O EFEITO DA PROTOPLASTIZAÇÃO NA INSTABILIDADE
MITÓTICA DE *Aspergillus nidulans*

MARISA VIEIRA DE QUEIROZ

- Bióloga -

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
FEVEREIRO - 1988

Q3e Queiroz, Marisa Vieira de
 O efeito da protoplastização na instabilidade mitótica de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1988.
 136p. ilustr.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia

1. Fungo - Instabilidade mitótica. 2. Fungo-Protoplasto. 3. Protoplasto. I. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

CDD 589.2

O EFEITO DA PROTOPLASTIZAÇÃO NA INSTABILIDADE
MITÔTICA DE *Aspergillus nidulans*

MARISA VIEIRA DE QUEIROZ

Aprovada em: 25/03/1988

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
Prof. ^a Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner	ESALQ/USP
Prof. ^a Dra. Lidia Favraud	UFRJ

Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO
Orientador

A

Manoel Florêncio de Queiroz e

Maria Salete Vieira de Queiroz,

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

- *Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo*, pela orientação, confiança e exemplo de dedicação a ciência.
- *Prof.^a Maria das Graças Medeiros*, por ter me iniciado na pesquisa.
- *Prof.^a Dra. Aline Pizzirani-Kleiner*, pelo estímulo, amizade e sugestões.
- *José Sebastião Cunha Fernandes, Márcia Cristina Furnaleta, Edérson Akio Kido e Prof. Cláudio Lopes de Souza Júnior*, pelo auxílio nas análises estatísticas.
- *Colegas, Luzia Doretto Paccola, Maria Helena Fungaro, Janete Magali Araújo, Gustavo H. Goldman e Cláudio Costa*, pelas sugestões e incentivo.
- *Liliana K. Mitsunaga*, pela ajuda na execução das fotografias.
- *Vânia Aparecida Vicente, Marta Maria Queiroz Aquino e Dr. Eudes de Freitas Aquino*, pelo incentivo, amizade e confiança.
- *Funcionários, Antonio José Rocha Campos, Carlos A. Nolasco e Sandra R. Campos*, do Laboratório de Genética de Microrganismos, pela ajuda na execução da parte experimental.

.iv.

- Colegas do Curso de Pós-Graduação, pela alegre convivência e apoio.
- Professores do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.
- Ao *CNPq* pela concessão de Bolsa de Estudos.

S U M Á R I O

	<u>Página</u>
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xiv
SUMMARY.	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.	4
2.1. Instabilidade Genética.	4
2.1.1. A Instabilidade Genética em Organismos Superiores	4
2.1.2. Instabilidade Genética em Bactérias.	8
2.1.3. Instabilidade Genética em Fungos	10
2.2. Protoplastos.	20
2.2.1. Fatores que Afetam a Liberação de Protoplastos	
2.2.2. Regeneração e Reversão de Protoplastos.	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Linhagens	35
3.1.1. Símbolos e Fenótipos dos Mutantes Utilizados neste Trabalho.	39

3.2. Meios de Cultura e Soluções.	40
3.2.1. Meio Mínimo (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953) ..	40
3.2.2. Meio Completo (AZEVEDO & COSTA, 1973) . .	40
3.2.3. Meio Completo Líquido	41
3.2.4. Meio Mínimo Líquido mais 2%.	41
3.2.5. Meio Completo 2x Concentrado	41
3.2.6. Solução de Vitaminas.	41
3.2.7. Meio de Acetato de Amônio (APIRION, 1962).	42
3.2.8. Meio Mínimo-Galactose (ROBERTS, 1959) ..	42
3.2.9. Solução de "Tween" 80.	42
3.2.10. Solução Salina.	43
3.2.11. Solução de Ácidos Nucléicos	43
3.2.12. Solução de Benlate [Metil(Butil-Car- bamoil)-2-Benzimidazole Carbamato], segundo HASTIE (1970).	44
3.2.13. Suplementos Adicionados ao Meio Míni- mo.	44
3.2.14. Tampão Fosfato pH = 5,8 (0,2 M).	45
3.2.15. Tampão Fosfato (0,02 M)	46
3.2.16. Solução de Giemsa.	46
3.2.17. Solução de HCl 1 N	46
3.2.18. Solução Sulfocrômica	46
3.2.19. Solução KCl 1,2 M.	47

	<u>Página</u>
3.2.20. Solução de KCl 0,6 M.	47
3.2.21. Solução de Enzimas	48
3.3. Placas de Análise Genética e de Regeneração dos Protoplastos.	48
3.4. Esterilização e Incubação	49
3.5. Obtenção e Regeneração de Protoplastos . .	49
3.5.1. Contagem de Protoplastos	51
3.5.2. Regeneração dos Protoplastos	51
3.6. Técnica de Coloração de Núcleos de Protoplasto (BORGES, 1987).	51
3.7. Isolamento de Setores Deteriorados origina dos da Linhagem "A".	52
3.8. Técnicas de Análise Genética	53
3.8.1. Obtenção de Heterocários	53
3.8.2. Isolamento de Diplóides	54
3.8.3. Análise Mitótica.	55
3.8.4. Análise Meiótica	55
3.8.5. Denominação dos Variantes Deteriora dos.	58
3.8.6. Análise Estatística.	58
4. RESULTADOS	60
4.1. Obtenção de Protoplastos e Regeneração. . .	60

	<u>Página</u>
4.2. Estudos Citológicos.	67
4.3. Setores Obtidos a Partir da Linhagem "A" . .	69
4.4. Análise Mitótica dos Setores Deteriorados..	75
4.4.1. Diplóides.	75
4.4.2. Haploidização.	75
4.4.3. Análise Mitótica dos Setores Dete- riorados (DETS e DEPS).	77
4.5. Análise Meiótica.	77
4.5.1. Localização dos Determinantes Genéti- cos de Deterioração nos Grupos de Li- gação.	77
5. DISCUSSÃO.	91
5.1. Liberação de Protoplastos e Regeneração . .	91
5.2. Coloração de Núcleos de Protoplastos. . . .	96
5.3. Obtenção de Setores a Partir da Linhagem "A" .	97
5.3.1. Setores Deteriorados.	99
5.3.2. Diâmetro dos Conídios.	101
5.3.3. Haploidização.	102
5.4. Análise Mitótica e Meiótica dos Variantes Deteriorados.	103
6. CONCLUSÕES.	111
7. BIBLIOGRAFIA	113

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Marcadores genéticos da linhagem "A" de <i>A. nidulans</i>	36
2 - Marcadores genéticos da linhagem <u>biA₁</u> ; <u>meth G₁</u> de <i>A. nidulans</i>	37
3 - Marcadores genéticos da linhagem "MSE" de <i>A. nidulans</i>	38
4 - Curva de obtenção de protoplastos da linhagem "A" e linhagem <u>biA₁</u> ; <u>meth G₁</u> em diferentes períodos de incubação. (1 h, 2 h, 3 h). .	63
5 - Curva de porcentagem de regeneração de protoplastos da linhagem "A" e linhagem <u>biA₁</u> ; <u>meth G₁</u> , em diferentes tempos de incubação. (1 h, 2 h, 3 h).	66
6 - Protoplastos da linhagem "A" com 1 hora (6a) e 3 horas (6b), de exposição às enzimas líti- cas. Coloração em Giemsa HCl (Merck). . .	68
7 - Variantes deterioradas (DETS) crescidas a 37°C por 7 - 10 dias.	70
8 - Variantes deterioradas (DEPS) crescidas a 37°C por 7 - 10 dias.	71

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Exemplos de fungos submetidos às técnicas de protoplastização ou esferoplastização . .	21
2 - Número de protoplastos obtidos das linhagens "A" (L ₁) e <u>biA</u> ₁ ; <u>meth</u> G ₁ (L ₂) em três tempos de exposição às enzimas líticas (T ₁ , T ₂ e T ₃)..	61
3 - Análise da variância dos valores de protoplastos obtidos das duas linhagens ("A" e " <u>biA</u> ₁ ; <u>meth</u> G ₁ ") em três períodos de digestão com enzimas líticas.	61
4 - Teste de Tukey para observar as diferenças entre as médias das três repetições nos diferentes tempos (T ₁ , T ₂ , T ₃) dentro de cada linhagem (L ₁ e L ₂).	62
5 - Porcentagem de regeneração de protoplastos em duas linhagens ("A" e <u>biA</u> ₁ ; <u>meth</u> G ₁), de <i>A. nidulans</i> em três períodos de exposição às enzimas líticas (T ₁ , T ₂ e T ₃).	64
6 - Análise da variância das porcentagens de regeneração.	65

TabelaPágina

7 - Teste de Tukey para comparar as médias das porcentagens de regeneração das duas linhagens de <i>A. nidulans</i> ("A" e <u>biA</u> ₁ ; <u>meth</u> G ₁) em três tempos de exposição à enzimas líticas..	65
8 - Número de núcleos de protoplastos da linhagem "A" (L ₁) e linhagem <u>biA</u> ₁ ; <u>meth</u> G ₁ (L ₂) de <i>A. nidulans</i> durante os três tempos de incubação com enzimas líticas (T ₁ , T ₂ e T ₃). . .	67
9 - Número e tipos de setores obtidos de colônias da linhagem "A" de <i>A. nidulans</i> que não foram protoplastizadas (A) e de colônias que sofreram protoplastização (B).	72
10 - Características morfológicas dos variantes deteriorados derivados da linhagem "A". . . .	73
11 - Descrição dos deteriorados derivados de colônias resultantes da regeneração de protoplastos.	74
12 - Diâmetro dos conídios dos diplóides, obtidos pelo cruzamento dos variantes deteriorados (DETS e DEPS) com a linhagem "MSE".	76
13 - Análise mitótica dos segregantes brancos resultantes do cruzamento dos variantes deteriorados (DETS) com a linhagem "MSE".	78

TabelaPágina

14 - Análise mitótica dos variantes deteriorados (DEPS).	79
15 - Localização dos determinantes genéticos de deterioração nos grupos de ligação.	80
16 - Segregantes obtidos através do ciclo sexual, pelo cruzamento dos deteriorados (DETS e DEPS) com a linhagem "MSE".	81
17 - Análise meiótica do cruzamento do variante DET 1 com a linhagem "MSE".	82
18 - Análise meiótica do cruzamento do variante DET 2 com a linhagem "MSE".	82
19 - Análise meiótica do cruzamento do variante DET 3 com a linhagem "MSE".	83
20 - Análise meiótica do cruzamento do variante DET 4 com a linhagem "MSE".	83
21 - Análise meiótica do cruzamento do variante DET 4.1 com a linhagem "MSE".	84
22 - Análise meiótica do cruzamento do variante DET 5 com a linhagem "MSE".	84
23 - Análise meiótica do cruzamento do variante DEP 1 com a linhagem "MSE".	85

TabelaPágina

24 - Análise meiótica do cruzamento do variante DEP 2 com a linhagem "MSE".	86
25 - Análise meiótica do cruzamento do variante DEP 3 com a linhagem "MSE".	86
26 - Análise mitótica do cruzamento do variante DEP 4 com a linhagem "MSE".	87
27 - Análise mitótica do cruzamento do variante DEP 5 com a linhagem "MSE".	88
28 - Teste de três pontos <u>proA</u> ₁ , <u>pabaA</u> ₆ , DEP 2 . .	88
29 - Teste de três pontos <u>proA</u> ₁ , <u>pabaA</u> ₆ , DEP 3. .	89
30 - Classificação dos variantes deteriorados (DETS e DEPS).	110

O EFEITO DA PROTOPLASTIZAÇÃO NA INSTABILIDADE MITÓTICA DE *Aspergillus nidulans*

Autora: MARISA VIEIRA DE QUEIROZ

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

Aspergillus nidulans é um fungo filamentoso muito apropriado para estudos de genética. Possui linhagens com duplicações cromossômicas que são instáveis mitoticamente. Uma delas, designada de "A", possui um segmento do cromossomo I duplicado e translocado para o cromossomo II, produzindo três tipos de setores: melhorados, deteriorados e heterocarióticos.

A protoplastização é uma técnica essencial para estudos de transformação e poucos trabalhos foram feitos que procurassem observar se a utilização desta técnica provoca alguma alteração, a nível genético, ao organismo que é submetido a ela. Por isso este trabalho teve como objetivo, verificar se a protoplastização altera a instabilidade mitótica da linhagem "A", através da observação do número e do tipo de setores produzidos por colônias resultantes da reversão de protoplastos, em comparação com colônias da mesma linhagem que não foram protoplastizadas. Foram isolados onze setores deteriorados a partir da linhagem "A" e feita

a análise genética. A seguir foram estudados os protoplas_tos, incluindo o período mais favorável entre três tempos de exposição às enzimas líticas, para obtenção de um maior número de protoplastos, uma maior porcentagem de regeneração e presença de protoplastos uninucleados da linhagem instável "A" e da linhagem haplóide estável biA₁; meth G₁. Sendo feita uma comparação entre as mesmas quanto a estes fatores.

Dos onze deteriorados analisados, quatro apresentaram seus determinantes de deterioração no cromossomo I, dois no cromossomo II, um no cromossomo III, dois no cromossomo VI, um no cromossomo VIII e um está envolvido num rearranjo entre os cromossomos III e VI. A linhagem "A" não mostrou diferenças significativas com relação a linhagem haplóide quanto ao número de protoplastos produzidos e a frequência de regeneração, nos diversos tempos analisados. O período ideal para a obtenção de maior número de protoplastos e maior frequência de regeneração foi o de três horas de digestão lítica. Além disso, foi feito também um estudo citológico do número de núcleos dos protoplastos e no período de três horas foi encontrado um número razoável de protoplastos uninucleados. Os protoplastos mostraram-se heterogêneos. Foi observado um aumento na frequência de setores amarelos e deteriorados e uma redução no número de setores verdes, nas colônias da linhagem "A" que foram protoplas_tizadas.

THE EFFECT OF PROTOPLASTING ON THE MITOTIC INSTABILITY IN *Aspergillus nidulans*

Author: MARISA VIEIRA DE QUEIROZ

Adviser: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

Aspergillus nidulans is a ideal filamentous fungus for genetic studies. Strains of *A. nidulans* carrying a chromossomic duplication are mitotically unstable. The strain "A" with a terminal segment of chromosome I translocated to chromosome II produces three kinds of sectors: Improved, deteriorated and heterokaryotic.

Protoplastization is an essential technique for transformation studies in fungi. Singe few studies are concerned to protoplastos and their influence on instability, the purpose of the present work was carried out aiming to know whether protoplasting would influence or not the mitotic instability of the "A" strain. This strain was submitted to protoplasting and the sectores obtained after protoplast reversion were genetically analysed and compared to the non-protoplasted strain "A". It was also compared the performance of strain "A" and biA₁; meth G₁ exposed to the different lytic treatment times in order to get better reversion, better protoplast yield and increasing in the

number of uninucleated ones.

From the eleven deteriorated sectors analysed, four of them have their determinant of deterioration in the chromossome I, two in chromossome II, one in chromossome III, two in chromossome VI, one in chromossome VIII and one is in a rearrangment between chromossome III and VI.

No significative difference was shown between strain "A" and biA₁; meth G₁ concerning to the number of protoplasts obtained and reversion frequencies in the different times of digestion. Three hours of lytic treatment was shown to be best one in order to get better protoplast yield, better reversion frequencies and increased number of uninucleated protoplasts although these ones were very heterogeneous.

After protoplasts reversion in the strain "A" colonies, It was observed an increasing in the frequency of yellow and deteriorated sectors, as well as decreasing in the number of green sectors.

1. INTRODUÇÃO

A instabilidade mitótica é um fenômeno já observado em muitos organismos. Ela está geralmente associada com a presença de material genético em excesso, mutações e outros fatores. Por isso seu valor evolutivo é provavelmente grande.

O fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* é muito utilizado em estudos de genética. Ele é um dos melhores modelos para o estudo da expressão dos genes em eucariotos. Isso porque seus esporos assexuais, os conídios, são uninucleados, ocorrem em grande número e sua germinação é rápida. Além disso, esse Ascomiceto possui ciclo sexual e parassexual, meio de crescimento bem definido e é de fácil manipulação em laboratório.

Linhagens de *A. nidulans* com um segmento cromossômico em excesso no genoma haplóide (um segmento na posição normal e outro translocado para outro cromossomo) mostram instabilidade mitótica. Elas produzem variantes fenotipicamente melhorados e tipos morfologicamente deteriora

dos. Entre essas linhagens com duplicações, a linhagem "A" descrita inicialmente por NGA & ROPER em 1969, tem sido bastante usada para se estudar a instabilidade mitótica. Ela possui uma duplicação de parte do cromossomo I, translocada para o cromossomo II, possuindo marcadores na região duplicata e marcas para requisitos nutricionais. Estudos sobre a instabilidade mitótica em *A. nidulans* já foram feitos através da semeadura de conídios, análise do número de setores obtidos e análise genética dos mesmos.

Dentre as novas técnicas utilizadas para manipulação genética, a protoplastização vem sendo bem desenvolvida em fungos filamentosos. Suas aplicações são inúmeras, podendo ser utilizada em experimentos de transformação, obtenção de mutantes, fusão de linhagens incompatíveis, etc. A ocorrência de protoplastos uninucleados, bem como uma boa frequência de regeneração são característicos desejáveis em uma técnica de protoplastização. Em *A. nidulans*, o micélio é geralmente utilizado para obtenção de protoplastos. Embora se diga que os protoplastos reverterem à colônias iguais as que lhe deram origem, poucos foram os trabalhos que demonstraram realmente essa fiel reversão a nível genético.

Devido a todos os fatores relacionados acima, este trabalho teve como objetivos:

- a) comparar a instabilidade mitótica de co

.3.

lônias da linhagem "A" que não foram protoplastizadas, com a instabilidade de colônias da mesma linhagem que sofreram protoplastização, através da comparação do número de setores obtidos em cada caso;

b) isolar setores deteriorados e fazer análise genética dos mesmos, mapeando os fatores que determinam a deterioração;

c) determinar o tempo de incubação mais apropriado com enzimas líticas, nas linhagens "A" e biA₁; meth G₁ visando obtenção de um maior número de protoplastos, com boa regeneração e com produção de protoplastos uninucleados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. INSTABILIDADE GENÉTICA

2.1.1. A INSTABILIDADE GENÉTICA EM ORGANISMOS SUPERIORES

Foi a partir da segunda década deste século, que os trabalhos relacionados com a instabilidade genética começaram a ser publicados. Durante certo período, os trabalhos pertinentes a este assunto se restringiram a organismos eucariotos superiores.

DEMEREK (1926) descreveu o caráter "miniature- α " em *Drosophila viride*, que possuía uma alta frequência de mutação, sendo o segundo caráter mais frequentemente mutado neste organismo. Em 1931 e 1937 este mesmo autor demonstrou a existência destes genes que mutavam espontaneamente em *Delphinium agacis* e *Drosophila melanogaster*, respectivamente. Quatro genes instáveis conhecidos em *Drosophila* e suas características foram estudados também por DEMEREK em 1941.

Estes genes chamados "mutáveis", foram observados também em milho, onde em certo número de casos de va-

riegação, ficou demonstrado que o tecido mosaico era devido a instabilidade de certos genes (RHOADES, 1941).

McCLINTOCK (1951, 1953, 1955, 1956) estudou a origem e o modelo de expressão da instabilidade genética, em alguns loci conhecidos em milho. Ela observou que havia um sistema extragênico controlando a expressão gênica, e que este era composto de duas unidades, então chamadas dissociador e ativador (Ds-Ac). Ambas sofrendo transposição de um local para outro no complemento cromossômico. Eles foram chamados de elementos controladores. FINCHAM & SASTRY (1974) investigaram os elementos controladores em milho. Segundo esses autores três classes de elementos são reconhecidas: "Doted (Dc), Ativador" (Ac) e Supressor mutador" (Spm). Os receptores de cada classe respondem somente aos seus próprios reguladores e são completamente não afetados pelos outros dois. Os elementos controladores estão espalhados em estoques de milho cultivados em diversas regiões geográficas. Eles podem bloquear, parcialmente ou totalmente, a expressão dos genes dos loci onde eles se integram.

Uma instabilidade somática foi detectada por SMITH & SAND (1957) em híbridos interespecíficos entre *Nicotiana langsdorffii* e *Nicotiana sandrae*. SAND (1957) observou a influência da temperatura na instabilidade somática destes híbridos.

BURNS & GERSTEL (1967) demonstraram que a variegação que ocorria nas flores derivadas do cruzamento de *Nicotiana tabacum* e *Nicotiana otophora* estava relacionada com a instabilidade estrutural do bloco de heterocromatina, com o qual o alelo carmin (Co^V) de *Nicotiana otophora* estava estreitamente ligado. GERSTEL & BURNS (1967) concluíram que a instabilidade estava associada com a introdução de heterocromatina de *Nicotiana otophora* em *Nicotiana tabacum*. Eles detectaram a instabilidade no núcleo interfásico, pela presença, ausência ou variação no tamanho da heterocromatina; na metáfase, pela variação no tamanho dos cromossomos em questão e no fenótipo, pela variegação.

A instabilidade do locus *pal* de *Antirrhinum majus* foi descrita por FINCHAM & HARRISON (1967).

GREEN (1967, 1969a e b) relatou as características do gene "white" de *Drosophila melanogaster*. O gene w^C mutava espontaneamente, em machos e fêmeas, para diferentes estados alélicos, variando o fenótipo de selvagem (w^+) a branco (w). O evento de mutação parecia ocorrer primariamente, senão exclusivamente, antes da meiose e parecia não envolver nenhum evento de recombinação ou algo similar. Os alelos derivados de w^C podiam ser estáveis ou mutáveis. As causas da alta frequência de mutação, foram discutidas em termos de um evento autônomo, e um evento controlado por

um elemento estranho, semelhante aos elementos controladores em milho. O gene w^c foi mapeado por permuta interalélica. Os resultados deram suporte a interpretação que o elemento controlador estava integrado em um sítio particular do gene "white". Foram descritas quatro transposições independentes do gene "white" para o cromossomo III em *Drosophila melanogaster*. Concluiu-se que os elementos controladores tinham propriedades equivalentes às de vírus temperado.

Em 1970 e 1975, GREEN, descreveu novos genes mutadores em *Drosophila melanogaster*. Um dos genes causava reversão do gene yellow-2 (y^2) para o tipo selvagem. Esse mutador só funcionava em fêmeas, era parcialmente dominante e parecia ser incapaz de reverter. O outro gene mutador (M^u) provocava a presença de duas classes de revertentes com igual frequência: aquela para um alelo com fenótipo intermediário e aquela para um alelo com fenótipo equivalente ao selvagem. ENGELS (1983) descreveu as características dos elementos transponíveis da família "P" em *Drosophila*.

GAVAZZI (1975) estudou a transmissão e os valores de ligação de um cromossomo X anormal em milho. Foi sugerido que esse cromossomo carregava uma região duplicada translocada para uma nova posição. Foram observados com frequência ciclos de quebra-fusão-ponte, em tecidos

dos do endosperma. GAVAZZI *et alii* (1977) descreveram linhagens de milho com um segmento duplicado fora da posição no braço longo do cromossomo X de milho (Dp 10-1, -2, -3, -4). A análise destas linhagens, sugeriu que a presença de cromatina extra levava a instabilidade cromossômica, conduzindo a uma perda parcial ou completa do segmento duplicado.

2.1.2. INSTABILIDADE GENÉTICA EM BACTÉRIAS

Em 1954, TREFFERS *et alii* reportaram a existência de uma linhagem K-12 de *E. coli*, que possuía uma alta taxa de mutação para resistência à estreptomicina. Caso similar foi observado por GOLDSTEIN & SMOOT (1955) em uma linhagem de *E. coli* com uma alta taxa de mutação auxotrófica. Esta linhagem chamada "Harvard" não diferia de seus parentais, exceto pela frequência com que vários mutantes surgiam.

Um novo caráter mutador foi encontrado por GUNDERSEN *et alii* (1962) em *E. coli*. Este caráter possuía propriedades geralmente atribuídas a determinantes genéticos de natureza epissômica, ocorrendo a perda espontânea do caráter, sendo esta aumentada pelo tratamento com irradiação ultravioleta e acridina. A perda aparentemente era per

manente, ocorrendo também a transferência do caráter para uma célula não mutadora, por infecção.

Reversões instáveis ocorridas no locus *su-leu* na linhagem *leu-151* de *Salmonella typhimurium* foram observadas por DAWSON & SMITH-KEARY (1963). A instabilidade foi explicada pela presença de unidades similares a elementos controladores, chamados epissomas controladores. Estes poderiam sofrer transposições, podendo levar na transposição o gene a que eles estavam ligados.

A transposição também pode ocorrer através de um bacteriófago. Um novo bacteriófago temperado, designado fago Mul, foi descrito por TAYLOR (1963), que causava algumas severas modificações genéticas no seu hospedeiro natural, a *E. coli* K-12. O profago de Mul aboliu a expressão fenotípica normal de muitos genes do hospedeiro, localizados no sítio cromossomal de integração do fago, ou adjacente a ele. MORSE (1967) detectou a instabilidade na reversão de um mutante polar extremo do operon galactose em *E. coli*.

Os elementos transponíveis quando inseridos em um locus, podem controlar a expressão do mesmo e causar larga escala de rearranjos nas sequências de DNA adjacentes. Tais elementos podem ter participação na evolução e

diferenciação (NEVER & SAEDLER, 1977). Segundo STARLINGER (1977) os elementos transponíveis são os bacteriófagos temperados, plasmídeos, os elementos Is e transposons. Os rearranjos cromossômicos são descritos como recombinação ilegítima. Esta difere da recombinação comumente chamada pela sua independência das funções de recombinação normal e da extensiva homologia base-sequência, entre os segmentos cromossômicos participantes (WEISBERG & ADHYA, 1977).

NEWTON *et alii* (1982) detectaram uma alta frequência de clones auxotróficos a partir de populações de diferentes linhagens de *Proteus mirabilis*. Estes mutantes foram quase sempre deficientes para a carbamil fosfatase sintetase e não revertiam para a condição prototrófica. Foi observada também a instabilidade genética para marcadores de resistência a drogas. Foi sugerida a presença de um transposon, que após causar a deleção do gene carbamil fosfato sintetase, poderia ou não permanecer na população, mantendo tais resistências em frequências variadas.

2.1.3. INSTABILIDADE GENÉTICA EM FUNGOS

A instabilidade genética foi estudada, principalmente, em dois fungos: *Neurospora crassa* e *Aspergillus*

nidulans. Esses dois organismos se tornaram destaques nos estudos de genética.

Em 1963, BARNETT & DE SERRES analisaram um sítio genético de *N. crassa* que era instável, possuindo dois alelos altamente mutáveis. Eles mutavam espontaneamente em uma alta frequência. NEWMEYER (1965) observou uma instabilidade somática em *N. crassa*, que foi determinada como sendo resultante de uma inversão pericêntrica. Estudos posteriores feitos por NEWMEYER & TAYLOR (1967) constataram que uma simples permuta dentro da região invertida dava origem a dois produtos recíprocos, um duplicado e o outro deficiente. O deficiente era letal e o duplicado muito instável. A segregação somática ocorrida nas colônias com a duplicação, foi explicada como sendo devido a permuta mitótica e a perda do material duplicado.

NEWMEYER & GALEAZZI (1977) fizeram uma análise genética da instabilidade da linhagem H4250 Dp(IL→IR) de *N. crassa*. NEWMEYER & GALLEAZZI (1978) e NEWMEYER *et alii* (1978) estudaram três mutantes de *N. crassa* (*mei-3*, *uvs-3* e *uvs-6*) que ocupavam três loci diferentes e que tinham quatro características em comum: sensibilidade a luz ultra-violeta; inibição pela histidina; bloqueio da meiose quando em homozigose e aumento da instabilidade das duplicações. Foi observado também, que a histidina sozinha aumentava a insta-

bilidade de duplicações, na ausência de qualquer um dos mutantes sensíveis à luz ultra-violeta.

Segundo PERKINS & BARRY (1977) algumas características são comuns a *N. crassa* e *A. nidulans* quanto a instabilidade de linhagens com duplicações: a) todas as duplicações são essencialmente instáveis; b) o material duplicado é perdido, por um ou mais passos dando origem efetivamente a derivados haplóides; c) qualquer um dos segmentos em duplicata: pode ser perdido; d) a instabilidade é aumentada por cafeína, azul de tripan e mutantes *uvr*; e) um fator recessivo reduz a instabilidade (AZEVEDO, 1975).

A. nidulans é um organismo favorável para se estudar a instabilidade genética. Ele possui meio de crescimento definido, ciclo sexual e parassexual, seus conídios são uninucleados, ele expressa autonomamente as marcas para coloração e possui diplóides vegetativos estáveis.

Os estudos sobre instabilidade genética em *A. nidulans* começaram na década de 50 (ROPER, 1952; PONTECORVO *et alii*, 1954; PONTECORVO & KAUFER, 1958; KAUFER, 1960 e 1961; JINKS, 1966; CROFT, 1966). Neste período a instabilidade era explicada através de três processos distintos: permuta mitótica, não disjunção mitótica e herança citoplasmática. BALL (1966) observou entre os revertentes meth₁ tipos que mostravam independência de metionina e instabilidade

de vegetativa. A análise mitótica e meiótica demonstrou a existência de uma translocação não-recíproca em um dos revertentes analisados. Com o trabalho de BAINBRIDGE & ROPER (1966) teve início o crescente interesse sobre as duplicações cromossômicas e seus efeitos em *A. nidulans*.

BALL (1967) descreveu a instabilidade cromossômica em *A. nidulans* relacionada com a supressão, e observou um efeito de posição tipo V. MILLINGTON-WARD (1967) observou a instabilidade em segregantes resultantes do cruzamento entre a linhagem $\underline{bi}_1$, $\underline{w}_3$, $\underline{s}_5$ e a linhagem $\underline{y}$, $\underline{pyro}_4$, $\underline{s}_{12}$ de *A. nidulans*. A provável causa da instabilidade foi determinada como sendo uma aberração cromossômica.

BAINBRIDGE & ROPER (1966) descreveram um novo e espontâneo processo que dava origem a alterações quantitativas no genótipo em mitose de *A. nidulans*. Segregantes carregando um segmento do grupo de ligação III em duplicata, foram derivados do cruzamento de linhagens livres de translocações, com uma linhagem com uma aparente translocação não recíproca. Estes segregantes com duplicações, tinham reduzido crescimento linear e foram designados "crinkled". Vários mecanismos foram sugeridos por NGA & ROPER (1966) para explicar a instabilidade mitótica em linhagens com duplicações, entre eles: deleção terminal, mutação e permuta mitótica. Deram ênfase a permuta desigual entre cromátides $\underline{ir}$

mãos durante a mitose, se somente um mecanismo fosse responsável pela instabilidade.

NGA & ROPER (1968) estudaram uma linhagem de *A. nidulans* que tinha um segmento do cromossomo I duplicado e translocado para o cromossomo II. Esta linhagem era instável e produzia três tipos de setores:

- a) *melhorados* - surgiam devido a perda de parte ou de todo o segmento em duplicata (NGA & ROPER, 1968);
- b) *deteriorados* - ocorriam devido a novas duplicações, provavelmente em "tandem", ou pela transposição do segmento duplicado (NGA & ROPER, 1968; AZEVEDO & ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971);
- c) *heterocarióticos* - apareciam em baixa frequência. Possuíam uma mistura de conídios verdes e amarelos (ROPER & NGA, 1969).

NGA & ROPER (1968) mostraram que o desequilíbrio nos segmentos cromossômicos era o responsável pela instabilidade, e que as deleções cromossômicas produzidas eram confinadas unicamente aos segmentos que provocavam a instabilidade. Foi observado que a perda do segmento cro-

mossômico podia ocorrer por permuta ou por permuta em alça intracromossômica. Foi proposto o termo "não-conformidade" mitótica para este fenômeno de instabilidade.

ROPER & NGA (1969) mostraram que deleções em linhagens duplicadas podiam estender-se além do segmento duplicado, e produzir hipohaplóides e hipodiplóides respectivamente, de haplóides e parentes diplóides não balanceados.

CLUTTERBUCK (1970) estudou o alelo brl A₁₂ do locus "bristle" de *A. nidulans*. Estes locus produzia um fenótipo variegado e a análise genética mostrou que o mesmo estava associado com uma translocação.

AZEVEDO & ROPER (1970) e AZEVEDO (1971) estudaram os setores deteriorados de linhagens de *A. nidulans* com duplicações. A observação das frequências dos mesmos, revelou que surgiam em média um em cada dez colônias com duplicações. A análise de 31 setores deteriorados, obtidos da linhagem "A" pelo ciclo sexual e parassexual, revelou que podiam ser distinguidos quatro grupos:

a) os determinantes de deterioração estavam associados com deleções no grupo de ligação I.

b) determinantes de deterioração localizados

no segmento translocado.

c) determinantes de deterioração localizados em outros cromossomos, que não os envolvidos na duplicação.

d) setores tão instáveis que não podiam ser analisados.

ROSATO (1973) observou os efeitos da acriflavina e do etil metano sulfonado (EMS) na instabilidade de linhagens deterioradas obtidas a partir da linhagem "A". O EMS foi mais eficiente que a acriflavina na produção de variantes morfológicos. Quatro dos variantes morfológicos obtidos por indução com EMS a partir de linhagens deterioradas, mostraram supressão dos determinantes de deterioração originais e o aparecimento simultâneo de novos determinantes em diferentes locais, atuando como mutações simples (ROSATO & AZEVEDO, 1978).

MENEZES (1974) obteve variantes deteriorados espontâneos e também induzidos por ultra-violeta e DNA exógeno a partir da linhagem "A".

Dois variantes foram selecionados de uma linhagem com duplicação por AZEVEDO (1975). Um era mais estável e o outro menos estável que a linhagem original. A aná-

lise genética mostrou que o aumento da instabilidade em uma das linhagens, foi devido a translocação envolvendo os cromossomos V e VIII. A estabilidade superior do variante mais estável, foi devido a um fator recessivo (stf-1) localizado no grupo de ligação VIII.

LIEBER (1976a) descreveu uma possível interação existente entre duplicações cromossômicas presentes juntas em uma linhagem haplóide de *A. nidulans*. Quando uma duplicação no cromossomo I estava junta com uma duplicação no cromossomo III, no mesmo organismo haplóide, a ocorrência de deleções na duplicação do cromossomo III, levava a deleções em secções particulares da duplicação do cromossomo I.

A temperatura afeta a instabilidade em *A. nidulans*. LIEBER (1976b) estudou o efeito da temperatura em linhagens com duplicações. Foi visto que a frequência total de deleções em uma linhagem duplicada é dependente da temperatura de crescimento. FAVRAUD (1984) demonstrou que a elevação da temperatura, dentro dos limites de 30° a 40°C, aumentava a instabilidade da linhagem "A" e de linhagens dela derivadas com diferentes "backgrounds" genéticos.

ZUCCHI & AZEVEDO (1979) analisaram linhagens de *A. nidulans* com um segmento do cromossomo III duplicado e translocado para o cromossomo VIII. Setores deterio

rados e derivados deles quando analisados geneticamente, mostraram que a deterioração podia estar associada a deleção do segmento em duplicata. Embora em dois casos os determinantes de deterioração tenham sido localizados em grupos de ligação que não estavam envolvidos na duplicação original.

Uma linhagem de *A. nidulans* que produzia uma alta frequência de dissômicos, foi estudada por GABRIELI & AZEVEDO (1980). A porcentagem de dissômicos produzidos por esta linhagem foi 20 - 35 vezes maior que o controle. Foi concluída a existência de um gene mendeliano no cromossomo III, designado v8, e este era responsável pela alta frequência de não-disjunção durante a mitose, no cromossomo III. Variações na temperatura e pH não alteraram a frequência de dissômicos, mas esta foi aumentada pela idade dos conídios.

CASE & ROPER (1981) mostraram que a eliminação dos segmentos translocados em diplóides balanceados de *A. nidulans*, ocorria mais frequentemente por permuta do que por deleção. Os resultados mostraram a diversidade de mecanismos existentes para correção do não balanço genômico, e que pelo menos no caso da linhagem Dp (I-II), o grau e a modalidade da instabilidade mitótica são funções do balanço dos segmentos cromossômicos e da ploidia.

Novas linhagens alteradas de *A. nidulans* con

tinuaram sendo obtidas e analisadas. ROSATO & AZEVEDO (1983) analisaram doze mutantes de *A. nidulans* obtidos pelo tratamento com luz ultra-violeta e nitrosoguanidina. SEXTON & ROPER (1984) analisaram geneticamente onze linhagens com duplicações cromossômicas em *A. nidulans*. ROSATO & AZEVEDO (1987) analisaram um novo mutante morfológico de *A. nidulans*, obtido a partir de uma linhagem normal.

Vários agentes físicos e químicos alteram a instabilidade genética de linhagens de *A. nidulans*: *p*-fluoro-fenil alanina (LHOAS, 1961); benlate (HASTIE, 1970); azul de tripan (COOKE *et alii*, 1970); ultra-violeta (MENEZES, 1974; AZEVEDO, 1975; PARAG & ROPER, 1975); brometo de etídio (BONATELLI & AZEVEDO, 1977); 1,4 oxathiin (AZEVEDO *et alii*, 1977); Mn^{2+} (BURR *et alii*, 1982); álcool etílico (KAHER, 1984), etc.

PIZZIRANI-KLEINER & AZEVEDO (1986 e 1986b) observaram a presença de um gene, bncA, que leva a produção de conídios binucleados e trinucleados em *A. nidulans*. Este gene altera também a instabilidade de dissômicos, diplóides e linhagens com duplicações cromossômicas. Em linhagens com segmentos duplicados e em diplóides, o gene bncA reduz a instabilidade, atuando como um estabilizador parcial.

2.2. PROTOPLASTOS

Segundo DAVIS (1985) o termo protoplasto é utilizado, normalmente, para descrever uma célula completamente desprovida de parede. O isolamento de protoplastos de fungos tem proporcionado um novo caminho para o estudo das propriedades morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, destes organismos (ISAAC, 1985). Além disso, essa técnica se constitui uma importante ferramenta para estudos genéticos, permitindo cruzamentos interespecíficos e intergenéricos, e é parte integrante dos experimentos de transformação em fungos.

Foi a partir da década de 50 que trabalhos com protoplastos de fungos começaram a ser publicados. Como um dos pioneiros pode ser citado o trabalho de EDDY & WILLIAMS (1957) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis*.

Com relação aos fungos filamentosos, os primeiros relatos encontrados na literatura, foram os trabalhos de EMERSON & EMERSON (1958) e BACHMANN & BONER (1959), ambos com *Neurospora crassa*. Deste período até o atual, muitos fungos têm sido submetidos às técnicas de protoplastização. A Tabela 1 mostra alguns exemplos.

Tabela 1 - Exemplos de fungos submetidos às técnicas de protoplastização ou esferoplastização.

Organismos	Referência
<i>Aspergillus flavus</i>	MOORE & PEBERDY (1976)
<i>Aspergillus nidulans</i>	PEBERDY & GIBSON (1971)
<i>Aspergillus niger</i>	DAVIS <i>et alii</i> (1977)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	FINKELMAN <i>et alii</i> (1980)
<i>Cephalosporium acrimonium</i>	FAWCETT <i>et alii</i> (1973)
<i>Claviceps purpuria</i>	KOMEL <i>et alii</i> (1985)
<i>Fusarium culmorum</i>	GARCIA-ACHA <i>et alii</i> (1985)
<i>Fusarium oxysporum</i>	LYNCH <i>et alii</i> (1985)
<i>Fusarium tricinctum</i>	LYNCH <i>et alii</i> (1985)
<i>Geotricum candidum</i>	DOOIJEWARD-KLOOSTERZIEL (1973)
<i>Humicola</i> sp.	NEIROTTI <i>et alii</i> (1987)
<i>Kloecketa</i> sp 2201	DZIENGEL <i>et alii</i> (1977)
<i>Laccaria bicolor</i>	KROPP & FORTIN (1985)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	SILVEIRA & AZEVEDO (1987)
<i>Mucor rouxii</i>	PEREZ-CABO <i>et alii</i> (1986)
<i>Neurospora crassa</i>	EMERSON & EMERSON (1958)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	ANNE <i>et alii</i> (1974)
<i>Phycomycis blaskisliianus</i>	BINDING & WEBER (1974)
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	WAKABAYASHY <i>et alii</i> (1984)
<i>Pyricularia oryzae</i> P ₂	TANAKA <i>et alii</i> (1981)
<i>Pythium</i> PRL 2142	SIETSMA & BOER (1973)
<i>Rhizopus negricans</i>	GABRIEL (1968)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EDDY & WILLIANSON (1957)
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	EDDY & WILLIANSON (1957)
<i>Schizophyllum commune</i>	VERMENLEN <i>et alii</i> (1979)
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> var. <i>versatilis</i>	GABRIEL (1984)
<i>Trichoderma reesei</i>	PICATAGGIO <i>et alii</i> (1983)
<i>Valvorella valvacia</i>	MUKHERJEE & SENGUPTA (1986)

2.2.1. FATORES QUE AFETAM A LIBERAÇÃO DE PROTOPLASTOS

a) Organização da hifa

Para o isolamento de protoplastos em fungos filamentosos, é geralmente utilizado o micélio. No entanto, os protoplastos liberados deste são heterogêneos, havendo uma ampla variação quanto ao número de núcleos, tamanho, função bioquímica e presença de organelas. Essa heterogeneidade decorre de um zoneamento existente na hifa, em termos morfológicos e fisiológicos, ocorrendo um zoneamento distinto como resposta a um crescimento apical (BARTNICKI-GARCIA, 1973). Através da observação da ultraestrutura de protoplastos de *A. nidulans*, GIBSON & PEBERDY (1972) demonstraram que os protoplastos liberados durante a primeira hora de digestão lítica se originaram da região apical, apresentando pequenas vesículas e uma alta densidade de ribossomos, enquanto os liberados posteriormente continham grandes vacúolos e poucos ribossomos, tendo se originado de regiões mais distais do ápice da hifa.

Um dos meios para se solucionar o problema da heterogeneidade, seria o isolamento de protoplastos de conídios. No entanto, estes são de difícil obtenção, devido a

parede ser mais resistente a lise. Contudo, alguns trabalhos podem ser encontrados na literatura, onde foi conseguido protoplastos de conídios de *Neurospora crassa* (BACHMAN & BONNER, 1959), *Fusarium culmorum* (GARCIA-ACHA *et alii*, 1964), *Aspergillus flavus* (MOORE & PEBERDY, 1976), *Aspergillus nidulans* (BOS & SLAKORST, 1980), *Aspergillus niger* (BOS & SLAKORST, 1980), *Trichoderma reesei* (TOYAMA *et alii*, 1983). Um dos principais obstáculos à utilização de conídios para a obtenção de protoplastos de fungos filamentosos, é também o longo período necessário para a obtenção dos mesmos, pois em muitos casos é exigido um pré-tratamento.

b) Sistemas de enzimas líticas

A origem do sistema de enzimas líticas tem grande importância na liberação de protoplastos, e vários sistemas enzimáticos têm sido utilizados.

EDDY & WILLIAMSON (1957) reportaram o sucesso da aplicação do suco digestivo do caracol, *Helix pomatia*, em *S. cerevisiae* e *S. carlsbergensis*. Estas enzimas são agora avaliadas como helicase, glusulase, β -glucoronidase e fosfatase (DAVIS, 1985).

Um importante fator na liberação de protoplastos quando se utiliza as enzimas do caracol, *Helix*

pomatia, é o tempo de exposição do fungo a essas enzimas. GABRIEL (1968) observou que quando protoplastos de *Rhizopus negricans* eram colocados para regenerar na presença de enzimas líticas de *Helix pomatia*, havia um bloqueio parcial da síntese da parede e os protoplastos passavam a crescer incessantemente.

Em muitos casos foram utilizadas enzimas comerciais para obtenção de protoplastos, ou os sistemas enzimáticos foram preparados nos próprios laboratórios. No entanto, este último consome muito tempo. HAMLYN *et alii* (1981) compararam algumas polissacares comerciais, quanto a sua habilidade para liberar protoplastos em oito espécies de fungos. Como esperado, as enzimas variaram na sua capacidade para produzir protoplastos em diferentes fungos. Isso se deve a ampla variação existente na constituição da parede desses organismos. A combinação das enzimas novazim SP 234 e celulase CP deu melhor resultado em *A. nidulans*, sendo que o número de protoplastos obtidos com este organismo foi maior que o conseguido com *A. niger* e *A. ochraceus*.

Segundo DAVIS (1985), vários sistemas enzimáticos induzidos têm sido utilizados para a preparação de protoplastos de fungos filamentosos. Entre os actinomicetos se destacam os do gênero *Streptomyces* (PEBERDY, 1971; GIBSON & PEBERDY, 1972; ANNÉ *et alii*, 1974; ANDRES & PEBERDY,

1974) e *Michromonospora* (BENITEZ *et alii*, 1975). Estas enzimas são frequentemente referidas como strepzimas. Vários fungos também são utilizados na preparação de sistemas enzimáticos induzidos, entre esses estão *Trichoderma viride* (DAVIS *et alii*, 1977) e *Penicillium italicum* (BENITEZ *et alii*, 1975).

A autólise é um processo descrito como eficiente para obtenção de protoplastos (ISAAC & GOKHALE, 1985; LYNCH *et alii*, 1985). No entanto, tem sido pouco utilizado.

Em alguns casos, boa produção de protoplastos tem sido obtida sem a necessidade do tratamento com enzimas líticas.

BERLINE (1971) obteve uma alta produção de protoplastos de células vegetativas haplóides e diplóides de *Schizosaccharomyces octosporus* pela incubação das células em meio "Sabouraud" com alta concentração de $MgSO_4$ e 2,5 mg de 2-deoxy-D-Glucose por 100 ml de meio. Protoplastos também foram obtidos de uma linhagem temperatura-sensível "Osmotic 1" de *N. crassa* pela incubação de macroconídios em uma temperatura não permissiva em meio líquido contendo sorbose e polyoxina "B" (SELITRENNIKOFF *et alii*, 1981).

c) *Estabilizadores osmóticos*

Uma ampla variedade de estabilizadores osmóticos têm sido utilizados para estabilizar protoplastos de fungos. O tipo e a concentração dos mesmos pode influenciar a estabilização e produção dos protoplastos, e não existe um estabilizador universal. Mas, entre os estabilizadores mais utilizados estão o KCl, $MgSO_4$ e o manitol (DAVIS, 1985).

Em alguns casos foi observada a influência dos estabilizadores na morfologia dos protoplastos e nos padrões de liberação destes da hifa. DE VRIES & WELLS (1972) trabalhando com *Schizophyllum commune* Frees, observaram que estabilizadores inorgânicos estimulavam uma melhor produção de protoplastos, e que o uso do $MgSO_4$ deu origem a duas classes de protoplastos: uma classe de protoplastos amplamente vacuolados e uma classe de protoplastos pequenos e densos. Os dois tipos mostraram diferentes propriedades de sedimentação durante a centrifugação. ISAAC *et alii* (1978) observaram que os protoplastos liberados de *A. nidulans* na presença de KCl, nas primeiras horas de digestão lítica, eram pequenos e não vacuolados. O tamanho dos mesmos aumentou durante o período de digestão lítica, sendo que entre os liberados posteriormente alguns eram vacuolados. Entretanto, quando o $MgSO_4$ foi utilizado como estabilizador, os proto-

plastos foram maiores, e com o aumento do período de digestão lítica houve um grande aumento no tamanho dos mesmos, sendo observados protoplastos altamente vacuolados. Os resultados demonstraram que os protoplastos liberados em presença de KCl permitiram um fracionamento sequencial da hifa. Em presença de $MgSO_4$ a hifa foi rompida em frações menos ordenadas.

GOKHALE & ISAAC (1984) mediram a atividade respiratória de protoplastos isolados de *A. nidulans*. Seus resultados foram consistentes com a visão que a digestão lítica representa um fracionamento sequencial do micêlio do fungo, sendo que em presença de $MgSO_4$ a atividade respiratória foi menor e mais variável que quando o KCl foi utilizado como estabilizador.

Entre os estabilizadores osmóticos que vem sendo utilizados, além de KCl, $MgSO_4$ e manitol, estão $(NH_4)_2SO_4$, $MgCl_2$, NaCl, NH_4Cl , sorbitol e sucrose (SIETSMA & BOER, 1973; BINDING & WEBER, 1974; ANNÉ *et alii*, 1974; BENITEZ *et alii*, 1975a; DAVIS *et alii*, 1977; TANAKA *et alii*, 1981).

d) Outros fatores

A idade da cultura é um fator que tem demonstr

trado ser importante na liberação de protoplastos. PEBERDY *et alii* (1976) estudaram o efeito da idade da cultura na liberação de protoplastos de cinco fungos (*Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus nidulans* Eidan/Winter, *Penicillium chrysogenum* Thom, *Fusarium culmorum* (W.g. Smith) Sacc. e *Neurospora crassa* Shear & Dodge), usando uma preparação de enzimas líticas de *Streptomyces*. Foi observado que a máxima produção de protoplastos foi obtida de culturas no final da fase exponencial de crescimento. O significado da idade do micélio para indução de protoplastos é desconhecida, mas está provavelmente associado com alterações na parede da hifa. Outros trabalhos também documentaram a influência da idade da cultura (TANAKA *et alii*, 1981; PICATAGGIO *et alii*, 1983; KROPP & FORTIN, 1985; LYNCH *et alii*, 1985).

Vários trabalhos tem reportado a influência do pré-tratamento na produção de protoplastos. Em geral, o pré-tratamento envolve a incubação da célula em um composto tiól apropriado ou um detergente, por 8 a 70 minutos, dependendo do organismo e da linhagem (DAVIS, 1985). A formação de protoplastos de *Geotrichum candidum* foi consideravelmente estimulada pela adição de compostos tióis. O tratamento do micélio com estes compostos, antes da incubação com enzimas líticas, aumentou a formação de protoplastos (D001-JEWAARD-KLOOSTERZIEL, 1973). O pré-tratamento do micélio

de *Cephalosporium acremonium* foi necessário para obtenção de protoplastos desse organismo (FAWCETT *et alii*, 1973). O pré-tratamento do micélio de *Pythium* PRL 2142 com um detergente, estimulou a obtenção de protoplastos. O detergente mais eficiente foi o triton-X-100 (SIETSMA & BOER, 1973).

Em geral os efeitos da temperatura e do pH estão intimamente relacionados com a atividade do sistema de enzimas líticas e estabilizadores osmóticos (DAVIS, 1985).

Segundo PEBERDY *et alii* (1976) o pH "ótimo" para liberação de protoplastos de cinco espécies de fungos estudados ficou entre 6,0 - 6,5. Protoplastos obtidos de *Penicillium chrysogenum* foram conseguidos entre os pHs 4 e 8, com 5,5 sendo o "ótimo" (EYSSEN, 1977).

DAVIS *et alii* (1977) observaram que em células gigantes de *Aspergillus niger*, a produção de protoplastos aumentava com o aumento da temperatura para 40°C e do pH para 7,0. A ectomicorriza *Laccaria bicolor* teve sua melhor digestão a temperatura de 30°C, que produziu 16.10^6 protoplastos/cm³ de micélio após 4 horas de exposição. Menos de 30% deste número foi liberado a 20° ou 28°C, enquanto que a 35°C a produção foi ainda mais baixa (KROPP & FORTIN, 1985).

2.2.2. REGENERAÇÃO E REVERSÃO DE PROTOPLASTOS

Os protoplastos de fungos são capazes de reverter, dando origem ao micélio, quando transferidos para um meio nutritivo, líquido ou sólido, com um estabilizador apropriado. No entanto, a frequência de reversão varia amplamente de organismo para organismo, e vários padrões de regeneração têm sido descritos.

EMERSON & EMERSON (1958) mencionaram a regeneração de protoplastos de *N. crassa*. BACHMANN & BONNER (1959) demonstraram nesse mesmo organismo, que o curso de regeneração de protoplastos variava tremendamente. Alguns protoplastos produziam figuras torcidas, que podiam ou não dar origem a hifas normais. Enquanto outros, cresciam diretamente em hifas. A frequência de reversão ficou entre 20 - 80% dos protoplastos.

GABRIEL (1968) observou a regeneração de protoplastos de *Rhizopus nigricans*. Os protoplastos grandes, formaram em um curto espaço de tempo (2 - 3 horas) uma densa parede, e dessa formação, a nova hifa se desenvolveu em 4-5 horas. O tempo de regeneração de protoplastos pequenos e médios, foi uma ou duas vezes maior que o de protoplastos grandes.

A regeneração de protoplastos de *Fusarium*

culmorum tem lugar de três modos diferentes: a) pela direta formação do tubo germinativo pelo protoplasto; b) por meio da formação de uma cadeia de formas leveduriformes, e posterior formação do tubo germinativo; c) pelo surgimento de formas globulares em um complicado processo, dando origem a formação de um tubo germinativo no final (GARCIA-ACHA *et alii*, 1985).

PEBERDY & GIBSON (1971) observaram liberação de protoplastos de *A. nidulans* durante digestão lítica, e a regeneração dos mesmos. A primeira alteração do micélio em incubação com as enzimas líticas, foi o aumento da ponta da hifa, e este foi seguido pela liberação de protoplastos pequenos e não vacuolados, em torno de 45 a 60 minutos de digestão lítica. A continuação da incubação resultou no aparecimento de protoplastos grandes e vacuolados. A regeneração foi examinada por um período de 26 horas. Durante este tempo, cerca de 50% dos protoplastos tinham alcançado algum estágio de regeneração. Dois padrões de regeneração foram observados. No primeiro, o protoplasto produziu uma cadeia de células leveduriformes, e eventualmente a célula terminal produziu a hifa. No segundo, "*shells*" foram formados, dentro dos quais o citoplasma migrou. É sugerido que o mecanismo de regeneração reflete o sítio de origem do protoplasto na hifa parental.

O modo de regeneração de protoplastos foi descrito em vários outros fungos, como: *Pythium* PRL 2142 (SIETSMA & BOER, 1972); *Geotrichum candidum* (DOOIJEWAAARD-KLOOSTERZIEL *et alii*, 1973); *Phycomyces blakesleanus* (BINDING & WEBER, 1974); *Penicillium chrysogenum* (ANNÉ *et alii*, 1974); *Trichoderma viride* (BENITEZ *et alii*, 1975); *Aspergillus flavus* (MOORE & PEBERDY, 1976).

Segundo PEBERDY (1979) estudos comparativos entre protoplastos e suspensões de células são poucos, e em certos casos conflitantes. Em geral uma frequência de regeneração de 100% nunca é conseguida. Ela varia de organismo para organismo, sendo que em *A. nidulans* fica na faixa de 20 - 30% (ISAAC, 1978). A frequência de regeneração de protoplastos é em alguns casos tão variável e baixa devido a ausência de núcleos e a origem dos protoplastos em relação a hifa (PEBERDY & GIBSON, 1971).

A regeneração de protoplastos de *Pyricularia oryzae* P₂ foi observada por TANAKA *et alii* (1981). O modo de regeneração da hifa foi semelhante aos citados anteriormente, apresentando três padrões básicos de regeneração. Outro fator observado foi o número de núcleos por protoplastos. De 516 protoplastos analisados, 467 (90,5%) tinham um núcleo, 4 (0,8%) tinham dois núcleos e 45 (8,7%) não tinham núcleos.

A cariocinese e a formação de septos durante a regeneração incompleta da parede celular de *Schizosaccharomyces japonicus* var. *versatilis* foi estudada por GABRIEL (1984). Ele observou que no curso de regeneração dos protoplastos, todos os estágios do ciclo celular foram realizados. Foi sugerido que o sinal inicial para a formação do septo foi dado pela divisão do núcleo; a parede embora incompleta foi um pré-requisito essencial para a septação começar.

KNOPP & FORTIN (1985) mostraram que protoplastos de *Laccaria bicolor* eram capazes de regenerar, dando origem a culturas monocarióticas e dicarióticas. Foi observado que 62,9% dos protoplastos não tinham núcleos, 29,9% tinham um núcleo e 7,2% tinham dois.

LYNCH *et alii* (1985) investigaram a regeneração de protoplastos de *Fusarium tricinctum* e *Fusarium oxysporum*, onde foi demonstrado que os protoplastos eram capazes de regenerar uma nova parede e formar colônias, embora a porcentagem fosse baixa. Em torno de 60% dos protoplastos liberados não tinham núcleos, poucos tinham dois ou mais núcleos. Talvez isso seja uma explicação para a baixa frequência de reversão.

Sempre que se fala em reversão de protoplastos, é assumido que todas as características genéticas, bioquímicas e morfológicas dos revertentes são iguais as das

células que lhes deram origem (VILLANUEVA & GARCIA-ACHA, 1972; PEBERDY, 1978). Contudo, poucas evidências têm sido apresentadas que confirmem essa afirmação (NECAS & SVOBODA, 1985).

Necas (1956), citado por NECAS & SVOBODA, (1985), estudou as características dos revertentes de *Saccharomyces cerevisiae*, e fez uma análise cariológica dos mesmos. De 50 revertentes isolados, cinco linhagens produziram populações com células multinucleadas, onde cada isolado originou-se de um protoplasto regenerado. O número de núcleos de cada célula variou de 1 a 10, sendo predominante células binucleadas. As células foram polimórficas, com cres cimento atípico e sinais de crescimento pseudomicelial. As colônias destas células eram rugosas e de crescimento lento. Linhagens multinucleadas persistiram em cultura, mesmo após 20 cultivos sucessivos, mantendo uma proporção constante de células com diferentes números de núcleos. A partir dessas culturas segregaram células uninucleadas com colônias lisas. Embora a análise genética não tenha sido feita, considera-se que as mesmas sejam mutantes citocinéticos com coordenação defeituosa entre cariocinese e citocinese. Segundo NECAS & SVOBODA (1985) estes achados sugerem que a regeneração de protoplastos pode dar origem a células geneticamente alteradas e investigações posteriores devem ser feitas.

*NECAS, O. Vicejaderně Kvasinky. *Cesk. Biol.*, 5:71-78, 1956.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LINHAGENS

As linhagens de *A. nidulans* utilizadas neste trabalho foram:

- a) Linhagem "A", que possui a porção terminal do cromossomo I duplicada, e o segmento resultante da duplicação translocado para o cromossomo II (NGA & ROPER, 1968). (Figura 1).
- b) Linhagem "MSE" (Master Strain E), obtido por MacCULLY & FORBES (1965), que possui marcadores genéticos nos oito grupos de ligação. (Figura 2).
- c) Linhagem biA₁; meth G₁. (Figura 3).

Estas linhagens foram obtidas dos estoques da Universidade de Glasgow-Escócia.

o = centrômero.

proA₁ = requer prolina.

pabaA₆ = requer paba.

adE₂₀ = requer adenina.

biA₁ = requer biotina.

yA₂ = conídeos amarelos.

Figura 1 - Marcadores genéticos da linhagem "A" de *Aspergillus nidulans*.

Grupo de ligação	Marcadores Genéticos	
I	_____ ○ _____	biA ₁ r ₁
IV	_____ meth G ₁ _____ 	○ _____

○ = Centrômero.

biA₁ = requer biotina.

meth G₁ = requer metionina.

Figura 2 - Marcadores genéticos da linhagem biA₁; meth G₁ de *Aspergillus nidulans*.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos		
I	<u>suA</u> ₁ <u>adE</u> ₂₀	0	<u>yA</u> ₂ <u>adE</u> ₂₀
II	<u>wA</u> ₃	0	
III	<u>gal</u> A ₁	0	
IV		0	<u>pyro</u> A ₄
V		0	<u>fac</u> A ₃₀₃
VI	o		<u>sB</u> ₃
VII	o		<u>nic</u> B ₈
VIII	o		<u>ribo</u> B ₂

0 = centrômero.

suA₁ adE₂₀ = supressor do mutante adE₂₀.

yA₂ = conídios amarelos.

adE₂₀ = requer adenina.

wA₃ = conídios brancos.

gal A₁ = incapacidade para utilizar galactose.

pyro A₄ = requer piridoxina.

fac A₃₀₃ = incapacidade para utilizar acetato.

sB₃ = requer tiosulfato.

nic B₈ = requer ácido nicotínico.

ribo B₂ = requer riboflavina.

Figura 3 - Marcadores genéticos da linhagem "MSE" de *Aspergillus nidulans*.

3.1.1. SÍMBOLOS E FENÓTIPOS DOS MUTANTES UTILIZADOS NESTE TRABALHO

Símbolo	Fenótipo
Mutantes nutricionais:	Requerem:
- <u>AdE</u> ₂₀	- adenina
- <u>biA</u> ₁	- biotina
- <u>meth</u> G ₁	- metionina
- <u>nic</u> B ₈	- ácido nicotínico
- <u>paba</u> A ₆	- ácido p-aminobenzóico
- <u>pro</u> A ₁	- prolina
- <u>pyro</u> A ₄	- piridoxina
- <u>ribo</u> B ₂	- riboflavina
- <u>sB</u> ₃	- tiosulfato
 Mutantes morfológicos	
- <u>w</u> A ₃	- conídios brancos (epistático para <u>yA</u> ₂).
- <u>y</u> A ₂	- conídios amarelos.
 Outros	
- <u>fac</u> A ₃₀₃	- incapacidade para utilizar acetato.
- <u>gal</u> A ₁	- incapacidade para utilizar galactose.
- <u>suA</u> ₁ <u>adE</u> ₂₀	- supressor do <u>adE</u> ₂₀

Os marcadores genéticos de *A. nidulans* utilizados neste trabalho estão descritos em CLUTTERBUCK (1974).

3.2. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

3.2.1. MEIO MÍNIMO (PONTECORVO *et alii*, 1953)

NaNO ₃	6 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,02 g
ZnSO ₄	0,02 g
Glicose.	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000,0 ml

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

3.2.2. MEIO COMPLETO (AZEVEDO & COSTA, 1973)

Meio mínimo adicionado de:

Peptona.	2,0 g
Extrato de levedura.	0,5 g
Caseína hidrolisada.	1,5 g
Solução de vitaminas	1,0 ml
Solução de ácidos nucleicos.	1,0 ml

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

3.2.3. MEIO COMPLETO LÍQUIDO

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

3.2.4. MEIO MÍNIMO LÍQUIDO MAIS 2%

Foi adicionado ao meio mínimo líquido (ítem 3.2.1. sem o ágar) 2% de meio completo líquido (ítem 3.2.3.). Em seguida foram distribuídos 2,5 ml em cada tubo de ensaio e feita a autoclavagem.

3.2.5. MEIO COMPLETO 2X CONCENTRADO

Preparado de acordo com o ítem 3.2.2., sendo colocado apenas metade do volume de água destilada descrito.

3.2.6. SOLUÇÃO DE VITAMINAS

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

A solução foi aquecida em banho-maria por 15 minutos, e guardada em frasco escuro, no refrigerador.

3.2.7. MEIO DE ACETATO DE AMÔNIO (APIRION, 1962)

Acetato de amônio.	12,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
NaCl.	2,0 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O.	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Ágar.	12,0 g
Água destilada.	1000,0 ml

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

3.2.8. MEIO MÍNIMO-GALACTOSE (ROBERTS, 1959)

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

3.2.9. SOLUÇÃO DE "TWEEN" 80

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

Foram distribuídos 2,5 ml por tubo de ensaio seguindo-se autoclavagem dos mesmos.

3.2.10. SOLUÇÃO SALINA

NaCl. 8,50 g
Água destilada. 1000 ml

Foram colocados 9 ml por frasco e logo após foi feita a autoclavagem.

3.2.11. SOLUÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

- a) Ácido nucleico de leveduras: 2,0 g em 15,0 ml de HCl 1 N.
- b) Ácido nucleico de leveduras: 2,0 g em 15,0 ml de NaOH 1 N.

As soluções foram aquecidas a 98°C durante 20 minutos, misturadas, o pH ajustado para 6,0 com NaOH 1 N, e filtradas. O volume foi completado para 40 ml e foi feita a conservação no refrigerador.

3.2.12. SOLUÇÃO DE BENLATE [METIL(BUTIL-CARBAMOIL)-2 -BENZIMEDAZOLE CARBAMATO] SEGUNDO HASTIE (1970)

Benlate (50% benomyl).	20,00 mg
Água destilada.	10,00 ml

Água destilada foi previamente esterilizada. O benlate foi dissolvido em uma gota de acetona e depois foi adicionada a água. A solução foi mantida em banho-maria por 15 minutos e conservada no refrigerador.

3.2.13. SUPLEMENTOS ADICIONADOS AO MEIO MÍNIMO

Os estoques foram preparados pela adição de cada um deles em água destilada esterilizada. As soluções foram aquecidas em banho-maria e conservadas no refrigerador.

Solução estoque	(mg/100 ml de H ₂ O)	Concentração final do meio de cultura (µg/ml)
Adenina	500,00	25,00
Ácido nicotínico	10,00	0,50
Ácido p-aminobenzóico	5,00	0,25
Biotina	4,00	0,20
Metionina	1000,00	50,00
Piridoxina	5,00	0,25
Prolina	1000,00	50,00
Riboflavina	10,00	0,50
Tiossulfato de sódio	2000,00	100,00

3.2.14. TAMPÃO FOSFATO PH = 5,8 (0,2 M)

• Solução A

NaH₂PO₄ 24 g
 Água destilada. 1000 ml

• Solução B

Na₂PO₄ . 2 H₂O 35,6 g
 Água destilada. 1000 ml

Foram misturados 920 ml da solução "A" com 80 ml da solução "B".

3.2.15. TAMPÃO FOSFATO (0,02 M)

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

3.2.16. SOLUÇÃO DE GIEMSA

Foi feita uma diluição de uma parte de Giemsa em 66 partes de glicerina à 60°C. Após o resfriamento, foram acrescentadas 66 partes de metanol e a solução foi conservada em frasco escuro à temperatura ambiente.

3.2.17. SOLUÇÃO DE HCl 1 N

HCl concentrado.	82,50 ml
Água destilada até	1000 ml

A solução foi conservada em frasco escuro.

3.2.18. SOLUÇÃO SULFOCRÔMICA

Dicromato de potássio.	15,00 g
Ácido sulfúrico	1,00 ml
Água destilada	150,00 ml

O dicromato de potássio foi dissolvido em 150 ml de água, à esta solução foi adicionado cuidadosamente o ácido sulfúrico, e deixada esfriar à temperatura ambiente.

3.2.19. SOLUÇÃO KCl 1,2 M

Foram colocadas 89,4 g de KCl em cerca de 350 ml de solução "A" (ítem 3.2.14). A solução foi aquecida até que o KCl estivesse dissolvido. Em seguida, foi adicionada a solução "B" (ítem 3.2.14) até atingir o pH 5,8. O volume final foi acertado para 1000 ml com tampão fosfato 0,2 M, pH = 5,8. A solução foi autoclavada e conservada no refrigerador.

3.2.20. SOLUÇÃO DE KCl 0,6 M

A solução de KCl 1,2 M (ítem 3.2.19) foi diluída com tampão fosfato 0,2 M esterilizado (ítem 3.2.14) na proporção de 1 volume de KCl 1,2 M para 1 volume de tampão fosfato 0,2 M (pH = 5,8). A solução foi estocada em refrigerador.

3.2.21. SOLUÇÃO DE ENZIMAS

Foram adicionados 5,0mg de mistura lítica, sendo 2,5 mg "celulase CP" (JOHN & STURGES, SEL BY, YORHIRE, UK) e 2,5 mg de "novozym 234" (NOVO INDUSTRIA DENMARK) para cada 1,0 ml de KCl 0,6 M em tampão fosfato pH = 5,8.

3.3. PLACAS DE ANÁLISE GENÉTICA E DE REGENERAÇÃO DOS PROTOPLASTOS

Para análise das colônias, utilizou-se placas de Petri com meio completo, com meio mínimo, meio mínimo mais todos os requisitos nutricionais envolvidos nos cruzamentos, com meio mínimo de galactose mais todos os requisitos, meio mínimo de acetato mais todos os requisitos, meio mínimo suplementado com todos os requisitos, exceto aqueles sob análise.

Para regeneração dos protoplastos foram utilizadas placas de Petri com meio completo mais solução de KCl 0,6 M.

3.4. ESTERILIZAÇÃO E INCUBAÇÃO

Os meios de cultura e as soluções foram esterilizados em autoclaves por 15 minutos, à pressão de uma atmosfera. As vidrarias que foram utilizadas (filtros, frascos para os protoplastos, etc.) foram esterilizados em autoclave por 35 minutos, a uma atmosfera.

As placas de Petri após autoclavagem e lavagem foram esterilizadas em estufa de secagem, à 150°C, por 2 horas.

A temperatura de incubação foi de 37°C, exceto para o crescimento do micélio para a técnica de protoplastização, que foi de 28°C.

3.5. OBTENÇÃO E REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS

A obtenção de protoplastos foi feita segundo o método de HAMLYN *et alii*, 1981.

Foram inoculados conídios, em quatro pontos de placas de Petri com meio completo. A incubação foi feita por um período de 4 dias, a 37°C. Decorrido este período, foi feita uma suspensão de conídios em Tween 80 (aproximadamente 10^6 conídios/ml). Em seguida, 1 ml da suspensão foi colocado em frascos Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml de

meio completo líquido. Os frascos foram colocados no agita
dor (200 rpm) por 18 horas a 28°C. O micêlio foi coletado
por filtração em funil Büchner com papel de filtro esterili
zado e em vácuo, em uma capela de fluxo laminar. O micêlio
foi lavado duas vezes com KCl 1,2 M em tampão fosfato 0,2 M,
pH = 5,8, e pesado.

Para montagem do sistema lítico, para cada
50 mg de micêlio foi utilizado 1 ml de solução de KCl 0,6 M
em tampão fosfato 0,2 M (pH = 5,8, item 3.2.14) e 5 mg de
enzimas líticas, sendo 2,5 mg de novozym 234 e 2,5 mg de celu
lase CP. O sistema lítico foi colocado em frascos de vidro
e agitados (120 rpm) por períodos de 1 hora, 2 horas e 3 ho
ras. Após cada período, frascos foram retirados do agita
dor. O conteúdo dos frascos foi transferido para tubos de
centrífuga cônicos e centrifugados a 200 rpm por 30 segun
dos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e colocado
em outro tubo. Foi feita uma centrifugação de 15 minutos
a 3000 rpm e o sobrenadante foi desprezado e o precipitado
ressuspendido em KCl 0,6 M em tampão fosfato 0,2 M (pH = 5,8),
e centrifugou-se novamente (3000 rpm, 15 minutos). Este pro
cedimento foi repetido mais uma vez.

3.5.1. CONTAGEM DE PROTOPLASTOS

Os protoplastos obtidos no ítem 3.5. foram ressuspensos em KCl 0,6 M (tampão fosfato 0,2 M, pH = 5,8) e contados em câmara de Neubauer, com auxílio de um microscópio óptico.

3.5.2. REGENERAÇÃO DOS PROTOPLASTOS

Os protoplastos foram semeados por "pour plate" em meio completo, para observar a presença de hifas, conídios e esferoplastos, e em meio completo mais KCl 0,6 M (tampão fosfato 0,2 M, pH = 5,8). Foram feitas várias diluições.

3.6. TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE NÚCLEOS DE PROTOPLASTO (BORGES, 1987)

Para a coloração utilizou-se o precipitado obtido após a centrifugação de 30 segundos do sistema lítico.

Algumas gotas da suspensão de protoplastos foram espalhadas em lâminas limpas. Para limpeza, as lâminas utilizadas foram deixadas por uma noite em solução sul-

focrômica, e em seguida, lavadas com sabão e passadas várias vezes em água destilada.

Após o gotejamento do material, as lâminas foram deixadas a temperatura ambiente por um período de 15 minutos. Logo após foi feita a fixação em metanol absoluto por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram deixadas para escorrer por 1 minuto, e colocadas para hidrólise em solução de HCl 1 N à 56°C, por 2 minutos. As lâminas foram, então, lavadas em água corrente e água destilada. A coloração foi feita colocando-se tampão fosfato 0,02 M (pH = 5,8) sobre as lâminas e gotejando-se o corante Giemsa. Após 2 minutos o corante foi retirado em água corrente, e as lâminas foram deixadas a temperatura ambiente para secar e foi feita uma montagem com lamínula e parafina. As lâminas foram observadas em microscópio óptico, e foram contados 200 protoplastos por linhagem, por tempo de enzima lítica.

3.7. ISOLAMENTO DE SETORES DETERIORADOS ORIGINADOS DA LINHAGEM "A"

A linhagem "A" foi incubada no centro de placas de Petri com meio completo, e estas incubadas a 37°C, por um período de 7 - 10 dias. Foram inoculadas 100 placas com conídios de colônias resultantes da regeneração de pro-

toplastos com 3 horas de digestão lítica e 100 placas com conídios de colônias que não sofreram protoplastização.

Foram contados os setores deteriorados, melhorados e heterocarióticos obtidos. Os setores deteriorados foram isolados em placas com meio completo. A estocagem do material foi feita em placas de Petri e tubos de ensaio, no refrigerador.

3.8. TÉCNICAS DE ANÁLISE GENÉTICA

3.8.1. OBTENÇÃO DE HETEROCÁRIOS

Foram utilizados dois métodos para a obtenção de heterocários, o descrito por PONTECORVO *et alii* (1953), modificado, e o citado por AZEVEDO (1971).

No primeiro método foram colocados conídios de ambas as linhagens, MSE e o deteriorado, em quantidades aproximadamente iguais, em tubo de ensaio com 2,5 ml de meio mínimo líquido mais 2% de meio completo (item 3.2.4.). Após 4 dias de incubação à 37°C, formou-se uma película, e esta foi transferida para placas de Petri com meio mínimo, e cortada em quatro pedaços. A incubação foi feita a 37°C por 10 dias.

No segundo método, citado por AZEVEDO (1971),

não foi necessário esperar a formação da película de heterocário. Após a mistura das duas linhagens a serem cruzadas, em meio mínimo líquido mais 2% de meio completo, esta suspensão foi colocada em orifícios feitos em meio mínimo sólido colocado em placas de Petri. Após 7 dias de incubação foi observada a formação do heterocário. Este método é indicado para o cruzamento de linhagens muito instáveis.

3.8.2. ISOLAMENTO DE DIPLÓIDES

A técnica utilizada foi a de ROPER (1952). Foi feita uma suspensão dos conídios dos heterocários em tween 80 (item 3.2.9.), de cerca de 10^7 conídios/ml. Em seguida, foi feita a semeadura destas suspensões em placas de Petri com meio mínimo, sendo colocado 0,2 ml das suspensões por placa. Após 72 horas já era possível observar algumas colônias, que eram diplóides heterozigotos, pois os conídios haplóides não foram capazes de crescer em meio mínimo.

Os diplóides foram reconhecidos pela sua capacidade para crescer em meio mínimo, pela cor dos conídios e pelo tamanho dos conídios. Os conídios foram medidos com microscópio com ocular micrométrica.

Os diplóides foram isolados em meio mínimo e estocados em vidros com meio mínimo inclinado, no refrigerador.

3.8.3. ANÁLISE MITÓTICA

A análise mitótica foi feita através do ciclo parassexual, onde os diplóides heterozigotos (Ítem 3.6.2.) foram haploidizados com benlate (HASTIE, 1970), na concentração final de 0,5 µg/ml de produto ativo em meio completo.

Os conídios dos diplóides foram inoculados em placas de Petri com meio completo mais o benlate. Após 7 dias de crescimento os setores haplóides foram isolados e purificados em meio completo. Em seguida, foram inoculados em uma placa de meio completo com 26 pontos. Estas foram incubadas durante 3 dias e serviu como placas mestras, sendo replicadas para placas de análise pelo replicador multifio (AZEVEDO *et alii*, 1976). Após 24, 48 e 72 horas, foram feitas leituras das colônias crescidas ou não crescidas em cada placa.

3.8.4. ANÁLISE MEIÓTICA

A técnica utilizada foi a descrita por PONTECORVO *et alii* (1953).

Em placas de Petri, com meio mínimo, foram colocadas películas de heterocário (Ítem 3.6.1.), e as placas vedadas com fita celulósica. A incubação foi feita a

37°C, por um período de 7 - 10 dias.

A presença dos cleistotécios foi observada em microscópio estereoscópico e foram escolhidos os maiores cleistotécios de cada cruzamento. A limpeza dos mesmos foi feita em placas de Petri com meio mínimo, com a ajuda de uma agulha bacteriológica, rolando os cleistotécios para que estes ficassem livres das células Hülle, e dos confídios aderidos.

Os cleistotécios foram esmagados contra a parede de tubos de ensaio com tween 80, com a ajuda de pipetas, e foram feitas suspensões de ascósporos. Parte dessas suspensões foram semeadas em placas de Petri com meio completo e o restante guardado no refrigerador. Após 72 horas de incubação foram separadas as placas dos cleistotécios híbridos e as demais desprezadas.

As suspensões dos cleistotécios híbridos foram semeadas, cada uma, em 5 placas de Petri com meio completo. Após 72 horas de incubação, foram contadas as colônias verdes, amarelas, brancas e deterioradas. As colônias foram utilizadas na preparação de 4 placas mestras, por cruzamento, sendo 2 placas de colônias com fenótipo normal e 2 placas de colônias com fenótipo deteriorado. No caso de um cruzamento em que os cleistotécios possuíam pequeno número de ascósporos, foram preparadas apenas duas placas mestras,

.57.

e em um caso foram feitas 5 placas mestras. As placas foram incubadas por 72 horas à 37°C, e após este período replicadas para placas de análise pelo replicador multifio. A leitura foi feita após 24, 48 e 72 horas.

Pôde-se determinar a ligação de dois loci utilizando-se a fórmula:

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

C = frequência de recombinação;

R = número de colônias recombinantes;

T = número total de colônias analisadas.

O desvio padrão foi calculado pela fórmula:

$$S = \sqrt{\frac{P(1 - P)}{N}}$$

S = desvio padrão;

P = frequência de colônias recombinantes;

N = número total de colônias analisadas.

Foi utilizado o teste χ^2 , para observar, se o desvio da segregação de 1 : 1, entre os alelos, era devido ao acaso. Foi utilizado:

ns - não significativo;

* - significativo a 5%.

** - significativo a 1%.

3.8.5. DENOMINAÇÃO DOS VARIANTES DETERIORADOS

Os variantes deteriorados originados de colônias da linhagem "A" resultantes da regeneração de protoplastos foram denominados "DEP", e numerados de acordo com a ordem em que eram isolados (DEP1, DEP2, etc.). Os variantes deteriorados que vieram de colônias que não foram protoplastizadas foram chamadas "DETs", sendo o variante de primeira ordem denominado DET 4.1, de acordo com a sua origem. Essa denominação foi feita para diferenciar os deteriorados obtidos em cada caso. Posteriormente eles foram denominados V79, V80, V81, etc. Continuando a numeração iniciada por AZEVEDO (1971).

3.8.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados relativos a obtenção de protoplastos e regeneração foram submetidos a análise de variância (SNEDECOR & COCHRAN, 1980), sendo que os dados relacionados ao número de protoplastos foram transformados utilizando log (STEEL & TORRIE, 1980).

Para comparação de médias foi utilizado o teste de Tukey, a nível de 5% e 1% de probabilidade, segundo a fórmula:

$$\Delta = q \cdot \frac{s}{\sqrt{r}}$$

onde:

q = amplitude total studentizada;

s = estimativa do desvio padrão residual;

r = nº de repetições.

Nas tabelas foi utilizada a simbologia:

ns - não significativo;

* - significativo ao nível de 5%.

** - significativo ao nível de 1%.

4. RESULTADOS

4.1. OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS E REGENERAÇÃO

Foram obtidos protoplastos da linhagem "A" e linhagem biA₁; meth G₁ em três tempos de exposição as enzimas líticas (1 h, 2 h e 3 h), e observadas as frequências de regeneração (Tabela 5). A Tabela 2 mostra o número de protoplastos obtidos em 3 repetições e a análise da variância é mostrada na Tabela 3. A Figura 4 mostra a curva de obtenção de protoplastos das duas linhagens ("A" e biA₁; meth G₁).

Tabela 2 - Número de protoplastos obtidos das linhagens "A" (K_1) e $\underline{biA_1}$; $\underline{meth G_1}$ (L_2) em três tempos de exposição as enzimas líticas (T_1 , T_2 e T_3).

Linhagens (L) e tempos de exposição as enzimas líticas (T)	Repetições (nº de protoplastos x 10^6)		
	R_1	R_2	R_3
L_1T_1	8,30	13,40	35,00
L_1T_2	35,50	33,50	70,50
L_1T_3	46,50	40,50	71,50
L_2T_1	10,00	15,40	25,70
L_2T_2	48,00	57,08	112,00
L_2T_3	56,00	104,00	113,00

Tabela 3 - Análise da variância dos valores de protoplastos obtidos das duas linhagens ("A" e " $\underline{biA_1}$; $\underline{meth G_1}$ ") em três períodos de digestão com enzimas líticas.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Linhagens	1	0,10	0,10	2,5
Tempos	2	1,30	0,65	16,25**
L x T	2	0,03	0,015	0,375
Resíduo	12	0,52	0,04	
Total	17	1,9526	CV = 2,6%	

Tabela 4 - Teste de Tukey para observar as diferenças entre as médias das três repetições nos diferentes tempos (T_1 , T_2 , T_3) dentro de cada linhagem (L_1 e L_2).

$L_1T_1 = 7,2$ a	$L_2T_1 = 7,23$ a
$L_1T_2 = 7,64$ b	$L_2T_2 = 7,83$ b
$L_1T_3 = 7,71$ b	$L_2T_3 = 7,94$ b
5%	1% $\Delta = 0,58$
$\Delta = 0,36$	5% $\Delta = 0,36$

A Tabela 5 mostra as frequências de regeneração obtidas das duas linhagens (L_1 , L_2), nos três tempos de exposição as enzimas líticas sendo que foram feitas três repetições. A análise da variância é mostrada na Tabela 6. A Figura 5 mostra a curva de porcentagem de regeneração das linhagens. O teste de Tukey (Tabela 7) mostra que houve diferença entre os tempos dentro das duas linhagens.

Figura 4 - Curva de obtenção de protoplastos da linhagem "A" e linhagem biA₁; meth G₁ em diferentes períodos de incubação. (1 h, 2 h, 3 h).

Tabela 5 - Porcentagem de regeneração de protoplastos em duas linhagens ("A" e biA₁; meth G₁), de *A. nidulans* em três períodos de exposição às enzimas líticas (T₁, T₂ e T₃).

Linhagens (L) e tempos de exposição à enzimas líti- cas (T)	R e p e t i ç õ e s		
	R ₁	R ₂	R ₃
L ₁ T ₁	4%	10%	5%
L ₁ T ₂	15%	20%	21%
L ₁ T ₃	27%	22%	24%
L ₂ T ₁	5%	15%	8%
L ₂ T ₂	12%	22%	23%
L ₂ T ₃	20%	25%	27%

Tabela 6 - Análise da variância das porcentagens de regeneração.

Causa da variação	G.L.	SQ	QM	F
Linhagem	1	4,50	4,50	0,26ns
Tempo	2	832,44	416,22	24,17**
L x T	2	9,34	4,67	0,27ns
Resíduo	12	206,66	17,22	
Total	17	1052,94	CV = 24,5%	

Tabela 7 - Teste de Tukey para comparar as médias das porcentagens de regeneração das duas linhagens de *A. nidulans* ("A" e biA₁; meth G₁) em três tempos de exposição às enzimas líticas.

L ₁ T ₁ = 6,3 a	L ₁ T ₁ = 9,3 a
L ₁ T ₂ = 18,6 b	L ₂ T ₂ = 19,0 b
L ₁ T ₃ = 24,3 b	L ₂ T ₃ = 24,0 b
1% Δ = 12,1	5% Δ = 7,4
5% Δ = 7,4

Figura 5 - Curva de porcentagem de regeneração de protoplas_{as} tos da linhagem "A" e linhagem biA₁; meth G₁ em diferentes tempos de incubação (1 h, 2 h, 3 h).

4.2. ESTUDOS CITOLÓGICOS

A coloração de protoplastos foi feita pela técnica descrita por BORGES (1987). A Tabela 8 mostra o número de núcleos observados por protoplastos das duas linhagens ("A" e biA₁; methG₁), nos três períodos de incubação. Na Figura 6 os protoplastos podem ser observados.

Tabela 8 - Número de núcleos de protoplastos da linhagem "A" (L₁) e linhagem biA₁; methG₁(L₂) de *A. nidulans* durante os três tempos de incubação com enzimas líticas (T₁, T₂ e T₃).

Linhagem e tempo de incubação	Número de Núcleos					
	0	1	2	3	4	5
L ₁ T ₁	164 (0,27)*	216 (0,36)	131 (0,22)	45 (0,07)	32 (0,05)	12 (0,02)
L ₁ T ₂	81 (0,13)	224 (0,37)	202 (0,34)	57 (0,09)	21 (0,03)	15 (0,02)
L ₁ T ₃	88 (0,15)	177 (0,30)	205 (0,34)	82 (0,14)	31 (0,05)	17 (0,03)
L ₂ T ₁	177 (0,30)	237 (0,40)	126 (0,21)	41 (0,07)	12 (0,02)	70 (0,01)
L ₂ T ₂	85 (0,14)	247 (0,41)	187 (0,31)	56 (0,09)	17 (0,03)	8 (0,01)
L ₂ T ₃	66 (0,11)	198 (0,33)	218 (0,36)	70 (0,12)	30 (0,05)	18 (0,03)

*Frequência de protoplastos com até 5 núcleos nos diversos tempos.

6a

6b

Figura 6 - Protoplastos da linhagem "A" com 1 hora (6a) e 3 horas (6b), de exposição às enzimas líticas. Coloração em Giemsa HCl (Merck).

4.3. SETORES OBTIDOS A PARTIR DA LINHAGEM "A"

Foram inoculados conídios da linhagem "A" em 100 placas de Petri com meio completo. Ao mesmo tempo, foram inoculados conídios de 100 colônias resultantes da regeneração de protoplastos da linhagem "A". Um total de 200 placas foram analisadas quanto ao tipo e ao número de setores obtidos (Tabela 9).

Não foi possível o isolamento de todos os setores deteriorados, devido a alta instabilidade destes. As Tabelas 10 e Tabelas 11 descrevem as características morfológicas dos DETs e DEPs, e as Figuras 7 e 8 mostram tais setores isolados em placas de Petri com meio completo.

Figura 7 - Variantes deterioradas (DETS) crecidas a 37°C por 7 - 10 dias.

Figura 8 - Variantes deterioradas (DEPS) crecidas a 37°C por 7 - 10 días.

Tabela 9 - Número e tipos de setores obtidos de colônias de linhagem "A" de *A. nidulans* que não foram protoplastizadas (A) e de colônias que sofreram protoplastização (B).

S e t o r e s	C o l ô n i a s	
	A	B
Verdes	53 (0,19)	28 (0,09)
Amarelos	218 (0,76)	260 (0,84)
Deteriorados	8 (0,03)	17 (0,05)
Heterocarióticos	7 (0,02)	5 (0,02)
T o t a l	286	310

Alguns setores deteriorados perderam suas características iniciais, nos diversos repiques. Outros, foram perdidos durante a estocagem, produzindo setores melhorados mais vigorosos. Uma parte dos deteriorados obtidos de colônias resultantes da regeneração de protoplastos foram aneuplóides.

Tabela 10 - Características morfológicas dos variantes deteriorados derivados da linhagem "A".

Deteriorado	Características morfológicas
DET 1	- Micélio creme, conidiação escassa, rápido crescimento, conídios amarelos.
DET 2	- Micélio marrom escuro, conidiação média, conídios verdes.
DET 3	- Micélio vermelho, conidiação escassa, colônia enrugada.
DET 4	- Micélio creme, conidiação escassa, crescimento lento, colônia enrugada, conídios verdes.
DET 4.1	- Micélio creme, conidiação escassa, conídios amarelos, crescimento médio.
DET 5	- Micélio creme, conidiação escassa, bordos da colônia irregular, crescimento lento.

Tabela 11 - Descrição dos deteriorados derivados de colônias resultantes da regeneração de protoplastos.

Deteriorado	Características morfológicas
DEP 1	- Micélio roxo, conidiação escassa, colônia enrugada.
DEP 2	- Micélio marrom, conídios verdes, bordos da colônia irregular.
DEP 3	- Micélio marrom, conídios verdes, conidiação média.
DEP 4	- Micélio creme, conídios verdes, conidiação escassa.
DEP 5	- Micélio vermelho claro, conidiação escassa.

4.4. ANÁLISE MITÓTICA DOS SETORES DETERIORADOS

4.4.1. DIPLÓIDES

Os diplóides foram obtidos pelo cruzamento dos deteriorados (DETs e DEPs) com linhagem "MSE".

Foram obtidos diplóides verdes e amarelos, estes últimos resultaram provavelmente pela perda do segmento em duplicata. Os diplóides verdes foram usados para análise, exceto em alguns casos quando só foram obtidos diplóides amarelos.

4.4.2. HAPLOIDIZAÇÃO

A haploidização dos diplóides, resultantes do cruzamento dos variantes deteriorados (DETs e DEPs) com a linhagem "MSE", foi feita usando-se o fungicida benlate, que foi adicionado ao meio completo. Tanto os diplóides verdes, como os amarelos, deram origem a setores haplóides brancos. Os setores amarelos não foram utilizados porque a maioria era diplóide e crescia em meio mínimo. Os diplóides verdes foram, em geral, mais instáveis que os amarelos.

Tabela 12 - Diâmetro dos conídios dos diplóides, obtidos pelo cruzamento dos variantes deteriorados (DETs e DEPs) com a linhagem "MSE".^{a/}

Haplóides

- MSE = 3,30 μ
- A = 3,75 μ

Diplóides

- DET 1 // MSE = 4,30 μ
 - DET 2 // MSE = 4,50 μ
 - DET 3 // MSE = 4,55 μ
 - DET 4 // MSE = 4,50 μ
 - DET 4.1 // MSE = 4,45 μ
 - DET 5 // MSE = 4,44 μ

 - DEP 1 // MSE = 4,34 μ
 - DEP 2 // MSE = 4,35 μ
 - DEP 3 // MSE = 4,33 μ
 - DEP 4 // MSE = 4,56 μ
 - DEP 5 // MSE = 4,45 μ
-

^{a/} Média obtida a partir da medição de 30 conídios.

4.4.3. ANÁLISE MITÓTICA DOS SETORES DETERIORADOS (DETs E DEPs)

As Tabelas 13 e 14 mostram os dados referentes a análise dos segregantes haplóides, obtidos nos cruzamentos. Através dessa análise pode-se localizar os diferentes determinantes de deterioração nos grupos de ligação. (Tabela 15).

4.5. ANÁLISE MEIÓTICA

Os dados obtidos na análise meiótica estão presentes na Tabela 16. Eles foram obtidos pelo cruzamento dos deteriorados (DETs e DEPs) com a linhagem "MSE". O teste χ^2 foi aplicado aos resultados para se determinar se os desvios, da proporção esperada 1:1 para segregantes deteriorados e normais, foram ou não devido ao acaso.

4.5.1. LOCALIZAÇÃO DOS DETERMINANTES GENÉTICOS DE DETERIORAÇÃO NOS GRUPOS DE LIGAÇÃO

As Tabelas 17 a 27 mostram os dados obtidos para segregação entre as marcas da linhagem testadora e os determinantes de deterioração, e a frequência de recombinação entre as marcas.

Tabela 13. Análise mitótica dos segregantes brancos resultantes do cruzamento dos variantes deteriorados (DETs) com a linhagem "MSE".

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Variantes deteriorados // MSE					
		DET1	DET2	DET3	DET4	DET4.1	DET5
I	pro ⁺ paba ⁺	24	22	15	23	23	22
	pro ⁻ paba ⁻	1	0	0	3	3	4
II	a)						
III	gal ⁺	0	19	8	22	21	24
	gal ⁻	25	3	7	4	5	2
IV	pyro ⁺	25	19	13	22	21	18
	pyro ⁻	0	3	2	4	5	8
V	fac ⁺	25	17	14	17	23	19
	fac ⁻	0	5	1	9	3	7
VI	s ⁺	0	18	11	22	19	25
	s ⁻	25	4	4	4	7	1
VII	nic ⁺	25	12	13	0	0	22
	nic ⁻	0	10	2	26	26	4
VIII	ribo ⁺	25	16	12	26	20	0
	ribo ⁻	0	6	3	0	6	26
Total		25	22	15	26	26	26

a/ Só foram analisados os segregantes brancos.

Tabela 14 - Análise mitótica dos variantes deteriorados (DEPs).

Grupos de ligação	Marcadores genéticos	D e t e r i o r a d o s				
		DEP1	DEP2	DEP3	DEP4	DEP5
I	pro ⁺ paba ⁺	14	26	26	18	18
	pro ⁻ paba ⁻	5	0	0	8	3
II	a)					
III	gal ⁺	13	14	23	16	0
	gal ⁻	6	12	3	10	21
IV	pyro ⁺	13	18	19	17	18
	pyro ⁻	6	8	7	9	3
V	fac ⁺	13	19	20	14	16
	fac ⁻	6	7	6	12	5
VI	s ⁺	18	20	22	22	14
	s ⁻	1	6	4	4	7
VII	nic ⁺	16	19	22	17	15
	nic ⁻	3	7	4	9	6
VIII	ribo ⁺	17	26	25	17	15
	ribo ⁻	2	0	1	9	6
Total		19	26	26	26	21

a/ Só foram analisados os segregantes brancos (w).

Tabela 15 - Localização dos determinantes genéticos de deterioração nos grupos de ligação.

Determinantes de deteriorização	Grupo de ligação
DET 1	III e VI
DET 2	I
DET 3	I
DET 4	VII
DET 4.1	VII
DET 5	VIII
DEP 1	II
DEP 2	I
DEP 3	I
DEP 4	II
DEP 5	III

Tabela 16 - Segregantes obtidos através do ciclo sexual, pelo cruzamento dos deteriorados (DETs e DEPs) com a linhagem "MSE".

Cruzamento	Segregantes		Total	χ^2
	Normais	Deteriorados		
DET 1 x MSE	53	51	104	0,04 ns
DET 2 x MSE	78	49	127	6,60*
DET 3 x MSE	96	81	177	1,27 ns
DET 4 x MSE	53	50	103	0,09 ns
DET 4.1 x MSE	52	49	101	0,09 ns
DET 5 x MSE	69	64	133	0,19 ns
DEP 1 x MSE	71	66	137	0,18 ns
DEP 2 x MSE	72	57	129	1,74 ns
DEP 3 x MSE	20	20	40	0,08 ns
DEP 4 x MSE	77	62	139	1,62 ns
DEP 5 x MSE	56	45	101	1,20 ns

Tabela 17 - Análise meiótica do cruzamento do variante DET 1 com a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
III	gal ⁺	26	34	57%	4,85%
	gal ⁻	25	19		
VI	s ⁺	36	36	49%	4,90%
	s ⁻	15	17		

Tabela 18 - Análise meiótica do cruzamento do variante DET 2 com a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
I	pro ⁺	17	27	43%	± 4,8%
	pro ⁻	32	28		
	paba ⁺	15	27	41%	± 4,8%
	paba ⁻	34	28		

Tabela 19 - Análise meiótica do cruzamento do variante DET 3 com a linhagem "MSE".

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
I	pro ⁺	24	30	44%	± 4,8%
	pro ⁻	28	22		
	paba ⁺	25	30	45%	± 4,9%
	paba ⁻	27	22		

Tabela 20 - Análise meiótica do cruzamento do variante DET 4 com a linhagem "MSE".

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
VII	nic ⁺	22	33	59%	± 4,8%
	nic ⁻	28	20		

Tabela 21 - Análise meiótica do cruzamento do variante DET 4.1 com a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
VII	nic ⁺	21	28	56%	± 5,2%
	nic ⁻	24	19		

Tabela 22 - Análise meiótica do cruzamento do variante DET 5 com a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
VIII	ribo ⁺	24	30	54%	± 4,9%
	ribo ⁻	26	23		

Tabela 23 - Análise meiótica do cruzamento do variante DEP 1 com a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
I	pro ⁺	30	34	49%	± 4,3%
	pro ⁻	32	34		
	paba ⁺	32	33	52%	± 4,4%
	paba ⁻	30	35		
II					
III	gal ⁺	27	38	56%	± 4,3%
	gal ⁻	35	30		
IV	pyro ⁺	28	35	53%	± 4,3
	pyro ⁻	34	33		
V	fac ⁺	24	43	62%	± 4,2%
	fac ⁻	38	25		
VI	s ⁺	22	42	63%	± 4,2%
	s ⁻	40	26		
VII	nic ⁺	32	33	48%	± 4,3%
	nic ⁻	30	35		
VIII	ribo ⁺	36	29	42%	± 4,3%
	ribo ⁻	26	39		

Tabela 24 - Análise meiótica do cruzamento do variante DEP 2 com a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
I	pro ⁺	11	41	23%	± 3,9%
	pro ⁻	39	13		
	paba ⁺	10	43	20%	± 3,9%
	paba ⁻	40	11		

Tabela 25 - Análise meiótica do cruzamento do variante DEP 3 com a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
I	pro ⁺	8	15	32%	± 7,9%
	pro ⁻	12	5		
	paba ⁺	9	15	35%	± 7,5%
	paba ⁻	11	5		

Tabela 26 - Análise meiótica do cruzamento do variante DEP 4 com a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
I	pro ⁺	28	31	49%	± 4,9%
	pro ⁻	22	23		
	paba ⁺	29	33	48%	± 4,9%
	paba ⁻	21	21		
II					
III	gal ⁺	21	22	49%	± 4,9%
	gal ⁻	29	32		
IV	pyro ⁺	24	34	58%	± 4,8%
	pyro ⁻	26	20		
V	fac ⁺	31	30	47%	± 4,9%
	fac ⁻	19	24		
VI	s ⁺	30	38	56%	± 4,9%
	s ⁻	20	16		
VII	nic ⁺	28	40	60%	± 4,8%
	nic ⁻	22	14		
VIII	ribo ⁺	29	31	50%	± 4,9%
	ribo ⁻	21	23		

Tabela 27 - Análise meiótica do cruzamento do variante DEP 5 com a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
III	gal ⁺	21	25	48%	± 4,9%
	gal ⁻	24	31		

No caso dos variantes, DEP 2 e DEP 3, foi feito um teste de 3 pontos e assim obteve-se a ordem dos genes (Tabelas 28 e 29).

Tabela 28 - Teste de três pontos pro A₁, paba A₆ DEP 2.

Combinações ^{a/}			Nº de colônias
pro A ₁	paba A ₆	DEP 2	
-	-	-	35
+	+	-	10
+	-	-	1
-	+	-	0
Total			46

^{a/} Somente as colônias DEP 2 foram analisadas.

- Frequência de recombinação

$$- \text{ pro } A_1 - \text{ paba } A_6 = 2,17 \pm 4,15\%$$

$$- \text{ pro } A_1 - \text{ DEP } 2 = 23,91 \pm 6,28\%$$

$$- \text{ paba } A_6 - \text{ DEP } 2 = 21,73 \pm 6,08\%$$

- Ordem dos genes

$$\text{ pro } A_1 - \text{ paba } A_6 - \text{ DEP } 2$$

Tabela 29 - Teste de três pontos pro A_1 , paba A_6 , DEP 3.

Combinações ^{a/}			Nº de colônias
pro A_1	paba A_6	DEP 3	
-	-	-	11
+	+	-	8
+	-	-	0
-	+	-	1
Total			20

^{a/} Somente as colônias DEP 3 foram analisadas.

- Frequência de recombinação

$$\text{- pro } A_1 \text{ - paba } A_6 = 5,00 \pm 4,87$$

$$\text{- pro } A_1 \text{ - DEP } 3 = 40,00 \pm 10,6$$

$$\text{- paba } A_6 \text{ - DEP } 3 = 45,00 \pm 10,9$$

- Ordem dos genes

$$\text{DEP } 3 \text{ - pro } A_1 \text{ - paba } A_6$$

5. DISCUSSÃO

5.1. LIBERAÇÃO DE PROTOPLASTOS E REGENERAÇÃO

A técnica utilizada neste trabalho para a protoplastização de *A. nidulans*, foi a técnica de HAMLY *et alii* (1981), onde o micélio foi utilizado para obtenção dos mesmos. Esta técnica é rápida, eficiente e de fácil aplicação em laboratório. Nesta técnica para a digestão lítica da parede do fungo é necessária a exposição do micélio durante 3 horas às enzimas líticas.

GIBSON & PEBERDY (1972) estudaram a ultra estrutura de protoplastos de *A. nidulans*, e observaram que dois tipos de protoplastos eram liberados em diferentes tempos de exposição às enzimas líticas. Inicialmente eram liberados protoplastos pequenos que apresentavam algumas vesículas, e posteriormente houve o aparecimento de grandes protoplastos que apresentavam vacúolos.

Neste trabalho, foram utilizadas duas linhagens de *A. nidulans*, uma linhagem com uma duplicação cromossômica (linhagem "A") e uma linhagem haplóide (linhagem biA₁; meth G₁). Foi observada a liberação de protoplastos

das duas linhagens em três períodos de digestão lítica (1 h, 2 h e 3 h). As observações feitas confirmam os dados obtidos por GIBSON & PEBERDY (1972), sendo encontrado dois tipos de protoplastos (Figura 6).

Na primeira hora de incubação foram vistos protoplastos pequenos, apresentando algumas vesículas (Figura 6). Estes protoplastos foram observados nas duas linhagens, não tendo sido observada qualquer diferença no padrão de liberação dos mesmos. No entanto, a linhagem biA₁; meth G₁ mostrou um pequeno aumento no número de protoplastos liberados, em relação a linhagem "A", mas este não foi significativo a nível estatístico, como observado na Tabela 3.

Com duas horas de digestão lítica, protoplastos pequenos continuaram a ser observados. No entanto, já havia um número razoável de protoplastos médios e grandes. O número de protoplastos isolados neste período foi superior ao obtido com uma hora de incubação.

Já com três horas de incubação foi possível observar um bom número de protoplastos grandes e vacuolados (Figura 6b). A frequência de obtenção dos mesmos com 3 horas foi maior que as frequências obtidas com 1 h e com 2 h de incubação. ISAAC *et alii* (1978) observaram que a máxima produção de protoplastos de *A. nidulans* foi conseguida com três horas de incubação com as enzimas líticas. Foi também

descrito que quando o KCl foi utilizado como estabilizador osmótico, ocorreu um fracionamento sequencial da hifa. Assim, os protoplastos liberados inicialmente foram provenientes de regiões mais próximas das pontas das hifas, e os liberados posteriormente foram originados de regiões mais distais.

De acordo com a Tabela 4, pode-se observar que houve diferença entre os tempos dentro de cada linhagem na liberação de protoplastos. Nas duas linhagens ("A" e biA₁; meth G₁") o período de 1 hora de incubação foi estatisticamente diferente dos tempos de 2 e 3 horas, não tendo sido detectadas diferenças entre os dois últimos. (Figura 4):

Outro fator observado foi a regeneração das duas linhagens ("A" e biA₁; meth G₁) nos três períodos de incubação. Como demonstrado na Tabela 6, a menor porcentagem de regeneração foi encontrada em protoplastos com 1 hora de digestão lítica. Embora, como descrito por ISAAC *et alii* (1978), os protoplastos liberados inicialmente, tenham se originado da região apical da hifa, e por esse motivo carreguem consigo enzimas para uma reconstrução mais eficiente da parede; deve-se levar em consideração que estes protoplastos são pequenos, existindo assim uma maior probabilidade deles não possuírem todas as organelas necessárias

à sua reversão, ou não possuírem núcleo; o que impossibilitaria tal ocorrência.

Com duas horas de incubação já foi possível observar uma frequência de regeneração mais alta que com 1 hora (Tabela 5).

A porcentagem de regeneração de protoplastos das duas linhagens com 3 horas de digestão, ficou entre 20-27%, semelhante ao descrito por PEBERDY (1979) para regeneração de protoplastos de *A. nidulans*, que observou uma frequência de regeneração de 20 - 30%.

Não foi encontrada também, uma diferença significativa entre as duas linhagens quanto a regeneração de protoplastos. No entanto, novamente foi detectada diferença entre os tempos (Tabela 6), dentro de cada linhagem, como demonstrado pelo teste de Tukey (Tabela 7). A Figura 5 mostra a curva de porcentagem de regeneração das duas linhagens nos três períodos de incubação (1 h, 2 h e 3 h).

A variação observada no número de protoplastos e na regeneração dos mesmos, nas repetições dentro de cada tempo de exposição às enzimas líticas, pode ser explicado pela própria metodologia empregada. Poucas vezes são conseguidas repetições exatas de tais números, pois não se pode afirmar com precisão se foi colocado exatamente a mes-

ma quantidade de micélio nas três repetições, podendo ter havido também, variações não controláveis na temperatura de incubação, ou ainda diferenças encontradas entre os diversos lotes de uma enzima. Talvez devido a essa oscilação, não tenha sido possível detectar estatisticamente a diferença quanto a liberação de protoplastos e a porcentagem de regeneração entre as duas linhagens ("A" e biA₁; meth G₁).

Para utilização em experimentos de transformação é necessário a aplicação de técnicas de protoplastização que forneçam protoplastos em grande número, homogêneos, e que possuam uma boa frequência de regeneração. De acordo com os dados obtidos neste trabalho, a melhor porcentagem de regeneração e a máxima obtenção de protoplastos, foi conseguida com 3 horas de digestão lítica; entretanto, estes protoplastos se mostraram heterogêneos. Talvez a utilização de pró-micélio para obtenção dos mesmos, como descrito por GAMBINO *et alii* (1984), ou a utilização de protoplastos de conídios (BOS & SLAKORST, 1980), seja o caminho mais adequado para a obtenção de protoplastos mais homogêneos, necessários aos experimentos de transformação em fungos.

5.2. COLORAÇÃO DE NÚCLEOS DE PROTOPLASTOS

O estudo citológico dos protoplastos foi feito em diferentes tempos de exposição às enzimas líticas, nas duas linhagens ("A" e biA₁; meth G₁).

Os protoplastos liberados no primeiro período (1 h), foram pequenos, sem vacúolos, onde a maior parte dos mesmos apresentou apenas um núcleo. Protoplastos sem núcleos foram observados numa frequência de 27% na linhagem "A" e 30% da linhagem biA₁; meth G₁ (Tabela 8). ISAAC & PEBERDY (1985) descreveram que, quando o KCl é utilizado como estabilizador osmótico, cerca de 50% dos protoplastos liberados no período inicial de digestão lítica, não possuem núcleos. O fato dessa porcentagem não ter sido observada neste trabalho, pode ter ocorrido devido a técnica de coloração empregada, pois muitas vezes os protoplastos anucleados podem ter sido confundidos com artefatos de coloração. Na verdade, foram contadas apenas as estruturas que realmente se assemelhavam a protoplastos, possuindo uma forma arredondada.

No segundo período de incubação (2h) o número de protoplastos uninucleados permaneceu quase o mesmo, no entanto, houve um decréscimo na frequência de protoplastos anucleados em relação ao total de protoplastos com núcleos, e um aumento no número de protoplastos com mais de

um núcleo, nas duas linhagens (Tabela 8).

Após 3 horas de incubação foi observado um decréscimo na frequência de protoplastos anucleados e uninucleados, e um aumento no número de protoplastos com mais de um núcleo. Isto ocorreu possivelmente devido ao aumento do tamanho dos mesmos, que passaram a englobar uma maior quantidade de citoplasma e assim adquiriram maior número de núcleos.

O grande número de protoplastos sem núcleos obtidos na primeira hora de incubação pode ser o responsável, juntamente com outros fatores, pela baixa frequência de regeneração obtida neste período, como observado no item anterior. Esses protoplastos podem ser usados em trabalhos de micromanipulação e para estudos sobre herança citoplasmática.

5.3. OBTENÇÃO DE SETORES A PARTIR DA LINHAGEM "A"

Vários trabalhos têm demonstrado a influência de fatores ambientais na instabilidade genética de *A. nidulans*. NIFFINEGGER-SOUZA (1979) observou a influência da temperatura na produção de setores da linhagem "A" de *A. nidulans*. Foram utilizadas as temperaturas de 30°, 37° e

40°C. PIZZIRANI-KLEINER (1981) estudou esta influência nas temperaturas de 28°, 37° e 44°C. FAVRAUD (1984) demonstrou que a elevação da temperatura, dentro dos limites de 30° a 40°C, aumenta a instabilidade da linhagem "A" e de linhagens dela derivadas, com diferentes "*backgrounds*" genéticos. Também aumentam a instabilidade de linhagens de *A. nidulans* com duplicações; luz ultravioleta (MENEZES, 1974; AZEVEDO, 1975); azul de tripan (COOKE *et alii*, 1970); cafeína (ROPER & PALMER, 1972); DNA exógeno (MENEZES, 1974); cloroneb (AZEVEDO *et alii*, 1977), etc.

Em geral, existe uma grande variação no número de setores obtidos, por colônia, por diferentes autores. AZEVEDO (1971) obteve uma frequência média de 1,7; já OLIVEIRA (1982) observou uma frequência de 3,75. Esta ampla variação ocorre não somente devido ao tamanho das amostras, mas também devido as diferentes condições de incubação.

Na Tabela 9. pode ser observado o número de setores obtidos de colônias que não foram protoplastizadas (A) e de colônias que se originaram de regeneração de protoplastos (B). Para evitar um maior erro experimental devido ao tamanho da amostra, foram analisados números iguais de colônias nos dois casos, e durante a incubação, as placas foram colocadas aleatoriamente dentro da estufa. O número total de setores obtidos nos dois casos não diferiram signi-

ficativamente. No entanto, foram observados diferenças quanto ao número de setores verdes, amarelos e deteriorados.

Foi observado uma diminuição na frequência de setores verdes e um aumento na frequência de setores amarelos. Isto é, houve uma diminuição no número de deleções no segmento duplicado no grupo de ligação I, e um aumento na frequência de deleção do segmento translocado no grupo de ligação II. Também foi observado um aumento na frequência de setores deteriorados.

Como a linhagem "A" de *A. nidulans* é uma linhagem "*naturalmente*" instável, pode-se determinar com mais facilidade a influência de fatores ambientais neste organismo. Durante o processo de protoplastização, a célula é submetida à atividade de enzimas líticas, ficando depois em contato com uma solução estabilizadora, e por fim tendo que regenerar uma nova parede. Talvez o esforço celular para reverter a uma nova colônia, provoque algumas alterações genéticas como sugerido por NECAS & SVOBODA (1985).

5.3.1. SETORES DETERIORADOS

Em geral, são descritas frequências baixas de setores deteriorados obtidos da linhagem "A": 0,07 (AZEVEDO, 1971; OLIVEIRA, 1982; FRAVAUD, 1984); 0,06 (MENEZES,

1974); 0,12 (NEFFINEGGER & SOUZA, 1979; PACCOLA, 1982); 0,03 (PIZZIRANI-KLEINER, 1981).

Neste trabalho foi obtida uma frequência de 0,07 para as colônias do tipo "A" (não sofreram protoplastização) e de 0,17 para as colônias do tipo "B" (foram protoplastizadas). Como se pode observar a frequência de setores deteriorados obtido nas colônias que sofreram protoplastização é superior as descritas anteriormente.

Um total de 23 setores deteriorados foram observados. A maior parte deles não pôde ser analisado geneticamente, pois eram muito instáveis, não sendo possível mantê-los durante o tempo necessário para as análises.

Alguns aneuplóides foram encontrados, a maior parte foram dissômicos para o cromossomo VI. Estes puderam ser distinguidos fenotipicamente, pois os oito dissômicos de *A. nidulans* possuem fenótipos característicos (KAFFER & UPSHALL, 1973). Estes dissômicos eram altamente instáveis e quando repicados davam origem a colônias normais que posteriormente produziam setores dissômicos.

AZEVEDO & ROPER (1970) e AZEVEDO (1971) estudaram os setores deteriorados isolados de linhagens de *A. nidulans* com duplicações. Foram analisados 31 setores deteriorados. A maior parte dos deteriorados analisados tinham os seus determinantes de deterioração, em segmentos de

genoma não envolvidos na duplicação.

Setores deteriorados muito instáveis possivelmente se originam de novas duplicações em "*tandem*" no segmento duplicado, e originam em etapas posteriores, deteriorados mais estáveis.

5.3.2. DIÂMETRO DOS CONÍDIOS

Como os cromossomos de *A. nidulans* são muito pequenos (ELLIOTT, 1960), estudos citogenéticos não são feitos neste fungo, mas observações citológicas, como a medida do diâmetro dos conídios são de inestimável valor para determinação da ploidia.

Um dos critérios utilizados para determinar o grau de ploidia de uma linhagem é a medida do diâmetro de seus conídios. Para *A. nidulans* a relação entre o diâmetro de conídios haplóides e diplóides é de 1:1,3 (ROPER, 1952).

Foram obtidos, no presente trabalho, conídios diplóides originados do cruzamento das linhagens deterioradas com a linhagem "MSE". A comparação do diâmetro de tais conídios foi feita com conídios da linhagem "A" e linhagem "MSE". Os valores obtidos para os diplóides variaram entre 4,30 μ e 4,55 μ . Alguns deteriorados apresentaram o diâ-

metro dos conídios diplóides menor do que o exigido para ser diplóide da linhagem "A", no entanto nenhum deles teve o diâmetro menor do que $4,29 \mu$ (que corresponde a 1,3 vezes o diâmetro dos conídios da linhagem "MSE").

FAVRAUD (1984) obteve uma variação de $4,31 \mu$ a $5,02 \mu$ no diâmetro de conídios diplóides resultantes do cruzamento da linhagem "MSE" com deteriorados.

5.3.3. HAPLOIDIZAÇÃO

Várias substâncias químicas são usadas para haploidização de diplóides de *A. nidulans*, entre estas estão: p-fluorofenilalanina (MORPURGO, 1961; LHOAS, 1961), benlate (HASTIE, 1970), cloroneb (AZEVEDO & SANTANA, 1975).

Segundo KAFER (1960) a haploidização espontânea ocorre devido a sucessivas perdas de cromossomos. Esta explicação também é dada por LHOAS (1961) para a haploidização induzida pela p-fluorofenilalanina.

PIZZIRANI-KLEINER (1981) induziu a haploidização com cloroneb, para mapear o gene bncA, no entanto este atuou seletivamente, permitindo somente a detecção de setores haplóides $pyro^+$. Com a utilização do p-fluorofenilalanina (pfa) foi conseguida a obtenção de setores haplói-

des pyro e a localização do gene bncA no grupo de ligação IV.

PACCOLA (1982) comparou a haploidização produzida por três agentes: benlate, cloroneb e pfa, em quatro diplóides obtidos do cruzamento da linhagem "MSE" com variantes deteriorados. Foi observado que o cloroneb não é um bom agente haploidizante para diplóides heterozigotos para aberrações cromossômicas. Este fungicida além de aumentar a frequência de permuta mitótica, seleciona algumas marcas, dificultando as análises mitóticas. FRAVAUD (1984) empregou dois fungicidas, o cloroneb e o benlate, na haploidização de diplóides heterozigotos para aberrações cromossômicas. A ausência de segregantes haplóides deteriorados foi explicada como sendo devido a inibição de seu crescimento pelo fungicida ou ao seu menor valor adaptativo em relação a outros segregantes.

5.4. ANÁLISE MITÓTICA E MEIÓTICA DOS VARIANTES DETERIORADOS

Foram analisados geneticamente 11 setores de deteriorados, 6 obtidos de colônias do tipo "A" e 5 isolados das colônias do tipo "B". Estes deteriorados foram cruzados com a linhagem "MSE" e analisados através do ciclo se-

xual e parassexual.

Os deteriorados obtidos podem ser classifica
dos em dois grupos:

- a) possuem os determinantes de deteriora-
ção em outros cromossomos, que não estão
envolvidos na duplicação.
- b) possuem os determinantes de deteriora-
ção em um dos cromossomos envolvidos na
duplicação.

Nas Tabelas 14 e 17 podem ser observadas as
análises mitótica e meiótica do variante DET 1. Foi obser-
vado um rearranjo cromossômico neste deteriorado. De acor-
do com a análise mitótica estão envolvidos o grupo de liga-
ção III e o VI, não estando o determinante de deterioração
ligado a nenhum dos marcadores genéticos desses cromosso-
mos.

PACCOLA (1982) observou a presença de rear-
ranjos estruturais em três deteriorados isolados da linhaa
gem "A" de *A. nidulans*. Estes rearranjos envolviam cromos-
somos que não faziam parte da duplicação existente na linhaa
gem "A".

Na Tabela 14 pode ser vista a análise mitôti

ca do variante DET 2. O determinante genético de deterioração foi localizado no grupo de ligação I, não estando ligado aos marcadores genéticos do mesmo (Tabela 18). Na Tabela 16 é mostrada sua segregação, onde foi encontrado um desvio na frequência esperada de 1 deteriorado para 1 normal. Este desvio pode ter ocorrido devido ao menor valor adaptativo dos deteriorados e/ou a densidade de colônias semeadas por placa (FAVRAUD, 1984).

O variante DET 3 também possui o seu determinante de deterioração localizado no grupo de ligação I, não estando também ligado aos marcadores genéticos utilizados neste trabalho.

O determinante genético de deterioração do variante DET 4 foi encontrado no grupo de ligação VII (Tabela 14), não estando ligado ao marcador genético, nic B₈ (Tabela 20). Este deteriorado apresentou crescimento muito lento, diferindo do seu variante de primeira ordem, o DET 4.1, que apresentou crescimento similar ao da linhagem "A". Este variante (DET 4.1) apresentou o seu determinante genético de deterioração no mesmo cromossomo do deteriorado que lhe deu origem. No entanto, o crescimento mais rápido deste derivativo pode ser explicado pela perda do segmento duplicado no cromossomo II, pois ele possui conídios amarelos, e o variante DET 4, conídios verdes.

A análise genética do variante DET 5 revelou que o determinante genético de deterioração está localizado no grupo de ligação VIII, não estando ligado ao marcador genético, ribo B₂ (Tabela 22).

De acordo com a análise mitótica o variante DEP 1 tem o seu determinante de deterioração localizado no cromossomo II. Este grupo de ligação possui um segmento duplicado do cromossomo I ligado a ele, podendo o determinante de deterioração estar no segmento translocado, ou não.

O variante DEP 2 apresentou seu determinante de deterioração ligado aos marcadores genéticos do grupo de ligação I (proA₁, pabaA₆) Foi feito um teste de três pontos, onde o determinante de deterioração foi mapeado após os marcadores genéticos, sendo a ordem observada: proA₁ - paba A₆ - DEP 2 (Tabela 28), podendo ter se originado de uma deleção de parte do segmento duplicado.

O determinante de deterioração do variante DEP 3 foi localizado também no grupo de ligação I (Tabela 15). No entanto, seu mapeamento mostrou que ele está localizado antes dos marcadores genéticos, pro A₁ e paba A₆, no grupo de ligação I, sendo a ordem dos genes DEP 3 - pro A₁, paba A₆ (Tabela 29). Um fato interessante foi observado durante o cruzamento deste deteriorado. É que quase não foi obtida a formação de cleistotécios. Várias tentativas foram feitas,

onde apenas um pequeno número dos mesmos foi observado, e estes em sua grande maioria eram autofecundados ou estêreis. Um único cleistotécio híbrido foi obtido, e embora este apresentasse um pequeno número de ascosporos viáveis, ele foi utilizado na análise meiótica.

ELLIOTT (1960) observou a presença de ascosporos abortivos e ascos com número de ascosporos menor que 8 em linhagens que provavelmente eram portadoras de aberrações cromossômicas. Segundo PACOLLA (1982) a presença de aberrações cromossômicas, tem como consequência a produção de ascos com número de ascosporos inferior a 8, ou ascos contendo vários ou todos os ascosporos defectivos.

No caso do variante DEP 3 o número de ascosporos nos ascos não foi observado mas, este deve ter sido menor que 8, e boa parte deles deve ter sido defectivo. É provável que o rearranjo ocorrido no variante DEP 3 tenha causado esta alteração no número de cleistotécios formados e no número de ascosporos viáveis.

A localização do determinante de deterioração do variante DEP 4 foi observada no cromossomo II. Este determinante parece estar localizado no segmento translocado, pois deu origem a setores melhorados, amarelos e verdes. AZEVEDO (1971) observou que os determinantes de deterioração dos variantes V_4 e V_{31} estavam localizados no gru

po de ligação II, no segmento em duplicata translocado. O V_4 foi originado a partir da linhagem "B" e o V_{31} da linhagem "A".

O determinante de deterioração do variante DEP 5 foi localizado no grupo de ligação III, não estando ligado ao marcador genético gal A_1 .

Durante o período de estocagem dos deteriorados, vários deles apresentaram modificações durante as repicagens sucessivas. Entre estes está o DET 1, que perdeu muitas de suas características presentes durante a análise, tendo havido uma grande alteração fenotípica da época em que sua análise foi feita até o presente momento. O variante DET 3, no período em que foi analisado mostrava crescimento normal. Na última repicagem feita do estoque, este variante mostrou-se mais lento no crescimento e foi observada a presença de setor mais deteriorado (Figura 7). O variante DET 5 teve várias de suas características alteradas, produzindo nas últimas repicagens um número menor de confídios, um crescimento mais lento e os bordos da colônia totalmente irregulares, o que não ocorria no período de sua análise genética, que foi feita logo após seu isolamento. O variante DEP 5 também passou a apresentar nas últimas repicagens uma grande instabilidade, produzindo diversos setores amarelos, que provavelmente se originaram pela perda do segmento

translocado ligado ao cromossomo 11. Estas alterações fenotípicas demonstram que novas alterações genéticas podem ter ocorrido nestas linhagens.

Pelas análises feitas nos deteriorados originados das colônias do tipo "A" (DETS) e das colônias do tipo "B" (DEPS), não foi observado nenhum tipo de alteração que ainda não tivesse sido descrita. Os variantes deteriorados isolados das colônias que não sofreram protoplastização mostraram-se semelhantes aos isolados de colônias resultantes de protoplastos, não tendo a protoplastização aparentemente provocado nenhum tipo de alteração nova.

Os variantes deteriorados obtidos neste trabalho foram posteriormente denominados de acordo com a numeração iniciada por AZEVEDO (1971) como mostra a Tabela 30.

Tabela 30 - Classificação dos variantes deteriorados (DETS e DEPS).

Variantes	Classificação final *
DET 1	V 7 9
DET 2	V 8 0
DET 3	V 8 1
DET 4	V 8 2
DET 4.1	V 8 3
DET 5	V 8 4
DEP 1	V 8 5
DEP 2	V 8 6
DEP 3	V 8 7
DEP 4	V 8 8
DEP 5	V 8 9

*Numeração iniciada por AZEVEDO (1971).

6. CONCLUSÕES

Pelos resultados aqui obtidos pode-se concluir que:

- 1) dois tipos de protoplastos são liberados durante a digestão lítica de 3 horas, do micélio de *A. nidulans*, quando o KCl é usado como estabilizador osmótico;
- 2) o maior número de protoplastos, como também a melhor frequência de regeneração é obtida após 3 horas de digestão lítica, quando se utiliza o micélio para obtenção dos protoplastos;
- 3) a linhagem "A" e a linhagem biA₁; meth G₁ não diferem significativamente quanto a liberação de protoplastos e a porcentagem de regeneração;
- 4) o melhor período para a obtenção de protoplastos com menor número de núcleos é 1 h de digestão lítica.

- 5) a protoplastização provoca um aumento no número de setores deteriorados nas colônias da linhagem "A" De *A. nidulans* que são submetidas a esta técnica.
- 6) tanto a linhagem "A" protoplastizada como a não protoplastizada, parecem não diferir quanto as características dos setores deteriorados encontrados.
- 7) as linhagens deterioradas estocadas, podem com o decorrer do tempo perderem suas características iniciais, e tornarem-se mais instáveis.

7. BIBLIOGRAFIA

- ANDRES, I. & PEBERDY, J.F. Release of invertase from *Aspergillus nidulans* by the action of lytic enzymes and invertase secretion by regenerating protoplasts. *Microbios*, Cambridge, 11:15-20, 1974
- ANNÉ, J.; EYSSEN, H.; DE SOMER, P. Formation and characterization of *Penicillium chrysogenum* protoplasts. *Archives of Microbiology*, Berlin, 98:159-166, 1974.
- APIRION, D. A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice-versa in micro organisms. *Nature*, London, 195:959-961, 1962.
- AZEVEDO, J.L. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. England, 1971. 240p. (Ph.D. THESIS - University of Sheffield).
- AZEVEDO, J.L. Altered instability due to genetic change in a duplications strain of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, London, 26:55-61, 1975.

- AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. *Exercícios Práticos de Genética*. São Paulo, EDUSP, 1973. 288p.
- AZEVEDO, J.L.; OLIVEIRA, A.; ROCHA CAMPOS, A.J. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 2:237-241, 1976.
- AZEVEDO, J.L. & ROPER, J.A. Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: sucessive and transposable genetic changes. *Genetical Research*, London, 16:79-93, 1970.
- AZEVEDO, J.L. & SANT'ANA, E.P. The use of chloroneb to obtain haploid segregants from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, Sheffield, 13:6, 1975.
- AZEVEDO, J.L.; SANT'ANA, E.P.; BONATELLI, R. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, Amsterdam, 48:163-172, 1977.
- BACHMANN, B.J. & BONNER, D.M. Protoplasts from *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 78:550-556, 1959.
- BAINBRIDGE, B.W. & ROPER, J.A. Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, London, 42:417-424, 1966.

- BALL, C. Instability associated with chromosome translocation in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, London, 21:531, 1966.
- BALL, C. Chromosome instability related to gene suppression in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, London, 10:173-183, 1967.
- BARNETT, W.E. & DE SERRES. Fixed genetic instability in *Neurospora crassa*. *Genetics*, Princeton, 48:717-723, 1963.
- BARTNICKI-GARCIA, S. Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. *Symposium Society for General Microbiology*, Cambridge, 23:245-268, 1973.
- BENITEZ, T.; RAMOS, S.; GARCIA-ACHA, I. Protoplasts of *Trichoderma viride*: formation and regeneration. *Archives of Microbiology*, Berlin, 103:199-203, 1975.
- BERLINER, M.D. Induction of protoplasts of *Schizosaccharomyces octosporus* by magnesium sulfate and 2-deoxy-D-glucose. *Mycologia*, Lancaster, 63:819-825, 1971.
- BINDING, H. & WEBER, H.J. The isolation, regeneration and fusion of *Phycomyces* protoplasts. *Molecular General Genetics*, Berlin, 135:273-276, 1974.

- BONATELLI Jr., R. & AZEVEDO, J.L. Effects of ethidium bromide in diploid and duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Experientia*, Basel, 33:311-312, 1977.
- BORGES, M.I. Técnicas de Protoplastização e Isolamento de DNA de alto peso molecular de *Aspergillus niger*. Campinas, 1978, 125pp. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas.
- BOS, C.J. & SLAKHORST, S.M. Isolation of protoplasts from *Aspergillus nidulans* conidiospores. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 27(4):400-407, 1981.
- BURNS, J.A. & GERSTEL, D.U. Flower color variegation and instability of a block of heterochromatin in *Nicotiana*. *Genetics*, Princeton, 57:155-167, 1967.
- BURR, K.W.; ROPER, J.A.; RESLTON, J. Modification of chromosome instability in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, London, 128:2899-2907, 1982.
- CASE, B.L. & ROPER, J.A. Mitotic processes which restore genome balance in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, London, 124:9-16, 1981.
- CLUTTERBUCK, A.J. A variegated position effect in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, London, 16:303-316, 1970.

- CLUTTERBUCK, A.J. *Aspergillus nidulans*. In: KING, R.C., Ed. HANDBOOK OF GENETICS. New York, Plenum Press, 1974, v.1, p.447-510.
- COOKE, P.; ROPER, J.A.; WATMOUGH, W. Trypan blue induced deletions in duplications strains of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London, 226:276-277, 1970.
- CROFT, J.H. A reciprocal phenotypic instability affecting development in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, London, 21:565-579, 1966.
- DAVIS, B. Factores influencing protoplasts isolation. In: PEBERDY, J.F. & FERENCZY, L. Ed. Fungal Protoplasts. Applications in Biochemistry and Genetics. New York, Marcel Pekker, Inc., 1985. p.45-72.
- DAVIS, B.; D'AVILLEZ PAIXÃO, M.T.; DEANS, S.G.; SMITH, J.E. Protoplast formation from giant cells of *Aspergillus niger*. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 69:207-212, 1977.
- DAWSON, G.W. & SMITH-KEARY, P.F. Episomic control of mutations in *Salmonella typhimurium*. *Heredity*, London, 18:1-20, 1963.

- DEMEREK, M. Miniature-Alpha: a second frequently mutating character in *Drosophila virilis*. *Proceedings of the National Academy of Science*, Washington, USA, 12:687-690, 1926.
- DEMEREK, M. Behavior of two mutable genes in *Delphinium agacis*. *Journal of Genetics*, London, 24:179-193, 1931.
- DEMEREK, M. Frequency of spontaneous mutations in certain stocks of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, Princeton, 22:469-478, 1937.
- DEMEREK, M. Instable genes in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, New York, 9:145-150, 1941.
- DE VRIES, O.M.H. & WELLS, J.G.H. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic preparation from *Trichoderma viride*. *Journal of General Microbiology*, London, 73:13-22, 1972.
- DOOIJEWAAARD-KLOOSTERZIEL, A.M.P.; SIETSMA, J.H.; WOUTERS, J. T.M. Formation and regeneration of *Geotrichum candidum* protoplasts. *Journal of General Microbiology*, London, 74:205-209, 1973.
- DZIENGEL, A.; HELD, W.; SCHAANDERER, G.; DELLWEG, H. Controlled preparation of protoplasts of *Kloeckera* sp. 2201 grown on methanol. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 4:21-27, 1977.

- EDDY, A.A. & WILLIAMSON, D.H. A method of isolating protoplasts from yeast. *Nature*, London, 179:1252-1253, 1957.
- ELLIOTT, C.G. The citology of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, London, 1:462-476, 1960.
- EMERSON, S. & EMERSON, M.R. Production, reproduction and reversion of protoplasts-like structures in the osmotic strain of *Neurospora crassa*. *Proceedings of National Academy of Science*, Washington, USA, 44:663-671, 1958.
- ENGELS, W.R. The P family of transposable elements in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics*, California, 17:315-344, 1983.
- EYSSEN, H. Formation of protoplasts of *Penicillium chrysogenum* and some other filamentous fungi. *Agricultura*, 25:21-44, 1977.
- FAVRAUD, L. Instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans* com duplicação cromossômica. Piracicaba, 1984, 160p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- FAWCETT, P.A.; LODER, P.B.; DUNCAN, M.J.; BEESLEY, T.J.; ABRAHAM, E.P. Formation and properties of protoplasts from antibiotic-producing strains of *Penicillium chrysogenum* and *Cephalosporium acremonium*. *Journal of General Microbiology*, London, 79:293-309, 1973.

- FINCHAM, J.R.S. & HARRISON, B.J. Instability at the pal locus in *Antirrhinum majus*. II- Multiple alleles produced by mutation of one original unstable allele. *Heredity*, London, 22:211-224, 1967.
- FINCHAM, J.R.S. & SASTRY, G.R.K. Controlling elements in maize. *Annual Review of Genetics*, California, 8:15-50, 1974.
- FINKELMAN, M.A.J.; ZASIC, J.E.; VARDANIS, A. New method of producing protoplasts of *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 39:923-925, 1980.
- GABRIEL, M. Formation and regeneration of protoplasts in the hold *Rhizopus nigricans*. *Folia Microbiology*, Praga, 13:231-234, 1968.
- GABRIEL, M. Karyokinesis and septum formation during the regeneration of incomplete cell walls in protoplasts of *Schizosacchariomyces japonicus* var. *versatilis*: a timelapse microcinetographic study. *Journal of General Microbiology*, London, 130:625-630, 1984.
- GABRIELLI, A. & AZEVEDO, J.L. A strain of *Aspergillus nidulans* producing a high frequency of disomics. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 75:15-20, 1980.

- GAMBINO, J.; BERGEN, L.G.; MORRIS, N.R. Effects of mitotic and tubulin mutations on microtubule architecture in actively growing protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Cell Biology*, New York, 99:830-838, 1984.
- GARCIA-ACHA, I.; RODRIGUES AGUIRRE, M.J.; VILLANUEVA, J.R. Protoplasts from conidia of *Fusarium culmorum*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 10:9-101, 1964.
- GAVAZZI, G. Transposition of a member of a duplicated region in maize. *Heredity*, London, 35:389-400, 1975.
- GAVAZZI, G.; SANDRI, H.; ANZANI, G.; GHIDONI, A. Chromosomal instability associated with duplications in maize. *Heredity*, London, 38:349-358, 1977.
- GERSTEL, D.U.; BURNS, J.A. Phenotypic and chromosomal abnormalities associated with the introduction of heterochromatin from *Nicotiana octophora* into *Nicotiana tabacum*. *Genetics*, Princeton, 56:483-502, 1967.
- GIBSON, R.K. & PEBERDY, J.F. Fine structure of protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, London, 72:529-538, 1972.
- GOKHALE, A.V. & ISAAC, S. Measurements of respiratory activity in isolated protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 83:557-560, 1984.

- GOLDSTEIN, A. & SMOOT, J.S. A strain of *Escherichia coli* with an unusually high rate of auxotrophic mutation. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 70:588-595, 1955.
- GREEN, M.M. The genetics of a mutable gene at the white locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, Princeton, 56:467-487, 1967.
- GREEN, M.M. Mapping a *Drosophila melanogaster* "controlling element" by interallelic crossing-over. *Genetics*, Princeton, 61:423-428, 1969a.
- GREEN, M.M. Controlling element mediated transpositions of the white gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, Princeton, 61:429-441, 1969b.
- GREEN, M.M. The genetics of a mutator gene in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, Amsterdam, 10:353-363, 1970.
- GREEN, M.M. Genetic instability in *Drosophila melanogaster*: mutable, miniature (m^U). *Mutation Research*, Amsterdam, 29:77-84, 1975.
- GUNDERSEN, W.B.; JYSSUM, K.; LIE, S. Genetic instability with episome-mediated transfer in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 83:616-623, 1962.

- HAMLYN, P.F.; BRADSHAW, R.E.; MELON, F.M.; SANTIAGO, C.M.; WILSON, J.M.; PEBERDY, J.F. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme and Microbial. Technology*, Guildford, 3:321-325, 1981.
- HASTIE, A.C. Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, London, 226:771, 1970.
- ISAAC, S. Biochemical properties of protoplasts from *Aspergillus nidulans*, 1978. (Ph.D Thesis - University of Nottingham).
- ISAAC, S. Metabolic properties of protoplasts. In: PEBERDY, J.F. & FERENCZY, L., Ed., Fungal Protoplasts: Applications in Biochemistry and Genetics. Marcel Dekke, Inc., 1985. p.171-188.
- ISAAC, S. & GOKHALE, A.V. Autolysis: a tool for protoplast production from *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological*, London, 38:389-394, 1982.
- ISAAC, S. & PEBERDY, J.F. Protein synthesis in mycelial protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 85:358-361, 1985.

- ISAAC, S.; RYDER, N.S.; PEBERDY, J.F. Distribution and activation of chitin synthase in protoplast fractions released during the lytic digestion of *Aspergillus nidulans* hyphase. *Journal of General Microbiology*, London, 105:45-50, 1978.
- JINKS, J.L. Extranuclear inheritance. In: AINSWORTH, F.C. & SUSSMAN, A.S., Ed. *The Fungi - An advanced treatise*. New York, Academic Press, 1966, v.2, p.619-660.
- KÄFFER, E. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London, 186:616-620, 1960.
- KÄFFER, E. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, Princeton, 46:1581-1609, 1961.
- KÄFFER, E. Disruptive effects of ethyl alcohol on mitotic chromosome segregation in diploid and haploid, strains of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, Amsterdam, 135:53-75, 1984.
- KÄFFER, E. & UPSHALL, A. The eight disomic and trisomic phenotypes of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Heterity*, Washington, 64:35-38, 1973.

- KOMEL, R.; ROSMAN, D.; PUC, C.; SOCIC, H. Effect of immobilization on the stability of *Claviceps purpuria*. Protoplasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Baltimore, 23:106-108, 1985.
- KROPP, B.R. & FORTIN, J.A. Formation and regeneration of protoplasts from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 64:1124-1126, 1985.
- LHOAS, P. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with para-fluorophenylalanine. *Nature*, London, 190:744, 1961.
- LIEBER, M.M. The effects of temperature on genetic instability in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, Amsterdam, 34:93-122, 1976a.
- LIEBER, M.M. The genetic instability and mutagenic interaction of chromosomal duplications present together in haploid strains of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, Amsterdam, 37:33-66, 1976b.
- LYNCH, P.T.; COLLIN, H.A.; ISAAC, S. Use of autolytic enzyme for isolation of protoplasts from *Fusarium tricinatum* hyphae. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 84:473-478, 1985.

- McCLINTOCK, B. Chromosome organization and gene expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, New York, 16:13-47, 1951.
- McCLINTOCK, B. Induction of instability at selected loci in maize. *Genetics*, Princeton, 38:579-599, 1953.
- McCLINTOCK, B. Intranuclear systems controlling gene action and mutation. *Brookhaven Symposia Biology*, Lipton, 8:58-71, 1955.
- McCLINTOCK, B. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, New York, 21:197-216, 1956.
- McCULLY, K.S. & FORBES, E. The use of P-fluorophenylalanine with "master" strains of *Aspergillus nidulans* form assigning genes to linkage groups. *Genetical Research*, London, 6:352-359, 1965.
- MENEZES, E. Análise genética de variantes deteriorados e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, 1974, 114p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).
- MILLINGTON-WARD, A.M. A vegetative instability in *Aspergillus nidulans*. *Genetica*, Leiden, 38:191-207, 1967.

- MOORE, P.M. & PEBERDY, J.F. Release and regeneration of protoplasts from the conidia of *Aspergillus flavus*. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 66:421-425, 1976.
- MORPURGO, H.Y. Somatic segregation induced by p-fluorofenilalanine. *Aspergillus News Letter*, Sheffield, 2:10, 1961.
- MORSE, M.L. Reversion instability of an extreme polar mutant of the galactose operon. *Genetics*, Princeton, 56:331-340, 1967.
- MUKHERJEE, M. & SENGUPTA, S. Mutagenesis of protoplasts and regeneration of mycelium in the mushroom *Valvariella valvacia*. *Applied Environmental Microbiology*, Baltimore, 52:1412-1414, 1986.
- NECAS, O. & SVOBODA, A. Cell wall regeneration and protoplast reversion. In: PEBERDY, J.F. & FERENCZY, L. Ed. Fungal protoplasts: applications in biochemistry and genetics. New York, Mancel Dekke, Inc., 1985. p.135-170.
- NEIROTTI, E.; TANAKA, Y.; AZEVEDO, J.L. Estudo do processo de obtenção de protoplastos em *Humicola* sp. In: Encontro de Geneticistas Paulistas, 5, Piracicaba, 1987.

- NEVERS, D.; SAEDLER, H. Transposable genetic elements as agents of gene instability and chromosomal rearrangements. *Nature*, London, 268:109-115, 1977.
- NEWMEYER, D. Somatic instability in *Neurospora*, resulting from A pericentric inversion. *Genetics*, Princeton, 52:462-468, 1965.
- NEWMEYER, D. & GALEAZZI, D.R. A meiotic UV-sensitive mutant that causes deletion of duplications in *Neurospora*. *Genetics*, Princeton, 89:245-270, 1978.
- NEWMEYER, D. & GALEAZZI, D.R. The instability of *Neurospora* duplication Dp (IL $\rightarrow$ IR) H4250, and its genetic control. *Genetics*, Princeton, 85:461-488, 1977.
- NEWMEYER, D. & TAYLOR, C.W. A pericentric inversion in *Neurospora* with unstable duplication progeny. *Genetics*, Princeton, 56:771-791, 1967.
- NEWMEYER, D.; SCHROEDER, A.; GALEAZZI, D.R. An apparent connection between histidine, recombination and repair in *Neurospora*. *Genetics*, Princeton, 89:271-280, 1978.
- NEWTON, S.M.C.; BIANCO, M.; COSTA, S.O.P. Mutação em alta frequência do gene da C.P.S. Possível participação de um transposon em *Proteus mirabilis*. *Ciência e Cultura*, São Paulo, Suplemento, 7:709, 1982.

- NGA, B.H. & ROPER, J.A. A chromosomal process giving rise to vegetative instability in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, London, 21:530-531, 1966.
- NGA, B.H. & ROPER, J.A. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis at *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, Princeton, 58:193-209, 1968.
- NGA, B.H. & ROPER, J.A. A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, London, 14:63-70, 1969.
- NIFFINEGGER-SOUZA, D.R. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1979, 224p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).
- OLIVEIRA, F.M. Análise genética de setores melhorados em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1982. 101p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).
- PACCOLA, L.D. Estudos genéticos e citológicos em variantes deteriorados de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1982. 131p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).

- PARAG, Y. & ROPER, J.A. Genetic control of chromosome instability in *Aspergillus nidulans* as a mean for gene amplification in eukaryotic microorganism. *Molecular General Genetics*, Berlin, 140:275-287, 1975.
- PEBERDY, J.F. The protoplasts from *Mortierella venacio*. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 56:67-72, 1971.
- PEBERDY, J.F. Fungal protoplast isolation, reversion and fusion. *Annual Review of Microbiology*, California, 33:21-39, 1979.
- PEBERDY, J.F. Protoplasts and their development. In: SMITH, J.E. & BERRY, D.R., ed. Protoplasts and Their Development. London, Edward Arnold, 1978, v.3, pp.119-131.
- PEBERDY, J.F. & GIBSON, R.K. Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *Journal of General Microbiology*, London, 69:325-330, 1971.
- PEBERDY, J.F.; BUCKLEY, C.E.; DALTREY, D.C.; MOORE, P.M. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 67:23-26, 1976.

- PEREZ-CABO, A.; REYS, E.; NOVAES-DEIEN, M.; GARCIA-MENDOZA, C. Cell wall. Cellwall remnants and spheroplast regeneration in *Mucor rouxi*. *Transaction of the British Mycological Society*, London, 86:445-449, 1986.
- PERKINS, D.D. & BARRY, E.G. The cytogenetics of *Neurospora*. *Advances in Genetics*, New York, 86:133-285, 1977.
- PICATAGGIO, S.K.; SHAMHART, D.H.J.; MONTENECOURT, B.S.; EYELEIGH, D.E. Sphaeroplast formation and regeneration in *Trichoderma reesi*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 17:121-128, 1983.
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Efeito do gene binA, na formação de conídios de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1981, 141p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A. & AZEVEDO, J.L. Characterization and genetical analysis of in *Aspergillus nidulans* strain that produces multinucleated conidia. *Transactions of the British Mycological*, London, 86:123-130, 1986a.
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A. & AZEVEDO, J.L. Effect of the bncA gene on the instability of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, London, 48:145-150, 1986b.

- PONTECORVO, G. & KAUFER, E. Genetic analysis based on mitotic recombination. *Advances in Genetics*, New York, 9:71-104, 1958.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MacDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, New York, 5:141-238, 1953.
- PONTECORVO, G.; TARR GLOR, E.; FORBER, E. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Genetics*, London, 52:226-237, 1954.
- RHOADES, M.M. The genetic control of mutability in maize. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, New York, 9:138-144, 1941.
- ROBERTS, C.F. A replica plating technique for the isolation of nutritionally exacting mutants of a filamentous fungus (*A. nidulans*). *Journal of General Microbiology*, London, 20:540-548, 1959.
- ROPER, J.A. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, Basel, 8:14-15, 1952.
- ROPER, J.A. & NGA, B.H. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. The production of hypodiploid and hypohaploid nuclei. *Genetical Research*, London, 14:127-136, 1969.

- ROPER, J.A.; PALMER, H.M.; WATMOUGH, W.A. Mitotic conformity in *Aspergillus nidulans*. The effects of caffeine. *Molecular General Genetics*, Berlin, 118:125-133, 1972.
- ROSATO, J.B. Efeitos do etil-metano sulfonato e acriflavina na instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1973, 74p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).
- ROSATO, Y.B. & AZEVEDO, J.L. Acriflavina and ethyl methanesulfonate - induces mutants of *Aspergillus nidulans*. Strains with chromosome duplication. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 4:247-262, 1978.
- ROSATO, Y.B. & AZEVEDO, J.L. Genetic analysis of compact mutants of *Aspergillus nidulans*. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 2:199-210, 1983.
- ROSATO, Y.B. & AZEVEDO, J.L. Mitotic instability of a compact mutant of *Aspergillus nidulans*. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 3:425-433, 1987.
- SAND, S.A. Phenotypic variability and the influence of temperature on somatic instability in cultures derived from hybrids between *Nicotiana langsdorffii* and *Nicotiana sanderae*. *Genetics*, Princeton, 42:685-703, 1957.

- SELITRENNIKOFF, C.P.; LILLEY, B.L.; ZUCKER, R. Formation and regeneration of protoplasts derived from a temperature-sensitive osmotic strain of *Neurospora crassa*. *Experiental Mycology*, 5:155-161, 1981.
- SEXTON, C.E. & ROPER, J.A. Spontaneous duplications and transpositions of a large chromosome segment in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, London, 130: 583-595, 1984.
- SIETSMA, J.M. & BOER, W.R. Formation and regeneration of protoplasts from *Pythium* PR1 2142. *Journal of General Microbiology*, London, 74:211-217, 1973.
- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarrizium anisopliae*. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 9:149-152, 1987.
- SMITH, H.H. & SAND, J.A. Genetic cultures on somatic instability in cultures derived from hybrids between *Nicotiana langsdorfii* and *Nicotiana sanderaei*. *Genetics*, Princeton, 42:560-582, 1957.
- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. Statistical methods. 7^a ed. Ames, Iowa, State University Press, 1980, 507p.

- STARLINGER, P. DNA rearrangements in procaryotes. *Annual Review of Genetics*, California, 11:103-126, 1977.
- STELL, R.G.D. & TORRIE, J.H. Principles and procedures of statistics, 2^a ed., New York, McGraw-Hill Book Company, 1980. 633p.
- TANAKA, H.; OGASAWARA, N.; KAMIMIYA, S. Protoplasts of *Pyricularia oryzae* P₂: preparation and regeneration into hyphal form. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, 45:1541-1552, 1981.
- TAYLOR, A.L. Bacteriophag-induced mutation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science*, USA, Washington, 50:1043-1051, 1963.
- TOYAMA, H.; SHINMYO, A.; OKADA, H. Protoplast formation from conidia of *Trichoderma reesei* by cell wall-lytic enzymes of a strain of *Trichoderma viride*. *Journal of Fermentation Technology*, 61:409-411, 1983.
- TREFFERS, H.P.; SPINELLI, U.; BELSER, N.O. A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science*, USA, Washington, 40:1064-1071, 1954.

VERMEULEN, C.A.; RAEVEN, M.B.J.H.; WESSELS, J.G.H.

Localization of chitin synthase activity in subcellular fractions of *Schezophyllum communi* protoplasts. *Journal of General Microbiology*, London, 114:87-97, 1979.

VILLANUEVA, R.J. & GARCIA-ACHA, I. The phenomenon of regeneration in fungal protoplasts. *Revista Latino Americana de Microbiologia*, México, 14:49-64, 1972.

WAKABAYASHY, S.; MAGAE, Y.; KASHIWAGI, Y.; SASAKI, T.

Formation of giant protoplasts from *Pleurotus cornucopiae* by the cell wall lytic enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Baltimore, 19:58-60, 1984.

WEISBERG, R. & ADHYA, S. Illegitimate recombination in bacteria and bacteriophage. *Annual Review of Genetics*, California, 11:451-473, 1977.

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.