexual, por sua vez, também não forneceram nenhum indício de presença de determinante de deterioração ou de "fluffy", já que todos os segregantes obtidos apresentaram fenótipo normal (Tabela 40, Texto). Desta forma pode-se supor que G[#].1 deva sua origem à reversão do gene determinante do caráter "fluffy", constatado em G[#]. Apesar disto, a proporção de cores entre os segregantes deste cruzamento apresentou-se desviante em relação à proporção esperada. (Tabela 54, Texto).

7.3.1.6. Linhagem HV94

A linhagem HV94 caracteriza-se por apresentar fenótipo deteriorado e marcas auxotróficas da linhagem normal, de cor branca, MSE. Para estudá-la geneticamente efetuou-se o cruzamento desta e cada uma das linhagens com marcas auxotróficas complementares anteriormente estudadas (itens 7.3.1.1. a 7.3.1.5).

Obteve-se um heterocário constituído pelas linhagens A e HV94, isolando-se uma colônia verde, capaz de crescer em meio mínimo e responder à presença de benlate com a formação de setores haplóides. Os isolados assim obtidos caracterizaram-se por serem todos w⁺ (verdes ou amarelos) e apresentarem marcas auxotróficas da linhagem A, exceto em dois casos, nos quais se verificou também auxotrofia para a utilização de acetato como fonte de carbono.

Cruzando-se as linhagens A e HV94 obteve-se segregantes de fenótipos normal e deteriorado. Entretanto, os valores obtidos para as taxas de recombinação indicaram ligação do determinante de deterioração a todos os cromossomos, exceto o I. Isto também ocorreu na análise da linhagem G[#] (7.3.1.4) e, como naquele caso, tende a afastar a hipótese de um gene cromossomal caracterizado enquanto determinante do fenótipo deteriorado observado. Também se pode supor que haja interferência de outros fatores ainda não esclarecidos. (Tabelas 41 e 42, Texto).

Do heterocário estabelecido entre as linhagens V₅ e HV94, ambas com fenótipo deteriorado, isolou-se um diplóide também com fenótipo deteriorado. Este, entretanto, produziu 101 setores haplóides de fenótipo normal e apenas 2 de fenótipo deteriorado, um apresentando cor branca e outro, amarelada.

Nesta análise genética empregou-se 51 colônias amarelas ou verdes e 53 brancas e obteve-se predominantemente marcas prototróficas entre os marcadores estudados.

No cruzamento sexual $V_5 \times HV94$, ocorreram tanto colônias de fenótipo normal quanto deteriorado. Para se efetuar os cálculos de ligação entre determinantes de deterioração e os demais marcadores seria necessário entretanto distinguir entre as colônias deterioradas da progênie, o fenótipo relativo a V_5 ou a HV94.

Uma vez que a linhagem HV94 não reverte seu fenótipo em meio com estabilizador osmótico e V_5 sim, é possível discriminar dentre a progênie os deteriorados portadores apenas do determinante de V_5 . Mantém-se entretanto a questão de se discriminar as colônias portadoras apenas do determinante de HV94 ou simultaneamente deste e de V_5 .

Pôde-se concluir entretanto que os determinantes de deterioração de V_5 e HV94 não são alelos, uma vez que constatou-se o fenótipo normal entre os segregantes da progênie. (Tabelas 43 e 44, Texto).

O diplóide isolado do heterocário constituído pelas linhagens C_{10} e HV94 produziu setores haplóides de fenótipo normal e deteriorado. Ao se cruzar $C_{10} \times HV94$ obteve-se tanto colônias normais quanto deterioradas.

Para se proceder aos cálculos de ligação entre os marcadores estudados e o determinante de deterioração, considerou-se que este teria sua origem em HV94. Entretanto isto não corresponde necessariamente ao fatos, uma vez que , apesar de só terem ocorrido segregantes normais no cruzamento $C_{10} \times MSE$, o diplóide $C_{10} // MSE$ produziu dois setores haplóides deteriorados.

Assumindo-se C_{10} enquanto um revertente por supressão, pode-se associar os padrões de ligação obtidos, em todos os cromossomos, exceto o I (Tabela 46, Texto) à interação entre os diferentes genes determinantes de deterioração e a presença de gene(s) supressor(es).

Isto poderia ter ocorrido no cruzamento $A \times MSE$ acima descrito e $G^{\#} \times MSE$ (item 7.3.1.4). Neste caso, talvez a linhagem A tenha supressores para o determinante de deterioração de HV94, ou mesmo, determinantes de deterioração "silenciosos", que em interação com genes de HV94 estabelecessem padrões de interação ainda não esclarecidos.

Cabe acrescentar que diante destes resultados inesperados (ligação em um grande número de cromossomos), todas as análises foram repetidas, inclusive as que apresentaram padrões convencionais de ligação. Assim, confirmaram-se os primeiros resultados. Decidiu-se então repetir os cruzamentos e obter novos diplóides. Além disto,

passou-se a analisar maior número de placas mestras ao mesmo tempo, incluindo numa mesma série, placas de linhagens com padrões convencionais e com padrões de ligação em vários cromossomos, sendo então analisadas mais placas a cada vez que se preparava um mesmo meio de cultura.

Novamente os padrões de ligação se confirmaram e as leituras apresentara-se nítidas, de forma que não se pode associar os resultados obtidos a erros experimentais envolvendo os cruzamentos, o isolamento de setores haplóides, o preparo dos meios de análise ou o processo de leitura das placas mestras.

O diplóide C₁₂ // HV94 (verde) deu origem a setores normais e deteriorados. A análise mitótica sugeriu o envolvimento dos cromossomos I, III IV. (Tabela 50, Texto). A análise da segregação de cores, por sua vez, indicou o envolvimento do cromossomo II. Não se observou ligação do determinante de deterioração a nenhum dos marcadores estudados (Tabela 48, Texto).

É interessante observar que este revertente (C₁₂), o qual distingue-se dos demais por ser temperatura sensível, quando cruzado com HV94 não determinou os padrões de ligação simultaneamente nos cromossomos III a VIII como observado em C₁₀ x HV94. Entretanto, tanto C₁₀ quanto C₁₂ caracterizaram-se enquanto revertentes por supressão,

diferindo no fato de que em C_{10} o supressor encontra-se próximo ao determinante de deterioração e em C_{12} , ambos segregam independentemente.

De qualquer forma, pôde-se assumir que o determinante de deterioração de C_{12} não é alelo ao de HV94.

O diplóide $G^{\#}$ // HV94 originou setores haplóides de fenótipo normal e deteriorado. A análise mitótica indicou envolvimento dos cromossomos I e V. (Tabela 49, Texto).

Não se observou ligação do determinante de deterioração a nenhum dos marcadores estudados. (Tabela 50, Texto).

Estudando-se o gene "fluffy" entretanto, observou-se o mesmo padrão de ligação a todos os cromossomos exceto ao cromossomo I (Tabela 51, Texto), conforme verificado em $G^{\#} \times MSE$ (item 7.3.1.4), reforçando a hipótese de que o caráter "fluffy" estudado, não esteja relacionado a um único gene cromossomal.

Os setores haplóides originados de $G^{\#}.1$ // HV94 apresentaram apenas fenótipo normal. (Tabela 52, Texto). O mesmo ocorreu entre os segregantes obtidos do cruzamento $G^{\#}.1 \times HV94$. (Tabela 53, Texto). Isto reforça a hipótese de reversão verdadeira do caráter "fluffy" observado em $G^{\#}$. Além disto, o determinante de deterioração da linhagem HV94 deve ser recessivo em relação ao alelo

"normal" presente em G[#].1 ou ter sua expressão suprimida, já que dentre os segregantes destas duas linhagens observaram-se apenas fenótipos normais.

Nas análises efetuadas com a linhagem HV94 é preciso considerar que todas as linhagens "testadoras" utilizadas neste trabalho originaram-se da linhagem A, de fenótipo normal mas com duplicação cromossômica.

Este fator certamente influenciou nos resultados obtidos. Para contornar esta possibilidade, seria necessário testar a linhagem HV94 com outras linhagens, que apresentem marcas auxotróficas complementares, sem duplicações cromossômicas.

As linhagens revertentes obtidas neste trabalho, se submetidas a um "teste de alelismo" com um segregante de V₅×MSE por exemplo, poderão fornecer informações complementares que auxiliarão o estudo e compreensão dos eventos de reversão genética aqui estudados.

A linhagem HV94, por não reverter seu fenótipo em meio com estabilizador osmótico, conforme também se verificou em linhagens aneuplóides (MOLINA & AZEVEDO, 1989), talvez não se trate de um deteriorado típico. Por outro lado, os ensaios realizados neste

trabalho não permitiram a caracterização de seu determinante de deterioração enquanto um gene cromossomal específico.

7.3.2. Análises genéticas a partir da Obtenção e Fusão de Protoplastos.

Este ensaio teve como objetivo permitir a análise mitótica de setores originados de diplóides obtidos por fusão de protoplastos (5.6). Entretanto, as duas repetições efetuadas originaram apenas heterocários, de forma que não foi possível comparar os dados obtidos pela metodologia clássica (ciclo parasexual) à fusão de protoplastos, o que permitiria estudar eventuais efeitos diferenciais das técnicas empregadas sobre a ocorrência de fenocópia, bem como complementar os resultados obtidos pela metodologia clássica (item 7.3.1.).

7.4. Eletroforese de Proteínas

Os ensaios conduzidos compararam os padrões de proteínas totais e o esterase de linhagens cultivadas em MC (5.2.2); MCKC1 (5.2.9) e MCKC1TP (5.2.8). Conforme se pode observar nas Figuras 8, 9 e 10, a intensidade das bandas produzidas variou, embora os padrões individuais tenham se mantido dentro de cada linhagem, de tal forma que, possivelmente há maior atividade enzimática em MCKC1TP (5.2.8), seguida de MCKC1 (5.2.9) e MC (5.2.2).

8. CONCLUSÕES:

Para se testar a primeira hipótese proposta neste trabalho, (item 4) de que o fenótipo deteriorado ocorreria em função de uma deficiência alimentar relacionada à captação de nutrientes do meio de cultura, conduziu-se uma série de ensaios agrupados no item 7.2. (Ensaio de Fenocópia). Estes ensaios esclarecem os seguintes aspectos:

Quanto à reversão da cor:

- A reversão do fenótipo deteriorado para a cor requer a presença de estabilizador osmótico. O Tampão Fosfato só reverte parcialmente o fenótipo das colônias, até a cor amarela.
- Diferentes estabilizadores osmóticos provocam a reversão do fenótipo deteriorado para normal, tanto em linhagens diplóides como em haplóides entretanto polissacarídeos utilizados como estabilizadores osmóticos determinaram a expressão da cor amarela, mesmo nas linhagens em que o uso de sais inorgânicos determinou a expressão da cor verde.

- Um gradiente de concentração do estabilizador osmótico KCl determinou a correção progressiva do fenótipo deteriorado até normal de 0,2M até aproximadamente 0,8M. Após este nível verificou-se a inibição da reversão do fenótipo.
- A fenocópia de linhagem normal em deteriorada foi observada na linhagem A em MC sem $ZnSO_4$ (e sem KCl 0,6M) sendo parcial para a ausência de $FeSO_4$, nas mesmas condições. Evento semelhante seria caracterizado mediante a privação de cobre, co-fator na ação da lacase, ativa na síntese do pigmento verde.
- A linhagem HV94 não teve seu fenótipo revertido pela presença de estabilizadores osmóticos. (Figura 4).

Quanto à Esporulação:

- As linhagens normais tenderam a apresentar esporulação superior às deterioradas, entretanto as linhagens revertentes superaram a produção destas em presença de KCl de 0,2M a 1,2M.
- A linhagem deteriorada tendeu a aumentar sua esporulação em relação às linhagens normais em presença de estabilizadores osmóticos obtendo maior índice a 0,8M. Acima desta concentração começou a ocorrer inibição da produção de esporos.
- Apenas as linhagens revertentes (normais) tiveram a produção de esporos estatisticamente afetada pela concentração de KCl.

Quanto ao diâmetro das colônias:

- A presença do Tampão Fosfato tendeu a estimular o crescimento das colônias sendo entretanto negativa em meio com deficiência de nutrientes (elaborados a partir do MC).
- A linhagem deteriorada V₅ apresentou maior resistência à privação de nutrientes que a linhagem normal A, no que se refere à inibição de seu crescimento.
- Variação na concentração do estabilizador osmótico provocou inibição de crescimento nas concentrações acima de 1,0M.
- O MCSORBITOL 0,6M determinou o maior crescimento em todas as avaliações efetuadas, quando comparado com os demais estabilizadores estudados e com a ausência de estabilizadores osmóticos no meio de cultura.

A segunda e a terceira hipótese propostas (item 4) assumiram a determinação genética do fenótipo deteriorado associando-o inclusive ao segmento duplicado presente na linhagem A, enquanto determinante da instabilidade mitótica observada nas linhagens deterioradas. (Desta linhagem A originaram-se direta ou indiretamente as linhagens V₅ deteriorada, C₁₀, C₁₂, G[#] e G[#].1, normais revertentes) .

Para testar esta hipótese procedeu-se à análise genética de revertentes fenotípicos, chegando-se às seguintes conclusões:

- As linhagens C₁₀ e C₁₂ foram caracterizadas enquanto revertentes devido à ação de genes supressores. Em C₁₀ verificou-se ligação do supressor ao determinante de deterioração, limitando os eventos de recombinação. Em C₁₂ o supressor e o determinante de deterioração foram mapeados no mesmo cromossomo, embora segregando independentemente.
- Na linhagem G[#] verificou-se reversão do determinante de deterioração para o caráter "fluffy" ou talvez, a supressão do gene determinante de deterioração pela presença de um gene "fluffy" estreitamente ligado a ele. A linhagem G[#].1 caracterizou-se como revertente verdadeiro, provavelmente devendo seu fenótipo normal à reversão do caráter "fluffy" para normal, apresentando cor verde.
- Não foi possível identificar o determinante do fenótipo da linhagem HV94 por meio dos ensaios realizados neste trabalho, não se caracterizando entretanto esta linhagem como um deteriorado típico.

Em síntese:

- A reversão do fenótipo deteriorado (por fenocópia) está associada ao efeito da concentração dos estabilizadores osmóticos.
- A reversão genética do fenótipo deteriorado deve estar associado algum fator que também é influenciado pela concentração dos estabilizadores osmóticos utilizados já que apenas as linhagens revertentes têm sua esporulação influenciada positivamente pela presença do estabilizador osmótico, superando inclusive a linhagem normal na faixa de 0,4M a 1,2M.
- A linhagem deteriorada V_5 suporta melhor a privação de nutrientes que a linhagem normal, A, possivelmente em função da melhor resposta da linhagem deteriorada à presença de estabilizador osmótico, em relação ao crescimento das colônias.
- A fenocópia do deteriorado em linhagem normal só se verificou em meio completo sem estabilizador osmótico na ausência de $ZnSO_4$ ou $FeSO_4$. Semelhante efeito seria esperado na ausência de cobre, co-fator enzimático na síntese do pigmento verde.
- Os revertentes genéticos obtidos apresentaram diferentes mecanismos enquanto determinantes de seu fenótipo normal:
 - a) reversão verdadeira ou supressão por gene estreitamente ligado ao determinante de deterioração presente na linhagem V_5 ;

- b) reversão por gene supressor ligado ao determinante de deterioração, mas permitindo a ocorrência de eventos de recombinação;
 - c) reversão por gene supressor não ligado ao determinante de deterioração, situando-se, entretanto, na linhagem analisada, no mesmo cromossomo.
- a partir das observações efetuadas no presente trabalho, pode-se assumir como deteriorados típicos, variantes cujo fenótipo (coloração marrom, superfície enrugada, redução nas taxas de esporulação e crescimento) seja reversível em presença de estabilizador osmótico no meio de cultura.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APIRION, D.A. A General System for the Automatic Selection of Auxotrophs from Prototrophs and Vice-versa in Microorganisms. Nature, London, 195:959-61, 1962.
- ARST JUNIOR, H. N. ; TOLLERVEY, D. ; CADDICK, M.X. A translocation associated loss-function mutation in the nitrogen regulatory gene of *Aspergillus nidulans* can revert intracistronically. Molecular General Genetics, Berlin, 215:364-7, 1989.
- AZEVEDO, J.L. Altered instability due to genetic changes in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, Princeton, 26:55-61, 1975.
- AZEVEDO, J.L. & ROPER, J.A. Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: successive and transposable genetic changes. Genetical Research, Princeton, 16:79-93, 1970.
- 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. ; SANTANA, E.P. ; BONATELLI JUNIOR, R. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. Mutation Research, Amsterdam, 48:163-72, 1977.
- AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. Exercícios práticos de genética. São Paulo, Nacional, 1973. 288 p.
- BAINBRIDGE, B.W. & ROPER, J.A. Observation on the effect of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, London, 42:417-24, 1966.
- BONATELLI JUNIOR, R. & AZEVEDO, J.L. Effects of ethidium bromide in diploid and duplication strains of *Aspergillus nidulans*. Experientia, Basel, 33:311-2, 1977.
- BORST, P. & GRAVES, D. R. Programmed gene rearrangements altering gene expression. Science, Washington, 235:658, 1987.
- BRODY, H. & CARBON, J. Eletrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. Proceedings of the National Academy of Science USA, Washington, 87:6260-3, 1989.
- CLARK, D. & PARKER, J. Proteins induced by high osmotic pressure in *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, 25:81-3, 1984.

- CZONKA, L.N. Physiological and Genetic response of bacteria to osmotic stress. Microbiological Reviews, Washington, 53(1):121-47, Mar., 1989.
- EMERIT, I. Clastogenic factors: detection and essay. Methods in Enzimology, New York, 186:555-64, 1990.
- ENGLE, D.B. ; OSMANI, S.A. ; OSMANI, A.H. ; ROSBOROUGH, S. ; XIANG, S. ; MORRIS, N.R. A negative regulator of mitosis in *Aspergillus* is a putative membrane-spanning protein. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 265(27):16132-7, 1990.
- ENGSTROM, G. ; LILJEDAHN, L.E. ; RASMUSON, M. ; BJORKLUND, T. Expression of genetic and environmental variation during ageing. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 77:119-22, 1989.
- FINNEGAN, D.J. Eucariotic transposable elements and genome evolution. Trends in Genetics, Cambridge, 5(4):103-7, 1989.
- GILKEY, J.C. & STAEHELIN, L.A. A new organelle related to osmoregulation in ultrarapidly frozen *Pelvetia* embryos. Planta, Berlin, 178:425-35, 1989.
- GILLIS, A.M. Can organisms direct their evolution? Bioscience, Washington, 41(4):202-5, 1991.
- GLOOR, G.B. ; NASSIF, N.A. ; JOHNSON-SCHLITZ, D.M. ; PRESTON, C.R. ; ENGELS, W. R. Target gene replacement in *Drosophila* via P element-induced gap repair. Science, Washington, 253:1110-7, Sep., 1991.
- HAMLYN, P.F. ; BRADSHAW, R.E. ; MELLON, F.M. ; SANTIAGO, C.M. ; WISPIN, J.M. ; PEBERDY, J.F. Efficient protoplasts isolation from fungi using commercial enzymes. Enzyme and Microbial Technology, Guildford, 3:321-6, 1981.
- HERRLICH, P. & PONTA, H. "Nuclear" oncogenes convert extracellular stimuli into changes in the genetic program. Trends in Genetics, Cambridge, 5(4):112-5, 1989.
- HOUCK, M.A. ; CLARK, J.B. ; PETERSON, K.R. ; KIDWELL, M. G. Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. Science, Washington, 253:1125-9, Sep., 1991.
- JAMIESON, D. J. ; RAHE, B. ; PRINGLE, J. ; BEFFS, J. D. A suppressor of a yeast splicing mutation (prp 8-1) encodes a putative ATP-dependent RNA helicase. Nature, London, 349:715-7, 1991.
- KÖELER, F. ; CARDON, G. ; POHLMAN, M. ; GILL, R. ; SCHIEDER, O. Enhancement of transformation rates in higher plants by low-dose irradiation: are DNA repair systems involved in the incorporation of exogenous DNA into the plant genome. Plant Molecular Biology, Dordrecht, 12:189-99, 1989.

- KOPECKA, M. ; GABRIEL, M. ; NECAS, O. ; SVOBODA, A. ; VENKOV, P.V. Cell surface structures in osmotically fragile mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of General Microbiology, London, 137:1263-70, 1991.
- KROWCZYNSKA, A.M. ; RUDDERS, R.A. ; Krontiris, T.G. The human minisatellite consensus at breakpoints of oncogene translocations. Nucleic Acids Research, London, 18(5):1121-7, 1990.
- LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. NATURE, London, 227:681-5, 1970.
- LEHMANN, A.R. Trichothiodystrophy and the relationship between DNA repair and cancer. Bioessays, Cambridge, 11(6):168-70, 1989.
- MARX, J. A "Mitey" theory of gene jumping. Science, Washington, 253:1092-4, Sep., 1991.
- 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, 6:352-9, 1965.
- MEERTS, P. & VEKEMANS, X. Phenotypic plasticity as related to Trampling within a natural population of *Polygonum aviculare* subsp. *aequale*. Acta Oecologica, Paris, 12(2):203-12, 1991.
- MENEGHINI, R. A toxicidade do oxigênio. Ciência Hoje, Rio de Janeiro, 5(28):57-62, 1987.
- MENEZES, E.M. & AZEVEDO, J.L. Reversion in variants from a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. Molecular and General Genetics, Berlin, 164:255-8, 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. Fortaleza, SBPC, 1989. p.728.
- MONTEIRO, C.B. & PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Avaliação da Instabilidade mitótica de *Aspergillus nidulans* através de cruzamentos sexuais e parassexuais e fusão de protoplastos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA- 43., Rio de Janeiro, 1991. Resumos Rio de Janeiro, SBPC, 1991. p.764-5.
- MONTEIRO, C.B. Avaliação da instabilidade mitótica de *Aspergillus nidulans* através de técnicas genéticas clássicas e fusão de protoplastos. Piracicaba, 1989. 135p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- MORRIS, N.R. ; OSMANI, S.A. ; ENGLE, D.B. ; DOONAN, J.H. The genetics analysis of mitosis in *Aspergillus nidulans*. Bioessays, Cambridge, 10:196-201, Jun., 1989.
- MUNRO, P.M. ; GAUTHIER, M.J. ; BREITTMAYER, V.A. ; BONFIOVANNI, J. Influence of osmoregulation processes on starvation survival of *Escherichia coli* in seawater. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 55(8):2017-24, 1989.
- MURGOLA, E.J. Suppression and the code: beyond codons and anticodons. Experientia, Basel, 46:1134-41, 1990.
- MURRAY, A.W. & KIRSCHNER, M.W. What controls the cell cycle. Scientific American, New York, 34-41, Mar., 1989.
- NGA, B.H. & ROPER, J.A. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. Genetics, Princeton, 58:193-209, 1968.
- NOBEL, J.G. ; BARNER, J.A. Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. Yeast, Chichester, 7:313-23, 1991.
- PAES DE BARROS, J. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, 1977. 81p (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- PEBEDY, J.F. & FERENCZY, L. (ed.) Fungal Protoplasts - Applications in Biochemistry and Genetics, Marcel Dekker, INC - EUA, 1985
- PONTECORVO, G. ; ROPER, J.A. ; MEMMONS, L.M. ; McDONALD, K.D. ; BUGTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, New York, 5:141-238, 1953.
- QUEIROZ, M.V. & AZEVEDO, J.L. Efeito da protoplastização na instabilidade mitótica em linhagem de *Aspergillus nidulans* com duplicação cromossômica. REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 15ª, Piracicaba, 1988. Anais. pag. 45.
- QUEIROZ, M. V. Caracterização Molecular e Clonagem Gênica em *Aspergillus nidulans* Portador de Duplicação Cromossômica. Piracicaba, 1993. 116p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- QUINN, P.J. ; JOO, F. ; VIGH, L. The role of unsaturated lipids in membrane structure and stability. Progress Biophysics Molecular Biology, New York, 53:71-103, 1989.
- REIK, W. Genomic imprinting and genetic disorders in man. Trends in Genetics, Cambridge, 5:(10):331-6, 1989.
- ROBERTS, C.F. A Replica Plating Technique for the Isolation of Nutritionally Exacting Mutants of a Filamentous Fungus (*Aspergillus nidulans*). Journal of General Microbiology, London, 20:540-8, 1959.

- ROPER, J.A. & NGA, B.H. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the production of hypodiploid and hypohaploid nuclei. Genetical Research, Princeton, 14: 127-36, 1969.
- ROSATO, Y.B. & AZEVEDO, J.L. Acriflavine and EMS - induced mutants of *Aspergillus nidulans* strains with chromosome duplication. Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 1:247-62, 1978.
- SELKER, E.U. Premiotic Instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. Annual Review of Genetics, Palo Alto, 24:579-613, 1990.
- SMIGIELSKI, A.J. ; WALLAGE, B.J. ; MARSHALL, K. C. Changes in Membrane functions during short-term starvation of *Vibrio fluvialis* strain NCTC 11328. Archives Microbiology, Berlin, 151:336-41, 1989.
- SMITH, M.A.L. ; PALTA, J.P. ; McCOWN, B.H. ; STEFFEN, K.L. Plasmolytic behaviour of the donor cell may affect protoplast response. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 76:201-4, 1989.
- SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.S. Isozymes in Plant Biology. Advances in Plant Sciences Series, volume 4, Theodore R. Dudley, General Editor. Dioscorides Press, Oregon. 45p.
- SUDIRO, T.M, INOUE, H. ; YUTSUDO, M. ; HAKURA, A. Isolation of cellular revertants from a rat cell line transformed by the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16. Virology, New York, 182:357-60, 1991.
- TERZAGHI, E. & O'HARA, M. Microbial Plasticity - The relevance to Microbial Ecology. Advances in Microbial Ecology, New York, 11:431-469, 1990.
- TILBURN, J. ; ROUSSEL, F. ; SCAZZOCHIO, C. Insertional inactivation and cloning of the wA gene of *Aspergillus nidulans*. Genetics, Princeton, 126:81-90, 1990.
- UPSHALL, A. & KÄFER, E. Detection and identification of translocations by increased specific nondisjunction in *Aspergillus nidulans*. Genetics, Princeton, 76:19-31, 1974.
- VAINSTEIN, M.H. & PEBERDY, J.F. Regulation of invertase in *Aspergillus nidulans*: effect of different carbon sources. Journal of General Microbiology, London, 137:315-21, 1991.
- VILLANUEVA, J.R. & GARCIA-ACHA, I. Production and use of protoplasts. In Methods in Microbiology, vol. 4, ed. C.M. Booth, Academic Press, London, p.665-718, 1971.
- VISERAS, A. & KÄFER, E. Detection and identification of translocations by increased specific non-disjunction in *Aspergillus nidulans*. Genetics. Princeton, 76:19-31, 1974.

- WICKNER, W. Secretion and Membrane Assembly. Trends in Biological Sciences, Amsterdam, 14: 280-3, Jul., 1989.
- 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.

10. ANEXOS

ANALISES ESTATÍSTICAS - Ensaios de Fenocópia

1. Fenótipo cor em função do Tampão Fosfato e Estabilizador Osmótico (KCl 0,6M) em Linhagens Haplóides Normal e Deterioradas.

TABELA 1- QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
MEIOS	3	2.5362993			
LINHAGEM	6	8.8813711	1.4802285	43.5388	0.00001
RESIDUO	74	2.5158455	0.0339979		
TOTAL	83	13.9335159			

MEDIA GERAL = 0.322310

COEFICIENTE DE VARIACAO = 57.208 %

TABELA 2- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	A	12	1.108667	1.108667	a	A
2	5	V98.1	12	0.278583	0.278583	b	B
3	3	V97	12	0.216167	0.216167	b	B
4	4	V98	12	0.205583	0.205583	b	B
5	2	V5	12	0.204167	0.204167	b	B
6	7	V100	12	0.134667	0.134667	b	B
7	6	V99	12	0.108333	0.108333	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 0.22811 - D.M.S. 1% = 0.27063

TABELA 3- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	MCTPKCL	21	0.580143	0.580143	a	A
2	2	MCKCL	21	0.316095	0.316095	b	B
3	3	MCTP	21	0.302810	0.302810	b	B
4	1	MC	21	0.090190	0.090190	c	C

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 0.14978 - D.M.S. 1% = 0.18368

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS

TABELA 4- DENTRO DE A DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	MCTPKCL	3	1.370667	1.370667	a	A
2	3	MCTP	3	1.297333	1.297333	a	A
3	2	MCKCL	3	1.254667	1.254667	a	A
4	1	MC	3	0.512000	0.512000	b	B

TABELA 5- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE V5 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	MCTPKCL	3	0.488000	0.488000	a	A
2	2	MCKCL	3	0.285333	0.285333	ab	A
3	3	MCTP	3	0.037667	0.037667	b	A
4	1	MC	3	0.005667	0.005667	b	A

TABELA 6- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE V97 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	MCTPKCL	3	0.465333	0.465333	a	A
2	3	MCTP	3	0.233333	0.233333	ab	A
3	2	MCKCL	3	0.153333	0.153333	ab	A
4	1	MC	3	0.012667	0.012667	b	A

TABELA 7- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE V98 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	MCTPKCL	3	0.392000	0.392000	a	A
2	2	MCKCL	3	0.308000	0.308000	a	A
3	3	MCTP	3	0.119000	0.119000	a	A
4	1	MC	3	0.003333	0.003333	a	A

TABELA 8- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE V98.1 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	MCTPKCL	3	0.777333	0.777333	a	A
2	3	MCTP	3	0.172000	0.172000	b	B
3	2	MCKCL	3	0.156333	0.156333	b	B
4	1	MC	3	0.008667	0.008667	b	B

TABELA 9- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE V99 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	MCTPKCL	3	0.244000	0.244000	a	A
2	3	MCTP	3	0.166667	0.166667	a	A
3	1	MC	3	0.016333	0.016333	a	A
4	2	MCKCL	3	0.006333	0.006333	a	A

TABELA 10- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE V100 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	MCTPKCL	3	0.323667	0.323667	a	A
2	3	MCTP	3	0.093667	0.093667	a	A
3	1	MC	3	0.072667	0.072667	a	A
4	2	MCKCL	3	0.048667	0.048667	a	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 0.39628 - D.M.S. 1% = 0.48597

TABELA 11- QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
MEIOS	3	252.6092764			
LINHAGEM	5	173.9574576	34.7914915	3.2930	0.01410
RESIDUO	39	412.0406528	10.5651449		
TOTAL	47	838.6073868			

MEDIA GERAL = 87.720627

COEFICIENTE DE VARIACAO = 3.705 %

TABELA 12- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	V5	8	90.801250	90.801250	a	A
2	6	V99	8	89.055000	89.055000	ab	AB
3	3	V97	8	87.567497	87.567497	ab	AB
4	4	V98	8	87.452501	87.452501	ab	AB
5	5	V98.1	8	86.820000	86.820000	ab	AB
6	1	A	8	84.627502	84.627502	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 4.86913 - D.M.S. 1% = 5.88731

TABELA 13- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	MCTP	12	91.120834	91.120834	a	A
2	4	MCTPKCL	12	88.525000	88.525000	ab	AB
3	2	MCKCL	12	85.657500	85.657500	b	B
4	1	MC	12	85.579166	85.579166	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 3.56183 - D.M.S. 1% = 4.41945

TABELA 14- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE A DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	MCTPKCL	2	87.860001	87.860001	a	A
2	2	MCKCL	2	85.755005	85.755005	a	A
3	3	MCTP	2	84.785004	84.785004	a	A
4	1	MC	2	80.110001	80.110001	a	A

TABELA 15- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE V5 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	MCTPKCL	2	95.699997	95.699997	a	A
2	3	MCTP	2	93.960007	93.960007	ab	A
3	2	MCKCL	2	86.955002	86.955002	b	A
4	1	MC	2	86.589996	86.589996	b	A

TABELA 16- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE V97 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	MCTP	2	91.759995	91.759995	a	A
2	2	MCKCL	2	88.334999	88.334999	a	A
3	4	MCTPKCL	2	85.320000	85.320000	a	A
4	1	MC	2	84.854996	84.854996	a	A

TABELA 17- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE V98 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	MCTP	2	92.260002	92.260002	a	A
2	4	MCTPKCL	2	86.815002	86.815002	a	A
3	1	MC	2	85.945000	85.945000	a	A
4	2	MCKCL	2	84.790001	84.790001	a	A

TABELA 18- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE V98.1 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	MCTP	2	90.764999	90.764999	a	A
2	1	MC	2	86.955002	86.955002	a	A
3	4	MCTPKCL	2	86.410004	86.410004	a	A
4	2	MCKCL	2	83.149994	83.149994	a	A

TABELA 19- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE V99 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	MCTP	2	93.195000	93.195000	a	A
2	4	MCTPKCL	2	89.044998	89.044998	a	A
3	1	MC	2	89.020004	89.020004	a	A
4	2	MCKCL	2	84.959999	84.959999	a	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 8.72467 - D.M.S. 1% = 10.82539

2. Fenótipo Cor em Função do Estabilizador Osmótico e
Tampão Fosfato em Linhagens Diploides Normal e
Deteriorada.

TABELA 20- QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
LINHAGEM	1	396.9152641	396.9152641	8.8010	0.00709
MEIOS	7	9622.0521642	1374.5788806	30.4792	0.00001
TAMP-PO4	1	1068.3751097	1068.3751097	23.6896	0.00019
RESIDUO	22	992.1769334	45.0989515		
TOTAL	31	12079.5194714			

MEDIA GERAL = 75.546875

COEFICIENTE DE VARIACAO = 8.889 %

TABELA 21- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	C12	16	79.068749	79.068749	a	A
2	2	DET C12	16	72.025000	72.025000	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 4.92755 - D.M.S. 1% = 6.69879

TABELA 22- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE MM DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	C12	2	91.849998	91.849998	a	A
2	2	DET C12	2	90.299999	90.299999	a	A

TABELA 23- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE KCL-0.6M DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	C12	2	71.849998	71.849998	a	A
2	2	DET C12	2	69.000000	69.000000	a	A

TABELA 24- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE KCL-1.2M DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	C12	2	47.500000	47.500000	a	A
2	2	DET C12	2	44.299999	44.299999	a	A

TABELA 25- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE SMg-0.6M DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	C12	2	100.000000	100.000000	a	A
2	2	DET C12	2	97.150002	97.150002	a	A

TABELA 26- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE SOR-0.6M DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	C12	2	92.599998	92.599998	a	A
2	2	DET C12	2	80.549999	80.549999	a	A

TABELA 27- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE SOR-1.2M DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	C12	2	81.049999	81.049999	a	A
2	2	DET C12	2	66.299999	66.299999	b	A

TABELA 28- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE SAC-0.6M DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	C12	2	93.500000	93.500000	a	A
2	2	DET C12	2	76.899998	76.899998	b	A

TABELA 29- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE SAC-1.2M DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	C12	2	54.199999	54.199999	a	A
2	2	DET C12	2	51.700001	51.700001	a	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 13.93723 - D.M.S. 1% = 18.94703

TABELA 30- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	SMg-0.6M	4	98.575001	98.575001	a	A
2	1	MM	4	91.074999	91.074999	a	AB
3	5	SOR-0.6M	4	86.574999	86.574999	ab	ABC
4	7	SAC-0.6M	4	85.199999	85.199999	abc	ABC
5	6	SOR-1.2M	4	73.674999	73.674999	bc	BC
6	2	KCL-0.6M	4	70.424999	70.424999	c	CD
7	8	SAC-1.2M	4	52.950000	52.950000	d	DE
8	3	KCL-1.2M	4	45.900000	45.900000	d	E

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 15.86555 - D.M.S. 1% = 19.34086

TABELA 31- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE C12 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	SMg-0.6M	2	100.000000	100.000000	a	A
2	7	SAC-0.6M	2	93.500000	93.500000	ab	AB
3	5	SOR-0.6M	2	92.599998	92.599998	ab	AB
4	1	MM	2	91.849998	91.849998	ab	AB
5	6	SOR-1.2M	2	81.049999	81.049999	ab	ABC
6	2	KCL-0.6M	2	71.849998	71.849998	bc	BCD
7	8	SAC-1.2M	2	54.199999	54.199999	cd	CD
8	3	KCL-1.2M	2	47.500000	47.500000	d	D

TABELA 32- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE DET C12 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	SMg-0.6M	2	97.150002	97.150002	a	A
2	1	MM	2	90.299999	90.299999	ab	AB
3	5	SOR-0.6M	2	80.549999	80.549999	abc	AB
4	7	SAC-0.6M	2	76.899998	76.899998	abc	ABC
5	2	KCL-0.6M	2	69.000000	69.000000	bcd	BCD
6	6	SOR-1.2M	2	66.299999	66.299999	cde	BCD
7	8	SAC-1.2M	2	51.700001	51.700001	de	CD
8	3	KCL-1.2M	2	44.299999	44.299999	e	D

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 22.43727 - D.M.S. 1% = 27.35210

TABELA 33- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TAMP-PO4

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	PRESENTE	16	81.324999	81.324999	a	A
2	2	AUSENTE	16	69.768750	69.768750	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
 D.M.S. 5% = 4.92755 - D.M.S. 1% = 6.69879

TABELA 34- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TAMP-PO4
DENTRO DE C12 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	PRESENTE	8	86.387499	86.387499	a	A
2	2	AUSENTE	8	71.750000	71.750000	b	B

TABELA 35- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TAMP-PO4
DENTRO DE DET C12 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	PRESENTE	8	76.262499	76.262499	a	A
2	2	AUSENTE	8	67.787500	67.787500	b	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
 D.M.S. 5% = 6.96861 - D.M.S. 1% = 9.47351

3. Efeito dos Estabilizadores Osmóticos e Tampão Fosfato sobre as Linhagens Haplóides A e V₅.

TABELA 36- QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
LINHAGEM	1	2.3858026	2.3858026	63.9697	0.00001
MEIO	8	6.6283258	0.8285407	22.2154	0.00001
TAMP.P04	1	1.0593000	1.0593000	28.4027	0.00002
LIN*MEI	8	2.6322622	0.3290328	8.9222	0.00001
LIN*TAM	1	0.0717654	0.0717654	1.9242	0.16576
MEI*TAM	8	3.0334128	0.3791766	10.1667	0.00001
RESIDUO	80	2.9836637	0.0372958		
TOTAL	107	18.7945326			

MEDIA GERAL = 0.335296

COEFICIENTE DE VARIACAO = 57.597 %

TABELA 37- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	A	54	0.483926	0.483926	a	A
2	2	V5	54	0.186667	0.186667	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 0.07398 - D.M.S. 1% = 0.09803

TABELA 38- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE MC DO FATOR MEIO

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	A	6	1.138333	1.138333	a	A
2	2	V5	6	0.059000	0.059000	b	B

TABELA 39- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE MCKC10.6 DO FATOR MEIO

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	A	6	0.994667	0.994667	a	A
2	2	V5	6	0.671667	0.671667	b	B

TABELA 40- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE MCKC11.2 DO FATOR MEIO

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	A	6	0.519667	0.519667	a	A
2	2	V5	6	0.235833	0.235833	b	A

TABELA 41- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE MCSM90.6 DO FATOR MEIO

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	A	6	0.614167	0.614167	a	A
2	2	V5	6	0.229667	0.229667	b	B

TABELA 42- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE MCSM91.2 DO FATOR MEIO

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	A	6	0.521833	0.521833	a	A
2	2	V5	6	0.235000	0.235000	b	A

TABELA 43- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE MCSOR0.6 DO FATOR MEIO

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	A	6	0.126333	0.126333	a	A
2	2	V5	6	0.004667	0.004667	a	A

TABELA 44- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE MCSOR1.2 DO FATOR MEIO

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	A	6	0.207833	0.207833	a	A
2	2	V5	6	0.003500	0.003500	a	A

TABELA 45- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE MCSACO.6 DO FATOR MEIO

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	A	6	0.137333	0.137333	a	A
2	2	V5	6	0.007000	0.007000	a	A

TABELA 46- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE MCSAC1.2 DO FATOR MEIO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	V5	6	0.233667	0.233667	a	A
2	1	A	6	0.095167	0.095167	a	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 0.22194 - D.M.S. 1% = 0.29408

TABELA 47- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	MCKC10.6	12	0.833167	0.833167	a	A
2	1	MC	12	0.598667	0.598667	ab	AB
3	4	MCSMg0.6	12	0.421917	0.421917	b	BC
4	5	MCSMg1.2	12	0.378417	0.378417	bc	BCD
5	3	MCKC11.2	12	0.377750	0.377750	bc	BCD
6	9	MCSAC1.2	12	0.164417	0.164417	cd	CDE
7	7	MCSOR1.2	12	0.105667	0.105667	d	DE
8	8	MCSAC0.6	12	0.072167	0.072167	d	E
9	6	MCSOR0.6	12	0.065500	0.065500	d	E

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 0.25143 - D.M.S. 1% = 0.29463

TABELA 48- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO
DENTRO DE A DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	MC	6	1.138333	1.138333	a	A
2	2	MCKC10.6	6	0.994667	0.994667	a	AB
3	4	MCSMg0.6	6	0.614167	0.614167	b	BC
4	5	MCSMg1.2	6	0.521833	0.521833	bc	CD
5	3	MCKC11.2	6	0.519667	0.519667	bc	CD
6	7	MCSOR1.2	6	0.207833	0.207833	cd	CDE
7	8	MCSAC0.6	6	0.137333	0.137333	d	DE
8	6	MCSOR0.6	6	0.126333	0.126333	d	DE
9	9	MCSAC1.2	6	0.095167	0.095167	d	E

TABELA 49- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO
DENTRO DE V5 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	MCKC10.6	6	0.671667	0.671667	a	A
2	3	MCKC11.2	6	0.235833	0.235833	b	B
3	5	MCSMg1.2	6	0.235000	0.235000	b	B
4	9	MCSAC1.2	6	0.233667	0.233667	b	B
5	4	MCSMg0.6	6	0.229667	0.229667	b	B
6	1	MC	6	0.059000	0.059000	b	B
7	8	MCSAC0.6	6	0.007000	0.007000	b	B
8	6	MCSOR0.6	6	0.004667	0.004667	b	B
9	7	MCSOR1.2	6	0.003500	0.003500	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 0.35557 - D.M.S. 1% = 0.41668

TABELA 50- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO
DENTRO DE AUSENTE DO FATOR TAMP.P04

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	MC	6	0.616167	0.616167	a	A
2	2	MCKC10.6	6	0.447500	0.447500	ab	AB
3	4	MCSMg0.6	6	0.377167	0.377167	ab	ABC
4	9	MCSAC1.2	6	0.305167	0.305167	abc	ABC
5	3	MCKC11.2	6	0.248833	0.248833	bc	ABC
6	8	MCSAC0.6	6	0.095500	0.095500	bc	BC
7	7	MCSOR1.2	6	0.019333	0.019333	c	C
8	6	MCSOR0.6	6	0.016667	0.016667	c	C
9	5	MCSMg1.2	6	0.000000	0.000000	c	C

TABELA 51- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO
DENTRO DE PRESENTE DO FATOR TAMP.P04

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	MCKC10.6	6	1.218833	1.218833	a	A
2	5	MCSMg1.2	6	0.756833	0.756833	b	B
3	1	MC	6	0.581167	0.581167	b	BC
4	3	MCKC11.2	6	0.506667	0.506667	bc	BCD
5	4	MCSMg0.6	6	0.466667	0.466667	bcd	BCD
6	7	MCSOR1.2	6	0.192000	0.192000	cde	CDE
7	6	MCSOR0.6	6	0.114333	0.114333	de	DE
8	8	MCSAC0.6	6	0.048833	0.048833	e	E
9	9	MCSAC1.2	6	0.023667	0.023667	e	E

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 0.35557 - D.M.S. 1% = 0.41668

TABELA 52- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO
DENTRO DE A DO FATOR LINHAGEM E AUSENTE DO FATOR TAMP.P04

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	MC	3	1.203333	1.203333	a	A
2	2	MCKC10.6	3	0.725000	0.725000	ab	AB
3	4	MCSMg0.6	3	0.526667	0.526667	bc	BC
4	3	MCKC11.2	3	0.390000	0.390000	bcd	BC
5	8	MCSAC0.6	3	0.178333	0.178333	cd	BC
6	9	MCSAC1.2	3	0.147000	0.147000	cd	BC
7	7	MCSOR1.2	3	0.035000	0.035000	cd	C
8	6	MCSOR0.6	3	0.026667	0.026667	cd	C
9	5	MCSMg1.2	3	0.000000	0.000000	c	C

TABELA 53- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO
DENTRO DE A DO FATOR LINHAGEM E PRESENTE DO FATOR TAMP.P04

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	MCKC10.6	3	1.264333	1.264333	a	A
2	1	MC	3	1.073333	1.073333	ab	AB
3	5	MCSMg1.2	3	1.043667	1.043667	ab	AB
4	4	MCSMg0.6	3	0.701667	0.701667	bc	ABC
5	3	MCKC11.2	3	0.649333	0.649333	bc	BCD
6	7	MCSOR1.2	3	0.380667	0.380667	cd	CDE
7	6	MCSOR0.6	3	0.226000	0.226000	cd	CDE
8	8	MCSAC0.6	3	0.096333	0.096333	c	DE
9	9	MCSAC1.2	3	0.043333	0.043333	d	E

TABELA 54- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO
DENTRO DE V5 DO FATOR LINHAGEM E AUSENTE DO FATOR TAMP.P04

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	9	MCSAC1.2	3	0.463333	0.463333	a	A
2	4	MCSMg0.6	3	0.227667	0.227667	a	A
3	2	MCKC10.6	3	0.170000	0.170000	a	A
4	3	MCKC11.2	3	0.107667	0.107667	a	A
5	1	MC	3	0.029000	0.029000	a	A
6	8	MCSAC0.6	3	0.012667	0.012667	a	A
7	6	MCSOR0.6	3	0.006667	0.006667	a	A
8	7	MCSOR1.2	3	0.003667	0.003667	a	A
9	5	MCSMg1.2	3	0.000000	0.000000	a	A

TABELA 55- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO
DENTRO DE V5 DO FATOR LINHAGEM E PRESENTE DO FATOR TAMP.P04

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	MCKC10.6	3	1.173333	1.173333	a	A
2	5	MCSMg1.2	3	0.470000	0.470000	b	B
3	3	MCKC11.2	3	0.364000	0.364000	b	B
4	4	MCSMg0.6	3	0.231667	0.231667	c	B
5	1	MC	3	0.099000	0.099000	d	B
6	9	MCSAC1.2	3	0.004000	0.004000	e	B
7	7	MCSQR1.2	3	0.003333	0.003333	d	B
8	6	MCSOR0.6	3	0.002667	0.002667	e	B
9	8	MCSAC0.6	3	0.001333	0.001333	d	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 0.50286 - D.M.S. 1% = 0.58927

TABELA 56- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TAMP.P04

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	PRESENTE	54	0.434333	0.434333	a	A
2	1	AUSENTE	54	0.236259	0.236259	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 0.07398 - D.M.S. 1% = 0.09803

TABELA 57- QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
LINHAGEM	1	8.0560355	8.0560355	0.5691	0.53895
MEIO	8	16233.5704688	2029.1963086	143.3485	0.00001
TAMP.P04	1	4307.7785579	4307.7785579	304.3145	0.00001
LIN*MEI	8	467.5979687	58.4497461	4.1291	0.00122
LIN*TAM	1	160.4411661	160.4411661	11.3340	0.00194
MEI*TAM	8	13871.1252503	1733.8906563	122.4873	0.00001
RESIDUO	44	622.8499568	14.1556808		
TOTAL	71	35671.4194041			

MEDIA GERAL = 85.926666

COEFICIENTE DE VARIACAO = 4.379 %

TABELA 58- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	6	MCSOR0.6	8	98.924999	98.924999	a	A
2	8	MCGLI0.6	8	97.549999	97.549999	a	AB
3	7	MCSOR1.2	8	95.700003	95.700003	ab	AB
4	4	MCSMg0.6	8	90.840002	90.840002	bc	BC
5	9	MCSAC1.2	8	87.512501	87.512501	cd	C
6	1	MC	8	86.862499	86.862499	cd	C
7	3	MCKC11.2	8	85.799999	85.799999	cd	C
8	2	MCKC10.6	8	84.212502	84.212502	d	C
9	5	MCSMg1.2	8	45.937500	45.937500	e	D

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 6.14823 - D.M.S. 1% = 7.27891

TABELA 59- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO
DENTRO DE A DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	6	MCSOR0.6	4	97.849998	97.849998	a	A
2	8	MCGLI0.6	4	95.099998	95.099998	ab	AB
3	7	MCSOR1.2	4	93.050003	93.050003	abc	ABC
4	3	MCKC11.2	4	90.375000	90.375000	abc	ABC
5	9	MCSAC1.2	4	89.325001	89.325001	abc	ABC
6	4	MCSMg0.6	4	88.780003	88.780003	bc	ABC
7	2	MCKC10.6	4	87.125004	87.125004	bc	BC
8	1	MC	4	84.699997	84.699997	c	C
9	5	MCSMg1.2	4	44.025002	44.025002	d	D

TABELA 60- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO
DENTRO DE V5 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	6	MCSOR0.6	4	100.000000	100.000000	a	A
2	8	MCGLI0.6	4	100.000000	100.000000	a	A
3	7	MCSOR1.2	4	98.350002	98.350002	a	AB
4	4	MCSMg0.6	4	92.900002	92.900002	ab	ABC
5	1	MC	4	89.025002	89.025002	bc	BCD
6	9	MCSAC1.2	4	85.700001	85.700001	bc	CD
7	2	MCKC10.6	4	81.299999	81.299999	c	D
8	3	MCKC11.2	4	81.224998	81.224998	c	D
9	5	MCSMg1.2	4	47.849998	47.849998	d	E

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 8.69491 - D.M.S. 1% = 10.29394

TABELA 61- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TAMP.P04

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	PRESENTE	36	93.661667	93.661667	a	A
2	1	AUSENTE	36	78.191667	78.191667	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 1.78965 - D.M.S. 1% = 2.38787

TABELA 62- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TAMP.P04
DENTRO DE A DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	PRESENTE	18	91.834445	91.834445	a	A
2	1	AUSENTE	18	79.350001	79.350001	b	B

TABELA 63- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TAMP.P04
DENTRO DE V5 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	PRESENTE	18	95.488889	95.488889	a	A
2	1	AUSENTE	18	77.033334	77.033334	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 2.53095 - D.M.S. 1% = 3.37696

TABELA 64- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO
DENTRO DE AUSENTE DO FATOR TAMP.P04

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	6	MCSOR0.6	4	100.000000	100.000000	a	A
2	8	MCGLIO.6	4	97.250000	97.250000	ab	A
3	7	MCSOR1.2	4	93.050003	93.050003	abc	AB
4	4	MCSMg0.6	4	91.025002	91.025002	bc	AB
5	1	MC	4	85.875000	85.875000	cd	BC
6	3	MCKC11.2	4	79.250000	79.250000	d	C
7	2	MCKC10.6	4	78.650002	78.650002	d	C
8	9	MCSAC1.2	4	78.625000	78.625000	c	C
9	5	MCSMg1.2	4	0.000000	0.000000	e	D

TABELA 65- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO
DENTRO DE PRESENTE DO FATOR TAMP.P04

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	7	MCSOR1.2	4	98.350002	98.350002	a	A
2	6	MCSOR0.6	4	97.849998	97.849998	a	AB
3	8	MCGLI0.6	4	97.849998	97.849998	a	AB
4	9	MCSAC1.2	4	96.400002	96.400002	ab	AB
5	3	MCKC11.2	4	92.349998	92.349998	ab	AB
6	5	MCSMg1.2	4	91.875000	91.875000	ab	AB
7	4	MCSMg0.6	4	90.655003	90.655003	ab	AB
8	2	MCKC10.6	4	89.775002	89.775002	ab	AB
9	1	MC	4	87.849998	87.849998	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 8.69491 - D.M.S. 1% = 10.29394

4. Fenótipo Cor em Função do Gradiente de Concentração de KCl em Linhagens, Deterioradas e Revertentes.

TABELA 66- QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
CONC.KCL	7	2.5173642			
LINHAGEM	5	8.7305318	1.7461064	39.8408	0.00001
RESIDUO	131	5.7413473	0.0438271		
TOTAL	143	16.9892433			

MEDIA GERAL = 0.237576

COEFICIENTE DE VARIACAO = 88.119 %

TABELA 67- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	C10	24	0.676500	0.676500	a	A
2	4	C12	24	0.446833	0.446833	b	B
3	5	G#	24	0.202750	0.202750	c	C
4	1	A	24	0.053833	0.053833	cd	C
5	6	HV94	24	0.028792	0.028792	cd	C
6	2	V5	24	0.016750	0.016750	d	C

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 0.17488 - D.M.S. 1% = 0.20759

TABELA 68- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE MC DO FATOR CONC.KCL

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	C10	3	0.674667	0.674667	a	A
2	1	A	3	0.112000	0.112000	b	AB
3	5	G#	3	0.080000	0.080000	b	B
4	4	C12	3	0.063333	0.063333	b	B
5	6	HV94	3	0.010667	0.010667	b	B
6	2	V5	3	0.002000	0.002000	b	B

TABELA 69- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE 0.2M DO FATOR CONC.KCL

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	C10	3	1.388000	1.388000	a	A
2	5	G#	3	0.554667	0.554667	b	B
3	4	C12	3	0.534667	0.534667	b	B
4	1	A	3	0.123333	0.123333	bc	B
5	6	HV94	3	0.011667	0.011667	c	B
6	2	V5	3	0.004000	0.004000	c	B

TABELA 70-TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE 0.4M DO FATOR CONC.KCL

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	C10	3	1.074667	1.074667	a	A
2	4	C12	3	0.685333	0.685333	a	AB
3	5	G#	3	0.186667	0.186667	b	BC
4	1	A	3	0.097667	0.097667	b	C
5	6	HV94	3	0.040000	0.040000	b	C
6	2	V5	3	0.022000	0.022000	b	C

TABELA 71- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE 0.6M DO FATOR CONC.KCL

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	C10	3	0.888000	0.888000	a	A
2	4	C12	3	0.742667	0.742667	a	A
3	5	G#	3	0.408000	0.408000	ab	AB
4	1	A	3	0.050000	0.050000	b	B
5	6	HV94	3	0.041333	0.041333	b	B
6	2	V5	3	0.023333	0.023333	b	B

TABELA 72- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE 0.8M DO FATOR CONC.KCL

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	C12	3	0.550667	0.550667	a	A
2	3	C10	3	0.520000	0.520000	ab	A
3	5	G#	3	0.253333	0.253333	abc	A
4	2	V5	3	0.041333	0.041333	bc	A
5	6	HV94	3	0.028667	0.028667	bc	A
6	1	A	3	0.013333	0.013333	c	A

TABELA 73- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE 1.0M DO FATOR CONC.KCL

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	C12	3	0.628000	0.628000	a	A
2	3	C10	3	0.605333	0.605333	ab	A
3	5	G#	3	0.123333	0.123333	bc	AB
4	6	HV94	3	0.050333	0.050333	c	AB
5	2	V5	3	0.018000	0.018000	c	B
6	1	A	3	0.013333	0.013333	c	B

TABELA 74- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE 1.2M DO FATOR CONC.KCL

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	C12	3	0.320000	0.320000	a	A
2	3	C10	3	0.248000	0.248000	a	A
3	6	HV94	3	0.036333	0.036333	a	A
4	1	A	3	0.017667	0.017667	a	A
5	2	V5	3	0.015667	0.015667	a	A
6	5	G#	3	0.015000	0.015000	a	A

TABELA 75- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE 2.4M DO FATOR CONC.KCL

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	C12	3	0.050000	0.050000	a	A
2	3	C10	3	0.013333	0.013333	a	A
3	6	HV94	3	0.011333	0.011333	a	A
4	2	V5	3	0.007667	0.007667	a	A
5	1	A	3	0.003333	0.003333	a	A
6	5	G#	3	0.001000	0.001000	a	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 0.49463 - D.M.S. 1% = 0.58716

TABELA 76- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONC.KCL

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	0.2M	18	0.436056	0.436056	a	A
2	4	0.6M	18	0.358889	0.358889	ab	AB
3	3	0.4M	18	0.351056	0.351056	ab	AB
4	6	1.0M	18	0.239722	0.239722	abc	ABC
5	5	0.8M	18	0.234556	0.234556	abc	ABC
6	1	MC	18	0.157111	0.157111	bcd	BC
7	7	1.2M	18	0.108778	0.108778	cd	BC
8	8	2.4M	18	0.014444	0.014444	d	C

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 0.21476 - D.M.S. 1% = 0.25194

TABELA 77- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONC.KCL
DENTRO DE A DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	0.2M	3	0.123333	0.123333	a	A
2	1	MC	3	0.112000	0.112000	a	A
3	3	0.4M	3	0.097667	0.097667	a	A
4	4	0.6M	3	0.050000	0.050000	a	A
5	7	1.2M	3	0.017667	0.017667	a	A
6	6	1.0M	3	0.013333	0.013333	a	A
7	5	0.8M	3	0.013333	0.013333	a	A
8	8	2.4M	3	0.003333	0.003333	a	A

TABELA 78- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONC.KCL
DENTRO DE V5 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	5	0.8M	3	0.041333	0.041333	a	A
2	4	0.6M	3	0.023333	0.023333	a	A
3	3	0.4M	3	0.022000	0.022000	a	A
4	6	1.0M	3	0.018000	0.018000	a	A
5	7	1.2M	3	0.015667	0.015667	a	A
6	8	2.4M	3	0.007667	0.007667	a	A
7	2	0.2M	3	0.004000	0.004000	a	A
8	1	MC	3	0.002000	0.002000	a	A

TABELA 79- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONC.KCL
DENTRO DE C10 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	0.2M	3	1.388000	1.388000	a	A
2	3	0.4M	3	1.074667	1.074667	ab	AB
3	4	0.6M	3	0.888000	0.888000	abc	AB
4	1	MC	3	0.674667	0.674667	bcd	BC
5	6	1.0M	3	0.605333	0.605333	bcd	BCD
6	5	0.8M	3	0.520000	0.520000	cde	BCD
7	7	1.2M	3	0.248000	0.248000	de	CD
8	8	2.4M	3	0.013333	0.013333	e	D

TABELA 80- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONC.KCL
DENTRO DE C12 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	0.6M	3	0.742667	0.742667	a	A
2	3	0.4M	3	0.685333	0.685333	a	A
3	6	1.0M	3	0.628000	0.628000	a	AB
4	5	0.8M	3	0.550667	0.550667	ab	AB
5	2	0.2M	3	0.534667	0.534667	ab	AB
6	7	1.2M	3	0.320000	0.320000	ab	AB
7	1	MC	3	0.063333	0.063333	b	B
8	8	2.4M	3	0.050000	0.050000	b	B

TABELA 81- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONC.KCL
DENTRO DE G# DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	0.2M	3	0.554667	0.554667	a	A
2	4	0.6M	3	0.408000	0.408000	ab	A
3	5	0.8M	3	0.253333	0.253333	ab	A
4	3	0.4M	3	0.186667	0.186667	ab	A
5	6	1.0M	3	0.123333	0.123333	ab	A
6	1	MC	3	0.080000	0.080000	ab	A
7	7	1.2M	3	0.015000	0.015000	b	A
8	8	2.4M	3	0.001000	0.001000	b	A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONC.KCL

TABELA B2- DENTRO DE HV94 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	6	1.0M	3	0.050333	0.050333	a	A
2	4	0.6M	3	0.041333	0.041333	a	A
3	3	0.4M	3	0.040000	0.040000	a	A
4	7	1.2M	3	0.036333	0.036333	a	A
5	5	0.8M	3	0.028667	0.028667	a	A
6	2	0.2M	3	0.011667	0.011667	a	A
7	8	2.4M	3	0.011333	0.011333	a	A
8	1	MC	3	0.010667	0.010667	a	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 0.52605 - D.M.S. 1% = 0.61711

TABELA B3- QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
MEIOS	7	45658.6324190			
LINHAGEM	5	1262.1424611	252.4284922	9.1360	0.00001
RESIDUO	83	2293.2987532	27.6301055		
TOTAL	95	49214.0736333			

MEDIA GERAL = 82.428123

COEFICIENTE DE VARIACAO = 6.377 %

TABELA B4- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	V5	16	87.187499	87.187499	a	A
2	5	G#	16	84.868752	84.868752	ab	AB
3	6	HV94	16	84.856250	84.856250	ab	AB
4	3	C10	16	80.849999	80.849999	bc	ABC
5	4	C12	16	80.581248	80.581248	bc	BC
6	1	A	16	76.225000	76.225000	c	C

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 5.42136 - D.M.S. 1% = 6.46673

TABELA 85- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE MC DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	5	G#	2	100.000000	100.000000	a	A
2	6	HV94	2	100.000000	100.000000	a	A
3	3	C10	2	92.300003	92.300003	a	A
4	1	A	2	91.800003	91.800003	a	A
5	4	C12	2	89.899994	89.899994	a	A
6	2	V5	2	88.199997	88.199997	a	A

TABELA 86- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE 0.2M DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	6	HV94	2	100.000000	100.000000	a	A
2	2	V5	2	97.099998	97.099998	a	A
3	5	G#	2	96.650002	96.650002	a	A
4	1	A	2	94.599998	94.599998	a	A
5	3	C10	2	93.949997	93.949997	a	A
6	4	C12	2	92.250000	92.250000	a	A

TABELA 87- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE 0.4M DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	6	HV94	2	100.000000	100.000000	a	A
2	5	G#	2	98.900002	98.900002	a	A
3	2	V5	2	94.300003	94.300003	a	A
4	3	C10	2	93.900002	93.900002	a	A
5	4	C12	2	91.949997	91.949997	a	A
6	1	A	2	89.199997	89.199997	a	A

TABELA 88- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE 0.6M DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	6	HV94	2	100.000000	100.000000	a	A
2	5	G#	2	96.250000	96.250000	a	A
3	2	V5	2	91.199997	91.199997	a	A
4	4	C12	2	90.050003	90.050003	a	A
5	3	C10	2	88.849998	88.849998	a	A
6	1	A	2	88.599998	88.599998	a	A

TABELA 89- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE 0.8M DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	V5	2	94.099998	94.099998	a	A
2	6	HV94	2	93.949997	93.949997	a	A
3	5	G#	2	93.850006	93.850006	a	A
4	3	C10	2	91.149994	91.149994	a	A
5	4	C12	2	88.649994	88.649994	a	A
6	1	A	2	80.500000	80.500000	a	A

TABELA 90- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE 1.0M DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	V5	2	97.099998	97.099998	a	A
2	6	HV94	2	90.000000	90.000000	ad	AB
3	5	G#	2	89.650002	89.650002	ab	AB
4	4	C12	2	88.149994	88.149994	ab	AB
5	3	C10	2	87.699997	87.699997	ab	AB
6	1	A	2	75.000000	75.000000	b	B

TABELA 91- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE 1.2M DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	V5	2	91.400002	91.400002	a	A
2	4	C12	2	81.500000	81.500000	ad	AB
3	6	HV94	2	79.900002	79.900002	abc	AB
4	5	G#	2	77.800003	77.800003	abc	AB
5	3	C10	2	71.800003	71.800003	bc	B
6	1	A	2	65.800003	65.800003	c	B

TABELA 92- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM
DENTRO DE 2.4M DO FATOR MEIOS

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	V5	2	44.099998	44.099998	a	A
2	3	C10	2	27.150002	27.150002	b	AB
3	5	G#	2	25.850000	25.850000	b	AB
4	1	A	2	24.299999	24.299999	b	B
5	4	C12	2	22.200001	22.200001	b	B
6	6	HV94	2	15.000000	15.000000	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 15.33391 - D.M.S. 1% = 18.29067

TABELA 93- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS

NUM.Ordem	NUM.Trat.	NOME	NUM.Repet.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	0.2M	12	95.758333	95.758333	a	A
2	3	0.4M	12	94.708333	94.708333	a	A
3	1	MC	12	93.699999	93.699999	ab	A
4	4	0.6M	12	92.491666	92.491666	ab	A
5	5	0.8M	12	90.366665	90.366665	ab	A
6	6	1.0M	12	87.933332	87.933332	b	A
7	7	1.2M	12	78.033335	78.033335	c	B
8	8	2.4M	12	26.433333	26.433333	d	C

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 6.66746 - D.M.S. 1% = 7.85293

TABELA 94- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE A DO FATOR LINHAGEM

NUM.Ordem	NUM.Trat.	NOME	NUM.Repet.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	0.2M	2	94.599998	94.599998	a	A
2	1	MC	2	91.800003	91.800003	a	AB
3	3	0.4M	2	89.199997	89.199997	ab	AB
4	4	0.6M	2	88.599998	88.599998	ab	AB
5	5	0.8M	2	80.500000	80.500000	abc	ABC
6	6	1.0M	2	75.000000	75.000000	bc	BC
7	7	1.2M	2	65.800003	65.800003	c	C
8	8	2.4M	2	24.299999	24.299999	d	D

TABELA 95- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE V5 DO FATOR LINHAGEM

NUM.Ordem	NUM.Trat.	NOME	NUM.Repet.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	0.2M	2	97.099998	97.099998	a	A
2	6	1.0M	2	97.099998	97.099998	a	A
3	3	0.4M	2	94.300003	94.300003	a	A
4	5	0.8M	2	94.099998	94.099998	a	A
5	7	1.2M	2	91.400002	91.400002	a	A
6	4	0.6M	2	91.199997	91.199997	a	A
7	1	MC	2	88.199997	88.199997	a	A
8	8	2.4M	2	44.099998	44.099998	b	B

TABELA 96- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE C10 DO FATOR LINHAGEM

NUM.Ordem	NUM.Trat.	NOME	NUM.Repet.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	0.2M	2	93.949997	93.949997	a	A
2	3	0.4M	2	93.900002	93.900002	a	A
3	1	MC	2	92.300003	92.300003	a	A
4	5	0.8M	2	91.149994	91.149994	a	A
5	4	0.6M	2	88.849998	88.849998	a	AB
6	6	1.0M	2	87.699997	87.699997	ab	AB
7	7	1.2M	2	71.800003	71.800003	b	B
8	8	2.4M	2	27.150002	27.150002	c	C

TABELA 97- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE C12 DO FATOR LINHAGEM

NUM.Ordem	NUM.Trat.	NOME	NUM.Repet.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	0.2M	2	92.250000	92.250000	a	A
2	3	0.4M	2	91.949997	91.949997	a	A
3	4	0.6M	2	90.050003	90.050003	a	A
4	1	MC	2	89.899994	89.899994	a	A
5	5	0.8M	2	88.649994	88.649994	a	A
6	6	1.0M	2	88.149994	88.149994	a	A
7	7	1.2M	2	81.500000	81.500000	a	A
8	8	2.4M	2	22.200001	22.200001	b	B

TABELA 98- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS
DENTRO DE G# DO FATOR LINHAGEM

NUM.Ordem	NUM.Trat.	NOME	NUM.Repet.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	MC	2	100.000000	100.000000	a	A
2	3	0.4M	2	98.900002	98.900002	a	A
3	2	0.2M	2	96.650002	96.650002	a	AB
4	4	0.6M	2	96.250000	96.250000	a	AB
5	5	0.8M	2	93.850006	93.850006	ab	AB
6	6	1.0M	2	89.650002	89.650002	ab	AB
7	7	1.2M	2	77.800003	77.800003	b	B
8	8	2.4M	2	25.850000	25.850000	c	C

TABELA 99- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIOS

DENTRO DE HV94 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	MC	2	100.000000	100.000000	a	A
2	2	0.2M	2	100.000000	100.000000	a	A
3	3	0.4M	2	100.000000	100.000000	a	A
4	4	0.6M	2	100.000000	100.000000	a	A
5	5	0.8M	2	93.949997	93.949997	ab	AB
6	6	1.0M	2	90.000000	90.000000	ab	AB
7	7	1.2M	2	79.900002	79.900002	b	B
8	8	2.4M	2	15.000000	15.000000	c	C

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 16.33189 - D.M.S. 1% = 19.23568

5. Fenótipo Cor em Função da Privação de Nutrientes (a partir de MC), em Linhagens Normal e Deteriorada Presença e Ausência do Estabilizador Osmótico KCl 0,6M.

TABELA 100- QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
LINHAGEM	1	129.8292644	129.8292644	29.9328	0.00002
MEIO	12	3175.6872136	264.6406011	61.0142	0.00001
EST.OSM	1	218.6579013	218.6579013	50.4126	0.00001
LIN*MEI	12	57.5083047	4.7923587	1.1049	0.37177
LIN*EST	1	2.1081390	2.1081390	0.4860	0.50477
MEI*EST	12	324.4196040	27.0349670	6.2330	0.00001
RESIDUO	64	277.5912806	4.3373638		
TOTAL	103	4185.8017075			

MEDIA GERAL = 88.213463

COEFICIENTE DE VARIACAO = 2.361 %

TABELA 101- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	V5	52	89.330770	89.330770	a	A
2	1	A	52	87.096153	87.096153	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 0.81646 - D.M.S. 1% = 1.08419

TABELA 102- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	12	s/VITAMI	8	91.287500	91.287500	a	A
2	11	s/CASEIN	8	90.975000	90.975000	a	A
3	13	s/VIT+PB	8	90.837502	90.837502	a	A
4	3	s/KCl	8	90.750002	90.750002	a	A
5	4	s/KH2PO4	8	90.749998	90.749998	a	A
6	2	s/NaNO3	8	89.850000	89.850000	a	A
7	6	s/ZnSO4	8	89.562500	89.562500	a	A
8	5	s/MgSO4	8	89.375000	89.375000	a	A
9	10	s/EXT.LV	8	89.000000	89.000000	a	A
10	9	s/PEPITO	8	88.587502	88.587502	a	A
11	7	s/FeSO4	8	88.349998	88.349998	a	A
12	1	MC	8	88.037498	88.037498	a	A
13	8	s/GLUCOS	8	69.412498	69.412498	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 3.58589 - D.M.S. 1% = 4.16243

TABELA 103- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO
DENTRO DE AUSENTE DO FATOR EST.OSM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	12	s/VITAMI	4	93.325001	93.325001	a	A
2	7	s/FeSO4	4	93.099998	93.099998	a	A
3	6	s/ZnSO4	4	92.375000	92.375000	ab	A
4	3	s/KCl	4	92.150002	92.150002	ab	A
5	4	s/KH2PO4	4	91.824997	91.824997	ab	A
6	13	s/VIT+PB	4	91.600002	91.600002	ab	A
7	11	s/CASEIN	4	90.700001	90.700001	ab	A
8	5	s/MgSO4	4	90.224998	90.224998	ab	A
9	9	s/PEPITO	4	89.849998	89.849998	ab	A
10	2	s/NaNO3	4	89.599998	89.599998	ab	A
11	1	MC	4	88.849998	88.849998	ab	A
12	10	s/EXT.LV	4	87.650002	87.650002	b	A
13	8	s/GLUCOS	4	74.375000	74.375000	c	B

TABELA 104- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO
DENTRO DE PRESENTE DO FATOR EST.OSM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	11	s/CASEIN	4	91.250000	91.250000	a	A
2	10	s/EXT.LV	4	90.349998	90.349998	a	A
3	2	s/NaNO3	4	90.100002	90.100002	a	A
4	13	s/VIT+PB	4	90.075001	90.075001	a	A
5	4	s/KH2PO4	4	89.674999	89.674999	a	A
6	3	s/KCl	4	89.350002	89.350002	a	AB
7	12	s/VITAMI	4	89.250000	89.250000	a	AB
8	5	s/MgSO4	4	88.525002	88.525002	ab	AB
9	9	s/PEPITO	4	87.325005	87.325005	ab	AB
10	1	MC	4	87.224998	87.224998	ab	AB
11	6	s/ZnSO4	4	86.750000	86.750000	ad	AB
12	7	s/FeSO4	4	83.599998	83.599998	b	B
13	8	s/GLUCOS	4	64.449997	64.449997	c	C

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 5.07121 - D.M.S. 1% = 5.88656

TABELA 105- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EST.OSM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	AUSENTE	52	89.663461	89.663461	a	A

TABELA 106- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EST.OSM
DENTRO DE A DO FATOR LINHAGEM E MC DO FATOR MEIO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	AUSENTE	2	89.199997	89.199997	a	A
2	2	PRESENTE	2	86.599998	86.599998	a	A

TABELA 107- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EST.OSM
DENTRO DE V5 DO FATOR LINHAGEM E s/NaNO3 DO FATOR MEIO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	PRESENTE	2	91.300003	91.300003	a	A
2	1	AUSENTE	2	90.050003	90.050003	a	A

**6. Efeito da Privação de Nutrientes (a partir de MM) em
Linhagem Normal e Deteriorada na Ausência ou Presença do
Estabilizador Osmótico $MgSO_4$ 0,6M ou KCl 0,6M.**

TABELA 108- QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
LINHAGEM	1	5352.0132201	5352.0132201	30.3717	0.00001
MEIO	9	24652.3021316	2739.1446813	15.5441	0.00001
EST.OSM.	2	2925.9426815	1462.9713408	8.3021	0.00083
LIN*MEI	9	6363.3486804	707.0387423	4.0123	0.00048
LIN*EST	2	1254.0464638	627.0232319	3.5582	0.03222
MEI*EST	18	16060.1001604	892.2277867	5.0632	0.00001
RESIDUO	78	13744.9502706	176.2173112		
TOTAL	119	70352.7036084			

MEDIA GERAL = 74.678337

COEFICIENTE DE VARIACAO = 17.776 %

TABELA 109- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE LINHAGEM

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	V5	60	81.356667	81.356667	a	A
2	1	A	60	68.000000	68.000000	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 4.82679 - D.M.S. 1% = 6.39745

TABELA 110- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE MEIO

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	MM-KH2PO	12	92.933334	92.933334	a	A
2	10	MC	12	89.649999	89.649999	ab	AB
3	5	MM-ZnSO4	12	88.425001	88.425001	abc	ABC
4	3	MM-KCl	12	85.075000	85.075000	abcd	ABCD
5	6	MM-FeSO4	12	74.249999	74.249999	bcd	BCD
6	9	MM-MgSO4	12	71.916667	71.916667	cde	BCD
7	2	MM-NaNO3	12	69.141666	69.141666	ce	BCD
8	1	MM-PROPE	12	68.875000	68.875000	ce	CD
9	7	MM-GLIC	12	63.508333	63.508333	e	DE
10	8	MM-PABA	12	43.008334	43.008334	f	E

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 17.66394 - D.M.S. 1% = 20.62613

TABELA 111- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EST.OSM.

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	SMg 0.6M	40	81.462500	81.462500	a	A
2	1	KCl 0.6M	40	72.720000	72.720000	b	AB
3	2	AUSENTE	40	69.852500	69.852500	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 7.09852 - D.M.S. 1% = 8.90778

TABELA 112- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EST.OSM.
DENTRO DE A DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	SMg 0.6M	20	70.339999	70.339999	a	A
2	1	KCl 0.6M	20	67.335000	67.335000	a	A
3	2	AUSENTE	20	66.325001	66.325001	a	A

TABELA 113- TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EST.OSM.
DENTRO DE V5 DO FATOR LINHAGEM

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	SMg 0.6M	20	92.585000	92.585000	a	A
2	1	KCl 0.6M	20	78.105000	78.105000	b	B
3	2	AUSENTE	20	73.380000	73.380000	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 10.03883 - D.M.S. 1% = 12.59751