CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CLONAGEM GÊNICA
EM *Aspergillus nidulans* PORTADOR DE
DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA

MARISA VIEIRA DE QUEIROZ
-Bióloga-

Orientador: Dr. João Lúcio de Azevedo

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de
Plantas.

PIRACICABA
ESTADO DE SÃO PAULO
ABRIL DE 1993

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

Q3c Queiroz, Marisa Vieira de
 Caracterização molecular e clonagem gênica em
Aspergillus nidulans portador de duplicação cromos-
sômica. Piracicaba, 1993.
 116p.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Eletroforese em campo pulsado 2. Fungo filamen-
toso - Clonagem 3. Fungo filamentoso - Duplicação
cromossômica I. Escola Superior de Agricultura Luiz
de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.2

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CLONAGEM GÊNICA
EM *Aspergillus nidulans* PORTADOR DE
DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA

Marisa Vieira de Queiroz

Aprovada em : 2/2/93

Comissão Julgadora :

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
Prof ^ª Dr ^ª Aline Aparecida Pizzirani-kleiner	ESALQ/USP
Prof ^ª Dr ^ª Maria Lucia Carneiro Vieira	ESALQ/USP
Prof ^ª Dr ^ª Maria Helena Pelegrinelli Fungaro	UEL
Prof ^ª Dr ^ª Elza Machado Menezes	UFRRJ

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Orientador

Aos meus pais, MANOEL e SALETE,
que representam a luz na minha
caminhada. Eles são o sol que me
ilumina e prepara para a vida.

A Olivier, meu companheiro e amigo,
com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

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

- . Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação e pelo exemplo de dedicação e trabalho.
- . Prof. Dr. Augusto Schrank, por ter me recebido em seu laboratório durante o período de um ano.
- . Prof. Dr. Claudio Scazzocchio pela agradável convivência, estímulo e confiança.
- . Prof^a Dr^a. Aline Pizzirani-Kleiner, pelo estímulo, amizade e sugestões.
- . Prof^a Dr^a. Maria Lúcia Carneiro Vieira pela amizade e auxílio na utilização do microcomputador.
- . Marta Queiroz Aquino, Eudes de Freitas Aquino, Isabela Queiroz Aquino, Manoela Queiroz Aquino, Mariana Queiroz Aquino e Marília Queiroz Aquino por todos os momentos felizes que passamos juntos, por todo aprendizado que é a convivência com vocês e por suportarem toda minha impaciência e nervosismo.
- . João, Vanessa, Silvia e Lisiane pela amizade, carinho e otimismo que me motivaram a seguir em frente e acreditar que ainda vale a pena lutar pelos nossos ideais.
- . Anete, Ana e Michel por terem me recebido maravilhosamente em Paris e me auxiliado na difícil fase de adaptação em um país estrangeiro.
- . José Odair e Renata pelo auxílio na execução das fotografias.
- . Todos os colegas e funcionários do laboratório de genética de microrganismos, pelo estímulo e ajuda na parte experimental.
- . Todos os colegas do Centro de Biotecnologia de Porto Alegre-RS, pela ajuda e constante apoio.
- . Todos os colegas da Université de Paris-Sud, França, pela ajuda e sugestões.

- . Todos os amigos da "Maison du Brésil", especialmente Maria Helena, Gelba, José Carlos, Carlos e Ervé, pela convivência maravilhosa em Paris.
- . Professores do curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.
- . CNPq pela concessão da Bolsa de Estudos.
- . Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto que permitiu a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Página

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	03
2.1. O FUNGO FILAMENTOSO <i>Aspergillus nidulans</i>	03
2.1.1. Mutantes relacionados com a coloração dos conídios.....	05
2.1.2. Duplicações cromossômicas.....	06
2.2. ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO(PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS.....	09
2.2.1. Preparação das amostras.....	10
2.2.2. Parâmetros essenciais.....	13
2.2.3. Utilização da técnica de eletroforese em campo pulsado em fungos.....	14
2.3. TRANSFORMAÇÃO EM FUNGOS FILAMENTOSOS.....	16
2.3.1.Parâmetros essenciais.....	17
2.3.2. Vetores.....	20
2.3.3. Marcas utilizadas para seleção de transformantes.....	24
2.3.3.1. Mutantes auxotróficos.....	24
2.3.3.2. Marcas dominantes.....	25
2.3.4. Análise dos transformantes.....	26
2.3.5. Transformação e clonagem de genes.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. MICRORGANISMOS.....	33
3.1.1. Bactéria.....	33
3.1.2. Linhagens de <i>Aspergillus nidulans</i>	33
3.2. PLASMÍDIOS.....	36

3.3. SÍMBOLOS E FENÓTIPOS DOS MUTANTES DE <i>Aspergillus</i>	
<i>nidulans</i> ESTUDADOS NESTE TRABALHO.....	36
3.4. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES.....	37
3.4.1. Meio de Luria-Bertani (LB).....	37
3.4.2. Meio mínimo (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953).....	38
3.4.3. Meio de regeneração dos protoplastos.....	38
3.4.4. Meio completo (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953).....	38
3.4.5. Meio de acetato de amônia (APIRION, 1962).....	39
3.4.6. Meio mínimo galactose (ROBERTS, 1959).....	39
3.4.7. Solução de vitaminas.....	39
3.4.8. Solução de Tween 80 v/v 0,1%.....	39
3.4.9. Solução salina p/v 0,85%.....	40
3.4.10. Solução de Benlate (HASTIE, 1970).....	40
3.4.11. Suplementos adicionados ao meio mínimo.....	41
3.4.12. Solução de ampicilina.....	41
3.4.13. Enzimas.....	41
3.4.13.1. Lisozima.....	41
3.4.13.2. RNase.....	42
3.4.13.3. Enzimas de restrição.....	42
3.4.14. Tampão TE.....	42
3.4.15. Tampão TBE.....	42
3.4.16. Tampão TBE 0,5x.....	42
3.4.17. Tampão TAE 0,5x.....	42
3.4.18. Solução de SSC 20x.....	42
3.4.19. Estabilizadores osmóticos.....	43
3.4.19.1. Solução de sorbitol 1M, CaCl ₂ 50mM, Tris-HCl 10mM pH = 7,5.....	43
3.4.19.2. Solução de sorbitol 0,6M, Tris-HCl 10mM.....	43
3.4.19.3. Solução de MgSO ₄ 1,2M, pH=5,8.....	43
3.4.19.4. Solução estabilizadora para extração de plasmídios.....	43
3.4.19.5. Solução de KCL 0,6M, pH=5,8.....	44
3.4.20. Solução GMB (pulsed-field).....	44

3.4.21. Solução de NDS (pulsed-field).....	44
3.4.22. Solução de Denhardt.....	44
3.4.23. Solução para desnaturação do DNA em gel de agarose.....	44
3.4.24. Solução de neutralização do DNA em gel de agarose.....	45
3.4.25. Solução de lise - Triton X-100.....	45
3.4.26. Tampão de extração do DNA do fungo (técnica 1).....	45
3.4.27. Tampão de extração do DNA do fungo (técnica 2).....	45
3.4.28. Solução de acetato de potássio.....	45
3.4.29. Tampão de ligação (10x).....	46
3.4.30. Tampão STE.....	46
3.4.31. Tampão Klenow (10x).....	46
3.4.32. Tampão para reação de "random-primer" (10x).....	46
3.4.33. Tampão de corrida do DNA em gel de agarose (6x).....	46
3.4.34. Solução de hibridação.....	47
3.4.35. Soluções de lavagem das membranas após hibridação com material radioativo.....	47
3.4.35.1. Primeira lavagem.....	47
3.4.35.2. Segunda lavagem.....	47
3.4.35.3. Terceira lavagem.....	47
3.5. ESTERILIZAÇÃO E INCUBAÇÃO.....	47
3.5.1. Obtenção de protoplastos.....	48
3.5.1.1. Técnica 1 (BALLANCE & TURNER, 1985).....	48
3.5.1.2. Técnica 2 (YELTON <i>et alii</i> , 1985).....	48
3.5.2. Transformação.....	49
3.5.2.1. Técnica 1 (BALLANCE & TURNER, 1985).....	49
3.5.2.2. Técnica 2 (YELTON <i>et alii</i> , 1985).....	49
3.5.3. Estabilidade mitótica.....	50
3.5.4. Análise meiótica.....	50
3.5.5. Mapeamento pelo ciclo parassexual.....	51
3.5.5.1. Isolamento de diplóide.....	51
3.5.5.2. Análise mitótica.....	52
3.5.6. Extração do DNA total do fungo.....	52

3.5.6.1. Mini-extração (RAEDER & BRODA, 1985).....	52
3.5.6.2. Extração em grande escala.....	53
3.5.6.2.1. Técnica 1 (RAEDER & BRODA, 1985).....	53
3.5.6.2.2. Técnica 2 (SPECHT <i>et alii</i> , 1982).....	53
3.5.7. Extração do DNA plasmidial.....	54
3.5.7.1. Mini-extração.....	54
3.5.7.2. Extração em grande escala.....	55
3.5.8. Gradiente em cloreto de cério.....	55
3.5.9. Método "Freeze-squeeze" para recuperação de fragmentos de DNA do gel de agarose (TAUTZ & RENZ, 1983).....	56
3.5.10. Recuperação de plasmídios em <i>E.coli</i>	56
3.5.10.1. Utilização do DNA íntegro.....	56
3.5.10.2. Utilização do DNA clivado.....	57
3.5.11. Transformação de bactérias.....	57
3.5.12. Marcação das sondas de DNA.....	57
3.5.13. Hibridação.....	58
3.5.13.1 Southern blot.....	58
3.5.14. Preparação das inclusões de DNA em agarose para corrida de eletroforese em campo pulsado.....	59
3.5.15. Eletroforese em campo pulsado.....	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS "A" E "B" DE <i>A.nidulans</i> E SEUS VARIANTES POR ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO ('PULSED FIELD ELECTROPHORESIS).....	61
4.2. CARACTERIZAÇÃO DO DETERIORADO V17 de <i>A.nidulans</i>	69
4.3. CLONAGEM DO GENE <u>v17</u> de <i>A.nidulans</i>	74
4.3.1. Introdução da marca <u>argB</u> no deteriorado <u>v17</u>	76
4.3.2. Transformação da linhagem V17.3 com um banco genômico de <i>A.nidulans</i>	78
4.3.3. Análise do transformante TV17.3.....	80
4.3.4. Transformação de <i>E.coli</i> com o DNA total do transformante TV17.3	81

4.3.5. Análise dos transformantes obtidos com o plasmídio 3.....	85
4.3.6. Análise do plasmídio 3 de <i>A.nidulans</i>	91
5. CONCLUSÕES.....	97
BIBLIOGRAFIA.....	99

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 -Ciclo sexual de <i>Aspergillus nidulans</i> (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953)..	4
Figura 2 - Tipos de integrações de plasmídios observadas em <i>A.nidulans</i> :	
a) Integração homóloga - ocorre por meio de uma permuta simples que leva à integração de todo o plasmídio ao lado do gene estudado ; b) Integração heteróloga - ocorre por meio da integração do plasmídio em qualquer sítio no genoma não ligado ao gene em estudo ; c) substituição gênica: ocorre por meio de duas permutas , onde o gene presente no genoma da linhagem receptora é trocado pelo gene carregado pelo plasmídio.....	29
Figura 3 - Linhagens duplicadas "A" e "B" de <i>A.nidulans</i>	34
Figura 4 - Marcadores genéticos usados neste trabalho.....	35
Figura 5 - Gel de eletroforese em campo pulsado (CHEF) com cromossomos do fungo <i>A.nidulans</i> : a) tampão de corrida TBE 0,5x; b) tampão de corrida TAE 0,5x.....	63
Figura 6 - Cariótipos eletroforéticos de linhagens de <i>A.nidulans</i> :	
1) linhagem melhorada proveniente da linhagem "A";	
2) linhagem "A"; 3) linhagem "B"; 4) deteriorado V17;	
5) linhagem selvagem.....	66
Figura 7 - Cariótipos eletroforéticos de linhagens de <i>A.nidulans</i> :	
1) linhagem melhorada proveniente da linhagem "A";	
2) linhagem "A"; 3) linhagem "B"; 4) deteriorado V17;	
5) linhagem selvagem. Hibridação com os genes <u>wA</u> (a) e <u>uapA</u> (b) de <i>A.nidulans</i>	66
Figura 8 - Cariótipos eletroforéticos de linhagens deterioradas de <i>A.nidulans</i> : 1) linhagem selvagem; 2) deteriorado V17;	
3) deteriorado V5; 4) deteriorado V2; 5) deteriorado V3;	
6) linhagem selvagem.....	68
Figura 9 - Linhagens de <i>A.nidulans</i> : a) linhagem "A" com um setor melhorado; b) deteriorado V17.....	71

Figura 10 - Linhagens de <i>A.nidulans</i> : 1) linhagem "A" com um setor melhorado ; 2) setor melhorado amarelo da linhagem "A"; 3) mutante <u>fwA</u> ; 4) deteriorado V17; 5) duplo mutante <u>v17</u> ; <u>vA</u> ; 6) duplo mutante <u>v17</u> ; <u>fwA</u>	72
Figura 11 - Plasmídio pFB39 (BUXTON <i>et alii</i> , 1985) que é formado pelo vetor pUC8 e o gene <u>argB</u> de <i>A.nidulans</i> . Amp ^r : resistência à ampicilina.....	77
Figura 12 - DNA total das linhagens de <i>A.nidulans</i> , selvagem (1) e o transformante TV17.3, clivados com a enzima <i>XhoI</i> e hibridados com o plasmídio pUC8 (a) e pFB39 (b).....	81
Figura 13 - Padrões de restrição dos plasmídios recuperados após a transformação da bactéria <i>E.coli</i> com o DNA total do transformante TV17.3 clivado parcialmente com a enzima <i>HindIII</i> e religado. a) plasmídio pFB39; 1,2,3,4, e 5) plasmídios recuperados.....	83
Figura 14 - Tipos de integrações que podem provocar a manutenção do fenótipo V17 em linhagens transformada com o plasmídio que carrega este gene. a) permuta simples envolvendo o gene <u>v17</u> que é dividido em duas partes; b) permuta dupla envolvendo o gene <u>argB</u> . Neste caso <u>argB</u> ⁺ substitui <u>argB</u> ⁻ no cromossomo..	84
Figura 15 - Transformantes TVE (a) e TVI (b) de <i>A.nidulans</i>	86
Figura 16 - DNA total de linhagens de <i>A.nidulans</i> : 1 e 7 plasmídio 3; 2 e 8 linhagem selvagem; 3 e 9 mutante V17.3; 4 e 10 transformante TVI; 5 e 11 setor V17 do transformante TVI; 6 e 12 transformante TVE. Clivados com as enzimas <i>BamHI</i> (1 a 6) e <i>EcoRI</i> (7 a 12) e hibridados com o plasmídio 3.....	88
Figura 17 - Eletroforese em campo pulsado : 1) plasmídio 3; 2) mutante V17.3; 3) transformante TVI; 4) transformante TVE (Foto a). Hibridação (Foto b) com o plasmídio pUC8.....	91
Figura 18 - Plasmídio 3 e seus derivados (3.1 e 3.2), originados por meio de clivagens com a enzima <i>EcoRI</i> e ligação dos fragmentos.....	93
Figura 19 - Mapa de restrição do plasmído 3.1 que carrega o gene	

<u>v17</u> de <i>A.nidulans</i> com as enzimas de restrição <i>BamH1</i> (B), <i>EcoR1</i> (E) e <i>HindIII</i> (H).....	93
--	----

Figura 20 - Separação de cromossomos de linhagens de *A.nidulans* (a).

Canaletas: 1 - linhagem selvagem; 2-3 - linhagem "A";	
4 - linhagem melhorada; 5 - deteriorado V17; 6 - deteriorado	
V17.3; 7 - transformante TVI; 8 - transformante TVE;	
9 - linhagem selvagem. Hibridação com o fragmento	
<i>HindIII</i> do gene <u>v17</u> (b).....	95

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Cariótipos Eletroforéticos Determinados por PFGE.....	12
Tabela 2 - Análise mitótica dos segregantes do cruzamento do mutante <u>v17</u> com a linhagem "MSF"	73
Tabela 3 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem "MSF" com o deteriorado V17.....	74
Tabela 4 - Fenótipo dos segregantes da linhagem V17 com a linhagem <u>pvrG; argB</u> de <i>A.nidulans</i>	78
Tabela 5 - Número de transformantes da linhagem V17.3 de <i>A.nidulans</i> com o banco genômico construído no vetor pFB39.....	79
Tabela 6 - Porcentagem de colônias <u>v17</u> obtidas após a semeadura dos conídios dos transformantes TVE e TVI de <i>A.nidulans</i>	87
Tabela 7 - Porcentagem de segregantes <u>v17</u> obtidos após o cruzamento dos transformantes TVE e TVI com uma linhagem <u>argB; pvrG</u> (A.U.).	87

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CLONAGEM GÊNICA
EM *Aspergillus nidulans* PORTADOR DE DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA

Autora: MARISA VIEIRA DE QUEIROZ

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

O fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* tem sido bastante estudado pela genética clássica há vários anos, uma vez que apresenta, entre outras vantagens, um ciclo de vida que o torna particularmente interessante para análises genéticas e bioquímicas. Estes estudos resultaram na criação de um mapa genético distribuído em 8 grupos de ligação.

Linhagens de *A.nidulans* que apresentam um segmento cromossômico em duplicata são mitoticamente instáveis, elas produzem variantes fenotipicamente melhorados, após deleção dos segmentos duplicados, além de tipos morfologicamente deteriorados. Entre as linhagens com duplicações cromossômicas, destacam-se as denominadas "A" e "B" que carregam um segmento do grupo de ligação I duplicado e translocado para o grupo de ligação II, produzindo três tipos de setores: melhorados, deteriorados e heterocarióticos.

No presente trabalho as linhagens "A" e "B" de *A.nidulans* foram analisadas pela técnica de eletroforese em campo pulsado (CHEF). Foi observado que a duplicação cromossômica apresenta um tamanho em torno de 1Mb. A análise das bandas cromossômicas do variante melhorado confirmou a ocorrência de deleção do segmento duplicado. Nos variantes deteriorados estudados não foi observada presença de novas duplicações em "tandem".

O sistema de transformação foi usado para clonagem do gene v17, que condiciona o fenótipo deteriorado em *A.nidulans*, por complementação genética da mutação, com uma biblioteca construída em plasmídeo contendo fragmentos de DNA de uma linhagem selvagem. O mutante v17 surgiu espontaneamente na linhagem "B" de *A.nidulans*. Esta mutação induz uma atenuação na cor do conídio na linhagem verde e nos mutantes *yellow* e *fawn*. Esta mutação foi mapeada no grupo de ligação VII.

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND GENE CLONING IN
Aspergillus nidulans WITH CHROMOSOMIC DUPLICATION

Author: MARISA VIEIRA DE QUEIROZ

Adviser: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

The filamentous fungi *Aspergillus nidulans* has been studied from classical genetics technics over a number of years, because features of its life ciclo make it particularly amenable to biochemical and genetics analyses. These studies have resulted in a linkage map for *A.nidulans*, distributed over 8 linkage groups.

Strains of *A.nidulans* with a duplicate segment are mitotically unstable. They produced phenotypically improved variants following deletions in both duplicate segment, and morphologically deteriorated types. The strains "A" e "B" carry the segment of linkage group I duplicated and translocated to linkage group II producing three kinds of sectors: improved, deteriorated and heterokaryotic.

In the present work the strains "A" e "B" de *A.nidulans* were studied by pulsed field gel electrophoresis. It was observed that the size of the duplication is about 1Mb. Analyses of the chromosomal bands of the improved strain studied confirmed that the duplication is completely deleted. New duplications in tandem were not detected in the deteriorateds variants.

The transfoamation system was used to clone the v17 gene of *A.nidulans* by genetic complementation with a plasmid library containing DNA inserts from the wild type strain. This mutation was derivated spontaneously of the strains "B" of the *A.nidulans*. This mutation induced a colour atenuation in the green strain, and in *yellow* and *fawn* mutants and was located in linkage group VII.

1- INTRODUÇÃO

O fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* é um organismo ideal para estudos genéticos e moleculares. Ele apresenta um ciclo sexual bem definido, além dos ciclos parassexual e assexual, o que facilita a análise genética. O conhecimento da sua genética possibilita o estudo de aberrações cromossômicas, seu acompanhamento e mapeamento. Atualmente com o auxílio das técnicas da genética molecular, mutações cromossômicas puderam ser estudadas de uma maneira mais precisa.

Nos últimos anos a técnica de transformação vem sendo bastante utilizada neste organismo, com diversos propósitos como clonagem de genes e estudos relacionados com a estabilidade genética. A transformação é uma ferramenta fundamental na engenharia genética. Ela é rotineiramente utilizada em laboratórios de biologia molecular para isolamento e amplificação de genes em bactérias. No entanto, as bactérias, apesar de serem facilmente manipuladas em laboratório, são organismos procarióticos e não conseguem expressar corretamente muitos genes eucarióticos. Isto limita sua utilização na produção de proteínas de interesse industrial de origem eucariótica. Deste modo, os fungos filamentosos se apresentam como uma alternativa promissora para a produção destas proteínas. Nestes organismos a transformação começou a ser estudada em 1973, com o trabalho pioneiro de MISHRA & TATUM.

Diversas técnicas moleculares vêm sendo aplicadas em fungos filamentosos. Uma das mais recentes é a eletroforese em campo pulsado (pulsed field gel electrophoresis). A utilização desta técnica possibilita a análise dos cromossomos, pela visualização dos mesmos por meio de bandas em um gel,

permitindo assim o isolamento de cromossomos específicos e a construção do cariótipo eletroforético. Esta técnica permite a visualização de aberrações cromossômicas, determinação de sua extensão e mapeamento das mesmas. Além disso, pode-se determinar, sem a necessidade de uma análise genética mais demorada, a localização de um gene clonado. Esta técnica facilita também o mapeamento genético de fungos que não apresentam ciclo sexual.

Por todos esses motivos, este trabalho teve como objetivos:

- Estudar linhagens de *A.nidulans* com duplicações cromossômicas por meio da técnica de eletroforese em campo pulsado;
- Analisar o gene v17, por meio do mapeamento da mutação e cruzamento com outros mutantes que conferem diferentes tipos de pigmentação aos conídios;
- Clonar o gene v17 de *A.nidulans* pela transformação do mutante com um banco genômico de uma linhagem selvagem, recuperação do plasmídeo recombinante e análise dos transformantes.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- O FUNGO FILAMENTOSO *Aspergillus nidulans*

O ascomiceto *A.nidulans* apresenta um ciclo vegetativo concomitante com o ciclo sexual. Ele é homotático, e a germinação de um esporo vegetativo haplóide, o conídio, produz hifas septadas incolores com células multinucleadas. Algumas destas células (células podais) se diferenciam para formar uma haste multinucleada (o conidióforo) (PONTECORVO *et alii*, 1953). No ápice, o conidióforo forma uma vesícula, e esta origina os esterigmas, de onde os conídios saem em cadeias.

Usualmente são formados os cleistotécios, que resultam de um simples evento de fertilização. Dentro destes estão os ascósporos, que são o produto da meiose. Estes são liberados somente após o rompimento dos cleistotécios.

Um fenômeno bastante estudado é a heterocariose. Esta ocorre quando hifas do mesmo, ou de dois micélios, abrigam núcleos diferentes (PONTECORVO *et alii*, 1953). Duas linhagens auxotróficas que se complementam podem ser mantidas em associação heterocariótica, pela cultura em meio seletivo, podendo-se induzir o ciclo sexual e parassexual. A Figura 1 mostra o ciclo sexual em *A.nidulans*.

O ciclo parassexual em *A.nidulans* foi descoberto por PONTECORVO & ROPER (1952). Este ciclo ocorre a partir da heterocariose, constituindo-se num processo de recombinação genética fora do ciclo sexual.

A parassexualidade é uma alternativa para fungos que não apresentam o ciclo sexual. Ela se inicia pela fusão de núcleos no micélio heterocariótico, dando origem a diplóides. Estes podem sofrer haploidização originando colônias recombinantes.

Em *A.nidulans* , apesar da existência do ciclo sexual, o ciclo parassexual também tem sido bastante utilizado no mapeamento de genes.

Figura 1 - Ciclo sexual de *Aspergillus nidulans* (PONTECORVO et alii, 1953)

2.1.1 - Mutantes relacionados com a coloração do conídio

Aspergillus nidulans apresenta uma classe bastante interessante de mutantes que estão envolvidos em alterações na cor do conídio. PONTECORVO *et alii* (1953) demonstraram que estes mutantes eram autônomos em sua ação, isto é, a cor do conídio correspondia ao genótipo do núcleo que o continha. O conídio deste fungo contém em sua parede um pigmento verde que é produzido no conídio maduro (OLIVER, 1972). Este pigmento confere proteção à luz ultravioleta (WRIGHT & PATEMAN, 1970). A formação do pigmento do conídio requer a atividade de múltiplos genes, incluindo wA, yA e fwa (PONTECORVO *et alii*, 1953). O produto de outros genes (como, dilA, chaA drkA) modificam a quantidade de pigmento, suas propriedades químicas ou sua presença física na superfície do conídio (PONTECORVO *et alii*, 1953; CLUTTERBUCK 1974; 1977). O produto do gene wA parece mediar a síntese de um pigmento amarelo intermediário de um precursor incolor. No entanto, análises da ultraestrutura e bioquímica da parede do conídio em *A.nidulans* indicam que no mutante wA faltam alguns componentes da parede, presentes no conídio tipo selvagem (OLIVER, 1972; CLAVERIE-MARTIN *et alii*, 1988). Isto indica que possivelmente o produto do gene wA está envolvido na síntese de componentes estruturais da parede. Estes componentes poderiam ser necessários para deposição ou localização do pigmento verde maduro na mesma (LAW & TIMBERLAKE, 1980). O mutante wA produz conídios brancos e o mutante yA conídios amarelos, sendo wA epistático a yA.

A proteína codificada pelo gene yA foi purificada e caracterizada. Ela foi denominada lacase (CLUTTERBUCK, 1972). Em *A.nidulans* três outros loci são conhecidos que determinam a formação de conídios amarelos ou amarelados: *chartreuse* (chaA) (KAFFER, 1961), *yellow green* (ygA) (DORN, 1967; CLUTTERBUCK, 1968) e *yellow B* (yB) (KURTZ & CHAMPE, 1981). O locus yA é o locus estrutural para lacase e nenhuma atividade é observada neste mutante. Os mutantes *chartreuse* e *yellow-green* produzem conídios amarelados com pequena quantidade de lacase. O mutante yB é deficiente em lacase, mas esta deficiência deve ser provocada por alterações

no transporte e estocagem de cobre, que é necessário para a síntese ou estabilidade da enzima.

Outros mutantes para coloração como *fawn*, *whit* e *pale* devem apresentar somas normais de lacase, mas podem possuir alterações na quantidade ou qualidade do pigmento precursor. O mutante wA é epistático a todos os outros mutantes para coloração do conídio, devendo bloquear etapas prévias do padrão de pigmentação (KURTZ & CHAMPE, 1981).

Em 1989, O'HARA & TIMBERLAKE fizeram a caracterização molecular do locus yA. Foi observado que o gene yA codifica um mRNA que está presente em baixos níveis nas células vegetativas e conídios maduros, mas acumula-se em altos níveis em culturas em esporulação. Foi observado que a expressão de yA é regulada a nível de acúmulo de mRNA.

Outro gene de coloração de conídio, clonado recentemente, foi o wA (MAYORGA & TIMBERLACK, 1990; TILBURN *et alii*, 1990). Os resultados mostraram que wA codifica um grande transcrito poliadenilado, capaz de codificar uma proteína de acima de 250kDa. O transcrito de wA não é detectado em células vegetativas, acumulando-se durante a conidiação e está ausente em conídios maduros.

2.1.2-Duplicações cromossômicas em *A.nidulans*

O estudo das duplicações cromossômicas e seus efeitos em *A.nidulans* teve início com o trabalho de BAINBRIDGE & ROPER (1966). Eles descreveram um processo novo e espontâneo que dava origem a alterações quantitativas no genoma 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 translocação não-recíproca. Estes segregantes apresentavam reduzido crescimento linear e foram designados "crinkled". Vários mecanismos foram sugeridos para explicar a instabilidade mitótica em linhagens com duplicações, entre eles: perda terminal, mutação e permuta mitótica. Foi dada ênfase à permuta

desigual entre cromátides irmãs durante a mitose, se somente um mecanismo fosse o responsável.

Uma das duplicações mais interessantes encontrada em *A.nidulans*, foi a que envolvia os grupos de ligação I e II. NGA & ROPER (1968) descreveram uma linhagem de *A.nidulans* que apresentava parte do grupo de ligação I duplicado e translocado para o cromossomo II. Esta linhagem era instável e apresentava três tipos de setores: melhorados, deteriorados e heterocarióticos. Os setores melhorados surgiam em decorrência da perda de todo ou de parte do segmento em duplicata. Esta perda podia ser observada fenotipicamente pelo seu crescimento, em relação a linhagem original e também devido à presença do gene $\underline{yA}$ na duplicação que produzia setores amarelos, sendo a linhagem original verde. O segundo tipo de setor, o deteriorado, se originava de novas duplicações em "tandem", ou pela transposição de parte do segmento duplicado. Os setores heterocarióticos possuíam uma mistura de núcleos com e sem duplicação.

AZEVEDO & ROPER (1970) e AZEVEDO (1971) estudaram os setores deteriorados de linhagens de *A.nidulans* com duplicações cromossômicas. Foi observada que a frequência destes deteriorados era de um a cada dez colônias com duplicações. A análise de 31 setores deteriorados obtidos com as linhagens designadas "A" e "B", por meio do ciclo sexual e parassexual, revelou que podiam ser distinguidos quatro grupos de deteriorados:

- a) Deteriorados cujo determinante de deterioração estava associado com perdas no grupo de ligação I;
- b) Deteriorados cujo determinante de deterioração estava localizado no segmento translocado;
- c) Deteriorados com determinantes de deterioração em outros grupos de ligação, que não estavam envolvidos na duplicação;
- d) Setores tão instáveis que não foram passíveis de análise genética.

MENEZES (1978) analisou a ocorrência de reversão em linhagens deterioradas provenientes da linhagem "A". Foi observado que a maior parte das reversões ocorreram devido à presença de supressores.

LIEBER (1976) observou uma possível interação existente entre duplicações cromossômicas presentes em uma mesma linhagem de *A.nidulans*. Quando uma duplicação no grupo de ligação I estava presente com uma duplicação no grupo de ligação III, ocorrência de deleções na duplicação do grupo de ligação III levava a deleções em secções particulares do grupo de ligação I.

BARROS (1977) fez a análise citológica de linhagens de *A.nidulans* com duplicações cromossômicas. Ele observou que os núcleos presentes nos conídios da linhagem "A" possuíam o diâmetro médio maior que os da linhagem haplóide balanceada. Além disso, foi concluído que o setor melhorado perde o material genético adicional, uma vez que ele apresenta o diâmetro médio dos núcleos igual ao da linhagem haplóide.

GABRIELLI & AZEVEDO (1980) estudaram um deteriorado que produzia uma alta frequência de dissômicos. Este deteriorado designado V8 produzia uma porcentagem de dissômicos 20-35 vezes maior que o controle. Foi concluído que o gene v8, localizado no cromossomo III era o responsável pela alta frequência de não disjunção durante a mitose. Variações na temperatura e no pH não alteraram a frequência de dissômicos, mas esta foi aumentada pela idade dos conídios.

MOLINA & AZEVEDO (1989) demonstraram que variantes deteriorados quando colocados para crescer em presença de um estabilizador osmótico, se comportavam como fenocópias de colônias normais. Foi sugerido que o fenótipo deteriorado estaria relacionado com alterações na membrana plasmática e que a presença do estabilizador osmótico permitiria a absorção de algum nutriente, o que possibilitaria o desenvolvimento normal do fungo.

MONTEIRO & PIZZIRANI-KLEINER (1991) estudaram os produtos de fusão citoplasmática de protoplastos das linhagens "MSE" e deteriorado V94, com o objetivo de recuperar colônias que apresentassem fenótipo deteriorado e marcadores genéticos da linhagem "MSE". Isto poderia indicar uma transferência do caráter deteriorado via fusão citoplasmática de protoplastos. De 541 produtos de fusão analisados, foi encontrada uma colônia que apresentava estas características. Por meio do cruzamento com uma linhagem haplóide estável, foi feita a análise genética e o determinante de deterioração foi localizado no grupo de ligação III.

Vários fenômenos observados em linhagens com duplicações cromossômicas não foram completamente elucidados. Não se podia determinar exatamente qual a extensão destas duplicações e das deleções ocorridas nelas, nem como surgiam os setores deteriorados, que eram mapeados em grupos de ligação distintos dos envolvidos na duplicação. Foi sugerida a existência de um elemento genético móvel, mas este elemento jamais foi isolado e o estudo ficou limitado somente a análise genética clássica, necessitando de uma análise a nível molecular.

2.2- ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS)

Até recentemente, fazer o mapa genético de um microrganismo e determinar seu número de cromossomos, era uma tarefa cansativa e demorada. Este trabalho se tornava mais fácil quando o organismo apresentava um ciclo sexual e permitia a fácil obtenção de mutantes. No entanto, muitos dos microrganismos de interesse industrial não apresentam ciclo sexual e em muitos casos a obtenção de mutantes não é uma tarefa fácil. Uma alternativa seria a observação dos cromossomos por microscopia óptica, mas isto também é um pouco complicado em microrganismos, especialmente em fungos, devido ao pequeno tamanho dos seus cromossomos.

Atualmente, uma nova técnica vem sendo utilizada para separação dos cromossomos e determinação do seu peso molecular. Esta técnica designada eletroforese em campo pulsado (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) consiste em submeter os cromossomos intactos a campo elétrico alternado em uma matriz de agarose. Os cromossomos intactos migram através do gel com uma velocidade dependente do seu tamanho e da sua estrutura tridimensional. Isto resulta na resolução do genoma em bandas cromossomais, ou seja, um "cariótipo eletroforético" (SKINNER *et alii*, 1991). Para separar grandes moléculas, as propriedades físicas do DNA foram analisadas e exploradas. Em resumo, o princípio é o seguinte (LAI *et alii*, 1989) : quando um campo elétrico é aplicado em um gel, as moléculas de DNA alongam-se na

direção do campo e migram no gel. O primeiro campo elétrico é então removido e um segundo campo é ativado. O DNA em espiral pode alterar sua conformação, reorientar-se e migrar na direção do segundo campo elétrico. O tempo requerido para essa reorientação é dependente do peso molecular. Grandes moléculas levam mais tempo para realinhar-se. Desta maneira moléculas grandes gastam uma grande parte de cada ciclo reorientando-se enquanto que pequenas moléculas reorientam-se mais rapidamente.

As primeiras demonstrações foram feitas por SCHWARTZ & CANTOR (1984) que separaram os cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae* usando dois campos elétricos pulsados, um homogêneo e um não homogêneo. Um equipamento semelhante foi empregado por CARLE & OLSON (1984) que era formado por dois campos elétricos não homogêneos (OFAGE). Como os campos elétricos não eram uniformes e o ângulo entre eles variava através do gel, as moléculas de DNA migravam em diferentes proporções dependendo de sua localização no gel. Foram feitos, utilizando-se este sistema, os cariótipos eletroforéticos de *S.cerevisiae* (CARLE & OLSON, 1984; CARLE *et alii*, 1986); *Candida* spp. (MAGEE & MAGEE, 1987); e *Ustilago maydis* (KINSCHERF & LEONG, 1988). GARDINER *et alii* (1986) modificaram este sistema orientando o campo elétrico transversalmente no gel (TAFE). O ângulo entre os campos elétricos variava da superfície superior à superfície inferior do gel. Este sistema produziu os cariótipos eletroforéticos de *S.cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* (GARDINER & PATTERSON, 1988; STEWART *et alii*, 1988) e *Cephalosporium acremonium* (SKATRUD & QUEENER, 1989).

CARLE *et alii* (1986) demonstraram que grandes moléculas de DNA poderiam ser separadas com a simples geometria dos eletrodos invertendo periodicamente um campo elétrico uniforme em uma dimensão (usando um ângulo de reorientação de 180°). Este sistema foi chamado FIGE. Este processo produziu melhor resolução para moléculas menores que 750 kb que todos os outros métodos. Neste período muitas modificações foram feitas, mas a de maior importância foi feita por CHU *et alii* (1986) que usaram os princípios da eletrostática para calcular as voltagens necessárias para gerar campos elétricos homogêneos usando múltiplos eletrodos arranjados de uma forma hexagonal. Este sistema (CHEF) é constituído de 24 eletrodos, que oferecem ângulos de reorientação de 60° ou 120°. Segundo PIZZIRANI-KLEINER &

AZEVEDO (1989) uma das vantagens deste sistema (CHEF) é que o padrão de separação é independente da posição no gel, de modo que as bandas de DNA ficam em ordem linear. O sistema CHEF tem sido usado para desenvolvimento do cariótipo de *Aspergillus nidulans* (BRODY & CARBON, 1989); *S.pombe* e *Histoplasma capsulatum* (STEELE *et alii*, 1989); *Candida albicans* (MAGEE *et alii*, 1988); *Neurospora crassa* (ORBACH *et alii*, 1988); *Phytophthora megasperma* (HOWLETT, 1989); *Colletotrichum gloeosporoides* (MANSEL *et alii*, 1990), etc. Bons resultados também foram obtidos com os sistemas: "crossed field" (SOUTHERN *et alii*, 1987); e "rotating gel electrophoresis" (SERWER, 1987). Estes sistemas usam um simples campo elétrico homogêneo e alteram a orientação do campo elétrico em relação ao gel por rotação descontínua e periódica do gel. Um outro sistema descrito foi o PHOGE (BANCROFT & WOLK, 1988). Este sistema utiliza um ângulo de reorientação de 90° mas o DNA sofre quatro reorientações por ciclo (LAI *et alii*, 1989).

O sistema de eletroforese PACE (Programmable, Autonomously Controlled Electrodes) oferece um controle preciso sobre todos os parâmetros do campo elétrico por regulação independente das voltagens nos 24 eletrodos arranjados em um contorno fechado. Este sistema tem sido usado para separar fragmentos de 100pb a mais que 6mb. A capacidade de reorientar o ângulo entre os campos alternados permitiu um melhoramento na separação de grandes moléculas de DNA (LAI *et alii*, 1989).

A Tabela 1 mostra exemplos de cariótipos eletroforéticos de fungos já publicados (SKINNER *et alii*, 1991).

Tabela 1- Cariótipos Eletroforéticos Determinados por PFGE

Gêneros e espécies	Número haplóide de cromossomo	Tamanho (Mb)	Referência
<i>Aspergillus nidulans</i>	8	2,9-5,0	BRODY & CARBON, 1989
<i>Candida albicans</i>	7	1,1-2,2	MAGEE & MAGEE, 1987
<i>Candida stellatoidea</i>	9	-	MAGEE & MAGEE, 1987
<i>Candida glabrata</i>	10	-	MAGEE & MAGEE, 1987
<i>Candida guilliermondii</i>	6	-	MAGEE & MAGEE, 1987
<i>Cephalosporium acremonium</i>	8	2,9-5,0	SKATRUD & QUEENER, 1989
<i>Colletotricum gloeosporoides</i>			MASEL <i>et alii.</i> , 1990.
tipo A	5	2,0-6,0	
tipo B	3	4,7-6,0	
<i>Histoplasma capsulatum</i>	7	2,0-5,7	STEELE <i>et alii.</i> , 1989
<i>Magnaporthe grisea</i>	6	3,4-9,5	SKINNER <i>et alii.</i> , 1990
<i>Neurospora crassa</i>	7	4,0-12,6	ORBACH <i>et alii.</i> , 1988
<i>Phanaerochaete chrysosporium</i>	7	2,0-4,8	CULLEN, 1990
<i>Phytophthora megasperma</i>	13-14	1,4-?	HOWLETT, 1989
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15	0,24-2,2	CHU <i>et alii.</i> , 1986
<i>Saccharomyces uvarum</i>	14-15	0,2-,0	JARGE & PHILIPPSEN, 1989
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3	3,0-9,0	SMITH <i>et alii.</i> , 1987
<i>Ustilago hordei</i>	15-19	0,17-3,15	McCLUSKEY & MILLS, 1990
<i>Ustilago maydis</i>	20	0,3- 2,0	KINSCHERF & LEONG, 1988

2.2.1-Preparação das amostras

A preparação das amostras envolve geralmente a retirada da parede celular e/ou membranas por meio de digestão enzimática e de todas as proteínas. São, em geral, usados métodos diferentes para leveduras e fungos filamentosos. No entanto, um fator essencial em todos os procedimentos é a manutenção de largas moléculas de DNA intactas. Em fungos filamentosos são feitos inicialmente protoplastos, que são posteriormente embebidos em agarose e tratados com detergentes e enzimas proteolíticas a altas temperaturas.

Trabalhos recentes indicam que a protoplastização (McCLUSKEY & MILLS, 1990), as enzimas proteolíticas e as altas temperaturas (MIAO & VAN ETTEN, 1990) não são necessariamente importantes.

2.2.2- Parâmetros essenciais

A proporção de migração das moléculas de DNA em um gel de agarose é dependente do tempo de pulso, voltagem, do ângulo do pulso e do tempo de corrida. Segundo LAI *et alii* (1989) o mais importante determinante de mobilidade na eletroforese em campo pulsado é o intervalo em que a direção do campo elétrico é modificada. Foi observado que maiores intervalos são requeridos para separar grandes fragmentos de DNA, pois o tempo de reorientação é tamanho-dependente. Desta maneira, a escolha do tempo de intervalo para eletroforese em campo pulsado irá depender do tamanho dos fragmentos a serem separados. Também a voltagem deve ser variada de acordo com o tamanho dos fragmentos. Quando são usadas moléculas de até um megabase, gradientes de voltagem de 6-10V/cm podem ser usados. No entanto, a resolução de moléculas maiores requer a redução do gradiente de voltagem.

A concentração da agarose, bem como o tipo, também afeta a separação dos fragmentos em eletroforese em campo pulsado. Rápidas migrações ocorrem em géis de agarose de baixa concentração. A temperatura

também possui um grande efeito na mobilidade do DNA. As temperaturas entre 14°C e 22°C são as que produzem melhores resultados. A eletroforese pode ser realizada a temperatura ambiente, mas é necessário um sistema de refrigeração do tampão de corrida. Outro fator importante é o ângulo de reorientação. A maior parte dos aparelhos utilizam ângulos fixos de 120° entre os campos pulsados.

A eletroforese em campo pulsado tem sido usada com diversos propósitos, não só para a separação eficiente dos cromossomos de microrganismos, mas para o mapeamento de genes, identificação de aberrações cromossômicas, construção de bancos genômicos de cromossomos específicos, etc.

2.2.3 - Utilização da técnica de eletroforese em campo pulsado em fungos

A técnica de eletroforese em campo pulsado tem sido usada com diversos propósitos. Entre estes, merecem destaque a caracterização de fungos por meio do cariótipo eletroforético e a construção de bancos genômicos de cromossomos específicos.

MAGGEE & MAGGEE (1987) estudaram cinco isolados de *Candida albicans* e demonstraram que nenhum deles possuía o mesmo cariótipo. Polimorfismos deste tipo, provocados por translocações, têm sido descritos em *S.cerevisiae* (SCHWARTZ & CANTOR, 1984); *N.crassa* (ORBACH *et alii*, 1988); *U. maydis* (KINSCHERF & LEONG, 1988) e *A.nidulans* (BRODY & CARBON, 1989).

Recentemente, cromossomos supernumerários ou cromossomos "B" começaram a ser detectados em fungos. Este tipo de cromossomo não é necessário para a sobrevivência do organismo e é bastante comum em plantas e animais. Eles foram detectados nos seguintes fungos: *Nectria haematococca* (MIAO, 1990); *Magnoportha grisea* (ORBACH, 1989); *S.pombe* (NIWA *et alii*, 1986) e *C.gloeosporoides* (MANSEL *et alii*, 1990).

Segundo SKINNER *et alii* (1990) dois patótipos de *C.gloeosporoides* atacam *Stylosanthes* (planta forrageira). O cariótipo de isolados dos dois tipos são diferentes (Tabela 1), apresentando cromossomos grandes em um tamanho constante (> 2Mb) e um número variável de "mini-

cromossomos", menores que 0,6Mb (MANSEL *et alii*, 1990). No fungo *M.grisea* os isolados de campo apresentam 1 - 4 pequenos cromossomos que possuem um tamanho médio de 0,9 - 2,0 Mb (ORBACH, 1989). No entanto, estes cromossomos estão ausentes em linhagens de laboratório. Nenhum gene funcional foi detectado nos cromossomos supernumerários de *M.grisea* e *C.gloeosporoides*.

O gene da pisatina dimetilase (Pda) de *Nectria haematococca*, que está envolvido na patogenicidade deste fungo, está localizado em um cromossomo de 1,6 Mb. Isolados que não apresentam este cromossomo não são patogênicos, mas são viáveis. Isto demonstra que este cromossomo não é essencial para a sobrevivência deste organismo. Um outro gene envolvido na patogenicidade, mak_1, também foi localizado neste cromossomo (MIAO, 1990).

A técnica de eletroforese em campo pulsado possibilita a construção de bancos genômicos de cromossomos específicos. Cromossomos separados em gel de agarose podem ser cortados deste gel, clivados com uma enzima de restrição específica, produzindo fragmentos de 2-10 Kb, e ligados a um vetor plasmídial. Deste modo, é possível a construção de um banco genômico de um único cromossomo. Esta técnica também pode ser usada para a organização, por cromossomos, de bibliotecas já construídas. BRODY *et alii* (1991) classificaram os clones de bibliotecas genômicas de *A.nidulans*, construídas em cosmídios, por cromossomo. Isto foi possível por meio da hibridação de cada cromossomo com os clones dos bancos genômicos e a separação dos clones de acordo com o sinal de hibridação obtido. Os oito cromossomos de *A.nidulans* foram separados pela eletroforese em campo pulsado e hibridados separadamente com filtros contendo as bibliotecas. Desta maneira, os clones foram classificados em subgrupos, de acordo com o cromossomo a que pertenciam.

STRINGER *et alii* (1991) usaram a técnica de eletroforese em campo pulsado para localizar o gene rodA, que havia sido clonado, mas não se tinha uma idéia da sua localização. Foi feita a separação dos cromossomos de uma linhagem de *A.nidulans* e a hibridação destes com o gene rodA. Foi demonstrado que este gene hibridava com o cromossomo III de *A.nidulans*.

Esta técnica também pode ser usada para determinar a distância física entre duas marcas geneticamente ligadas, ou determinar o tamanho de genes repetidos em "tandem". Isto é feito por meio da digestão do DNA com

enzimas que cortam em sítios raros, separação dos fragmentos em eletroforese em campo pulsado e hibridação com marcas que estão geneticamente ligadas. Este mapeamento pode ser bastante melhorado com a utilização de várias enzimas de restrição e de digestões parciais (SKINNER *et alii*, 1991).

A utilização da eletroforese em campo pulsado está possibilitando um rápido avanço no conhecimento da diversidade genética a nível cromossômico em fungos. A detecção de translocações e variações no número de cromossomos se tornou, com a utilização desta técnica, um processo simples e rápido. Desta maneira, genes clonados podem ter sua localização cromossômica determinada, sem a necessidade de cruzamentos e testes de progênie (STRINGER *et alii*, 1991).

2.3- TRANSFORMAÇÃO EM FUNGOS FILAMENTOSOS

A técnica de transformação começou a ser utilizada em fungos filamentosos por volta da década de 70, com o fungo *Neurospora crassa* (MISHRA & TATUM, 1973; MISHRA *et alii*, 1973; MISHRA, 1977, 1979).

No início, era utilizado o DNA total nas transformações e os transformantes eram detectados por métodos simples de complementação, onde não era demonstrada a presença física do DNA doador e a frequência de transformação era muito baixa. CASE *et alii* (1979), demonstraram que a eficiência da transformação em *N. crassa* poderia ser aumentada pela utilização de um plasmídeo como vetor, o que permitiria o enriquecimento do DNA a ser introduzido. Além disso, com a utilização da técnica do Southern blot, pôde-se comprovar a presença do DNA doador no hospedeiro e deduzir o tipo de integração ocorrido.

Desde então, as técnicas de transformação têm sido modificadas e adaptadas para cada microrganismo e alguns parâmetros mostraram ter substancial importância para obtenção de um maior número de transformantes.

2.3.1- Parâmetros essenciais

O tipo de célula utilizada na obtenção dos transformantes em fungos filamentosos é bastante variável. A parede celular funciona como uma barreira física, tornando necessária a sua retirada, isto é, a obtenção de protoplastos. Estes podem ser obtidos tanto do micélio do fungo, como também dos conídios.

O micélio é mais comumente usado para a obtenção dos protoplastos (BALLANCE & TURNER, 1985; TILBURN *et alii*, 1990), mas estes são geralmente multinucleados, levando a produção de heterocários após a transformação. BOS & SLAKHORST (1981) descreveram uma técnica bastante eficiente para a obtenção de protoplastos de conídios em *A.nidulans*, pois como estes possuem apenas um núcleo, a grande maioria dos protoplastos seria também uninucleada, facilitando seu isolamento e purificação. No entanto, é necessário um pré-tratamento dos conídios, tornando assim a técnica de obtenção dos protoplastos mais longa. CALMELS *et alii* (1991) obtiveram uma alta eficiência de transformação de conidiósporos do fungo *Polypocladium geodes*, após um tratamento enzimático moderado. Uma outra alternativa seria a utilização de conídios germinados, que estariam mais sensíveis a enzima lítica (CHAKRABORTY *et alii*, 1991). Atualmente, em *A.nidulans*, a técnica mais utilizada é a obtenção de protoplastos de micélio, embora seja necessária a purificação por meio de colônias monospóricas após a transformação. Este é o método mais rápido e eficiente neste organismo.

Em *Neurospora*, geralmente são utilizados macroconídios germinados para obtenção dos protoplastos. ROSSIER *et alii* (1985), usaram uma linhagem "fluffy" de *N.crassa*, que produzia apenas microconídios uninucleados para transformação. Isto permitiu a obtenção de produtos isolados. Em espécies que não produzem conídios, como *Podospora anserina*, o micélio é a única alternativa para a obtenção dos mesmos (BEGUERET *et alii*, 1984). Em alguns basidiomicetos como o fungo *Coprinus cinereus*, são utilizados oóides na obtenção das células competentes (BENNINGER *et alii*, 1987; CASSELTON & HERCE, 1989).

Para a obtenção dos protoplastos é necessária a utilização de uma enzima lítica. O tipo de enzima usada vai depender da constituição da parede do fungo, mas algumas enzimas comerciais merecem especial destaque. Nesta classe está a enzima Novozym 234, que é uma preparação enzimática do fungo *Trichoderma viride* e contém uma mistura de enzimas hidrolíticas. TILBURN *et alii* (1983) usaram uma mistura de Novozym 234 e helicase para a obtenção de protoplastos para transformação de *A.nidulans*. OAKLEY *et alii* (1987) protoplastizaram conídios germinados de *A.nidulans* com uma mistura de Driselase, Novozyme 234 e β -glucoronidase.

Alguns laboratórios preferem trabalhar com enzimas mais bem definidas, como uma mistura de quitinase e celulase (BENNINGER *et alii*, 1987). Em *P. anserina* foi utilizada uma mistura de zimoliase e citohelicase (BEGUERET *et alii*, 1984). WERNARDS *et alii* (1985) observaram que a frequência de transformação aumentou em *C. cinereus*, quando os oídeos foram tratados com celulase Onozuka e quitinase para a obtenção dos protoplastos. Existe uma grande variação entre os diversos laboratórios quanto à enzima lítica utilizada. Sem dúvida, a enzima lítica Novozym 234 é a mais frequente, tendo-se mostrado bastante eficiente em diversas espécies de fungos filamentosos.

A quantidade de enzima utilizada e o tempo de exposição à mesma, varia amplamente de organismo para organismo, e mesmo dentro de uma única espécie, como *A.nidulans*, há variações entre os diversos laboratórios. Segundo FINCHAM (1989), um fator que pode influenciar a eficiência da transformação é o lote da enzima utilizado. CASE *et alii* (1979), demonstraram que a frequência de transformação de esferoplastos de conídios de *Neurospora* variava de acordo com o lote e a idade da gluculase. Também um lote de Novozym 234 foi identificado como particularmente interessante para a obtenção de protoplastos para transformação de *N.crassa* (AKINS & LAMBOWITZ, 1985). No entanto, este fato não está bem esclarecido.

O estabilizador osmótico é outro fator extremamente importante para a obtenção de protoplastos. Em *A.nidulans* os mais utilizados são: KCl 0,6M, MgSO₄ (0,6M-1,2M) e sorbitol (0,6M, 1M e 1,2M) (TILBURN *et alii*, 1983; OAKLEY *et alii*, 1987). Em muitos casos, são usados estabilizadores diferentes no mesmo experimento de transformação, como por exemplo, KCl 0,6M para a obtenção dos protoplastos, sorbitol 1M para a lavagem dos mesmos e sacarose 1M para a

regeneração. O tipo de estabilizador osmótico, como também sua molaridade variam amplamente de fungo para fungo, como também de laboratório para laboratório.

Um dos problemas encontrados quando se tenta estabelecer uma técnica de transformação é a reprodução exata da frequência de transformação. Isto porque esta frequência pode variar muito de experimento para experimento, e isto se deve, em parte, à preparação dos protoplastos. Para solucionar este problema, foi desenvolvido um método para estocar os protoplastos em presença de dimetil sulfoxido a -70°C . Esta técnica permite o uso da mesma preparação de protoplastos em sucessivos experimentos de transformação (CASE *et alii*, 1979).

Outros componentes essenciais na transformação são os íons cálcio e o polietilenoglicol (PEG), que é um agente fusogênico. A concentração de cálcio varia de 10-50 mM. O tempo de exposição, como também a concentração de PEG varia profundamente nos diversos protocolos. BALLANCE & TURNER(1985) utilizaram 25% de PEG 6000 e 50mM de CaCl_2 para transformar *A.nidulans*. WERNARDS *et alii* (1985), usaram 60% de PEG 6000 e 10mM de CaCl_2 para transformar o mesmo organismo. Heparina (0,05-0,1mg/ml) e espermidina (1mM) também foram usadas por CASE *et alii* (1979) para aumentar a frequência de transformação. Segundo PUNT & VAN DEN HONDEL (1993), a adição de 10-20mM do ácido aurínico tricarbóxico (inibidor de DNase) resulta em um aumento de 2-4 vezes na frequência final de transformação.

RADFORD *et alii* (1981) descreveram a transformação de *N.crassa* com DNA encapsulado em lipossomos e posterior fusão com protoplastos. No entanto, este método não se mostrou superior aos demais descritos.

Um método alternativo para a obtenção de células competentes foi descrito por DHAWALE *et alii* (1984). Neste método conídios germinados foram tratados com acetato de lítio. Esta metodologia foi baseada no trabalho de ITO *et alii* (1983), que reportaram a transformação de células intactas de leveduras com cátions alcalinos, tais como Li^+ , Cs^+ , Rb^+ , K^+ e Na^+ . BEJ & PERLIN(1989) transformaram o basidiomiceto fitopatogênico *Ustilago violacea*,

usando uma mistura de PEG e acetato de lítio. O método foi bastante eficiente neste organismo.

Como tampões nos experimentos de transformação são geralmente usados 10mM de tris-HCl (pH-7,5-8,0) ou 10mM de MOPS (pH-6,0).

BERGES & BARREAU(1989) desenvolveram um método de transformação em *P.anserina*, baseado na aplicação de um choque térmico a 48°C, durante 5 minutos. O aumento da competência foi observado imediatamente após o choque. O tratamento foi aplicado antes da adição do DNA e não provocou nenhum efeito quando aplicado depois da adição do mesmo. As células permaneceram competentes 20 a 30 minutos após o choque.

GOLDMAN *et alii* (1990) utilizaram o método de eletroporação para transformar *Trichoderma harzianum*. A frequência de transformação foi de 400 transformantes/ μ g de DNA e eles foram 100% estáveis. CHAKRABARTY *et alii* (1991) usaram também eletroporação para transformar conídios germinados de *N.crassa*, neste caso um pré-tratamento do conídio com β -glucuronidase mostrou ser essencial.

2.3.2- Vetores

Os vetores são veículos de clonagem que desempenham papel fundamental na engenharia genética. Eles devem ser capazes de amplificar o material genético em estudo e devem possuir marcas seletivas que possibilitem sua detecção e recuperação. Os vetores mais utilizados para transformação de fungos filamentosos são os plasmídios. Existem poucas descrições de vetores com replicação autônoma nestes organismos, e em geral, eles se mantêm no microrganismo devido à integração.

Segundo MISHRA(1985) esses vetores foram inicialmente desenvolvidos devido ao seu pequeno tamanho, replicação em bactérias e caracteres facilmente identificáveis. A utilização de plasmídios para transformação em fungos filamentosos foi descrita pela primeira vez por CASE *et alii* (1979) usando o plasmídio pUK88 de *E.coli* com o gene que codifica a dehidroquinase catabólica proveniente de *N.crassa*

Tem sido feito um grande esforço para identificar sequências análogas as "ARS" de leveduras em fungos filamentosos, uma vez que estas sequências, além de conferir autoduplicação ao plasmídio aumentam a eficiência da transformação. Em fungos filamentosos, como já mencionado, os plasmídios se mantêm, em geral, devido à sua integração nos cromossomos. O isolamento de origens de autoreplicação facilitaria a clonagem de genes no próprio fungo. Nos últimos anos, várias "ARS" vem sendo isoladas e espera-se que em um curto espaço de tempo seja possível realizar este tipo de clonagem.

STOHL & LAMBOWITZ (1983) construíram um plasmídio que continha o gene qa^{2+} de *N.crassa* e um plasmídio mitocondrial de *N.intermedia*. Eles mostraram que este plasmídio provocava um aumento de 5-10 vezes na frequência de transformação em relação aos outros plasmídios. BUXTON & RADFORD (1984) ensaiaram um banco de 700 clones por transformação em *N.crassa*. Eles selecionaram plasmídios com alta frequência de transformação. Era esperado o isolamento de sequências que permitissem a autoduplicação do plasmídio. Quatro plasmídios foram selecionados com alta frequência de transformação, mas nenhum deles continha a origem de replicação.

Segundo FINCHAM (1989) o melhoramento da frequência de transformação em *N.crassa* não é um critério sensível para a detecção de "ARS". Contudo, existem evidências que sugerem que muitos fragmentos genômicos deste fungo conferem autonomia limitada aos plasmídios que os carregam.

Existe um tipo especial de transformante chamado "abortivo", que é incapaz de manter o caráter transformado pelo crescimento vegetativo. É provável que isso ocorra devido à replicação do plasmídio fora do DNA cromossomal, estando sujeito à perda frequente.

BALLANCE & TURNER (1985) demonstraram que a eficiência da transformação em *A.nidulans*, com o gene pyr4 de *N.crassa*, podia ser aumentada pela inclusão no vetor de uma sequência de *A.nidulans* de 3,5 Kb. Esta sequência foi isolada devido a sua capacidade de conferir autoduplicação ao plasmídio em levedura, mas não existiu nenhuma evidência dessa atividade em *A.nidulans*. Parte da "ANS I", como ela foi denominada, parece ser reintegrada ao genoma do fungo. Foi demonstrado que os vetores integrativos

não dependiam de nenhuma grande homologia com a sequência do cromossomo hospedeiro.

CULLEN *et alii* (1987) mostraram que esta sequência também aumentou a frequência de transformação em vetores com os genes argB e trpC. As evidências sugerem que o mecanismo que controla a atividade da "ANS I" não envolve eventos recombinatórios homólogos. Apesar da existência de múltiplas regiões de homologia com o genoma de *A.nidulans*, a "ANS I" foi mapeada próxima ao centrômero no grupo de ligação I de *A.nidulans*.

BARNES & MACDONALD (1986) transformaram um mutante pvrG de *A.nidulans* com o plasmídio pDJB 1, que é derivado do pBR325 pela inserção do gene pvr4 de *N.crassa*. Neste plasmídio eles inseriram uma sequência de *A.nidulans* que funcionava como "ARS" em levedura. Pela análise dos transformantes os autores concluíram que o pDJB 1 e seus derivados recuperados em *E.coli* podiam se autoduplicar em *A.nidulans*. Foi observado também que os plasmídios podiam sofrer rearranjos quando introduzidos no fungo.

Esses rearranjos também haviam sido observados por KUIPER & DE VRIES (1985), que construíram um plasmídio recombinante, pMK2, que consistia do plasmídio mitocondrial de *N.intermedia* La Belle, uma parte do agregado gênico qa de *N.crassa* e o plasmídio pBR322. A região La Belle aumentou a frequência de transformação cinco vezes. A análise do DNA dos transformantes mostrou que este plasmídio não era estável, podendo sofrer rearranjos como perdas e inserções. Foram recuperados frequentemente dímeros com uma inserção do DNA mitocondrial.

SAINSARD-CHANET & BEGEL (1986) testaram dois DNAs específicos para a senescência em *P.anserina* (sen-DNA α e β) quanto à capacidade de permitir autoduplicação ao plasmídio em levedura. No entanto, nenhuma das duas regiões produziram este efeito neste fungo. A presença destas regiões no vetor não modificou o modo de integração.

MEINHARDT & ESSER (1987) descreveram a presença de plasmídios lineares em espécies do gênero *Morchella*. A clonagem destes plasmídios em vetores bacterianos levou a identificação de sequências que permitiam a duplicação do vetor em levedura. Isto demonstrou que estas

características podiam ser usadas para construção de vetores de autoduplicação para transformação e clonagem de genes neste gênero.

Duas propriedades são esperadas em plasmídios contendo ARS: alta frequência de transformação e instabilidade sob condições não seletivas. POWELL & KISTLER (1990) construíram um plasmídio para *F.oxysporum*, denominado pFT1, que apresentava: o vetor pUC12; um fragmento de 1,8Kb de um plasmídio linear mitocondrial de *F.oxysporum* f.sp.*raphani*; e um fragmento de 2,4Kb contendo o gene bacteriano para higromicina B fosfotransferase (hph), com o promotor de gene *trpC* de *A.nidulans*. A transformação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* 73 com este plasmídio resultou na produção de plasmídios lineares de replicação autônoma em 4 dos 11 transformantes ensaiados. No entanto, após a análise foi observado que 3 destes plasmídios haviam sofrido rearranjos e adquirido DNA do fungo hospedeiro. Foi observado que as sequências presentes em um dos plasmídios recuperados permitiam manutenção estável do plasmídio linear, alta eficiência de transformação e um número de cópias do plasmídio de aproximadamente 10-50 por núcleo haplóide. Foi demonstrado que nestas regiões se encontravam sequências teloméricas de consenso. Estas sequências promoviam autoduplicação em linhagens de *F.oxysporum*, *Nectria haematococca* e *Cryphonectria parasitica*.

WRIGHT & PHILIPPSEN (1991) transformaram o fungo filamentoso *Ashbya gossypii* com um plasmídio contendo uma sequência de replicação autônoma (ARS) de *Saccharomyces cerevisiae*. Os transformantes foram instáveis sob condições não seletivas e foi demonstrado que o plasmídio podia se autoduplicar neste organismo. Um novo elemento de autoduplicação também foi isolado de *Mucor circinelloides*. Este elemento foi isolado durante a clonagem do gene metionina neste organismo (ANAYA & RONCERO, 1991).

2.3.3- Marcas utilizadas para seleção de transformantes

2.3.3.1- Mutações auxotróficas

Mutantes nutricionais são facilmente obtidos pela utilização de agentes mutagênicos, tais como luz ultravioleta e agentes químicos, e posterior caracterização. Para serem utilizados em experimentos de transformação, eles devem possuir baixa frequência de reversão, para não mascarar o crescimento das colônias transformadas. Têm sido bastante utilizados mutantes com perdas cromossômicas, impossíveis de reverter.

Em geral, o gene selvagem é introduzido via plasmídio e os transformantes são visualizados em meio seletivo. Existem tipos especiais de seleção de mutantes espontâneos, que torna desnecessária a utilização de agentes mutagênicos, que agem aleatoriamente, muitas vezes provocando mutações morfológicas indesejáveis. Neste caso, podemos citar os mutantes para assimilação de nitrato como fonte de nitrogênio. Estes mutantes podem ser selecionados devido à resistência que apresentam ao clorato. Entre os mutantes que podem ser obtidos com esta técnica estão os mutantes niaD (nitrato redutase) incapazes de utilizar nitrato como fonte de nitrogênio. Este sistema se mostrou bastante apropriado para transformação, já tendo sido usado em *A.nidulans*, *F.oxysporum* (MALADIER *et alii*,1989); *A.niger*, *A.oryzae* (UNKLESS *et alii*,1989) e *P.chrysogenum* (WHITEHEAD *et alii* , 1989). O padrão de assimilação parece ser semelhante ao crescimento em meio com clorato.

Outra classe de mutantes bastante interessante é a de mutantes para produção de uracila (pyr4 para *N.crassa* e pvrG para *A.nidulans*). Estes podem ser obtidos pela resistência ao ácido 5-floroorótico, que é um análogo, e colônias resistentes à ele geralmente são mutantes uracila. Esta marca já foi usada para transformação de *P.chrysogenum* (DIEZ *et alii*, 1984); *A.nidulans* (BALLANCE & TURNER, 1985); *N.crassa* e *A.niger* (HARTINGSVELDT *et alii*, 1987). Outros mutantes auxotróficos bastante usados são os mutantes argB (BUXTON *et alii*,1985) e trpC (YELTON *et alii*,1985).

2.3.3.2- Marcas dominantes

Quando são utilizadas marcas dominantes para seleção dos transformantes, se torna desnecessária a obtenção de mutantes. As principais marcas dominantes utilizadas tem sido: resistência à antibióticos, resistência ao benlate e sulfamidas e utilização da acetamida.

A resistência à antibióticos conferida por certos genes, tem se mostrado bastante apropriada para o uso como marca seletiva dominante. O gene hph de *E.coli* que codifica a higromicina B transferase, que inativa a higromicina, tem sido utilizado para transformação em *A.nidulans*, pela construção de vetores apropriados com os sinais de expressão do fungo (PUNT *et alii*, 1987). O mesmo plasmídeo, pAN 71, que possui o gene hph de *E.coli*, com os sinais de expressão de *A.nidulans*, foi utilizado também com sucesso, na transformação de *Fulvia fulva* (OLIVER *et alii*, 1987); *Septoria nodoxium* (COALEY *et alii*, 1988); *A.niger* (MORH, 1989) e *A.ficum* (MULLANEY *et alii*, 1988).

Outro gene de bactéria ensaiado na transformação de fungos filamentosos é o que confere resistência à fleomicina, de *Streptococcus hindustanus*, flanqueado pela região promotora do gene gpd e terminadora do gene trpC de *A.nidulans*. Ele mostrou-se eficiente na transformação de *P.chrysogenum*, *A.niger* e *A.nidulans* (MATTER & PUNT, 1988). Foi observada uma frequência de transformação semelhante à obtida com o gene da higromicina, ou seja, em torno de 20 transformantes/ μ g de DNA.

A resistência à oligomicina nuclear tem sido mapeada em um simples locus(oliC) no grupo de ligação VII de *A.nidulans*. A oligomicina é um antibiótico que inibe a produção de ATP mitocondrial. Este gene foi clonado e usado na transformação de *A.nidulans*, onde foi feita a seleção direta para resistência à oligomicina (WARD *et alii*, 1986)

Benomil é um fungicida utilizado como agente haploidizante em análises genéticas de fungos. A resistência ao Benomil ocorre como resultado de mutações em genes relacionados com as tubulinas. Um desses genes benA tem sido clonado e usado como marca dominante na transformação de *A.nidulans* e *N.crassa* (ORBACH *et alii*, 1986). Outro marcador dominante que vem sendo utilizado está relacionado com a resistência às sulfamidas. CARRAMOLINO *et alii* (1989) usaram a resistência às sulfamidas para transformação em *P.chrysogenum*. Sulfamidas (Su) são análogos estruturais do

ácido p-aminobenzóico e elas atuam como drogas reduzindo a síntese, a nível de DHPS. Neste caso, foi substituída a região iniciadora e finalizadora do gene por regiões do gene trpC do mesmo organismo. A frequência de transformação foi de 4-10 transformantes/ μ g de DNA.

O gene amdS de *A.nidulans* foi um dos primeiros genes utilizados como marca seletiva dominante. Em *A.nidulans* ele permite a utilização da acetamida como fonte de nitrogênio e carbono e tem mostrado grande potencial na transformação de outros fungos como *A.niger* (KELLY & HYNES,1989); *Cochlianolus heterotropus* (TURGEON *et alii*, 1985); *Penicillium nalgiovense* (GEISEN & LEISTNER,1989) e *A.ficum* (MULLANEY *et alii*, 1988). A fusão do gene lacZ de *E.coli*, responsável pela produção de β -galactosidase, com o gene trpC de *A.nidulans* foi clonado em um vetor contendo acetamida e os transformantes foram selecionados em meio contendo X-gal e sorbitol. Foi demonstrado que a expressão do gene de fusão foi dependente da sequência do DNA do fungo (VAN CORGON *et alii*, 1985). Este mesmo gene fundido ao promotor de gene gpd de *A.nidulans* foi usado para transformar *P.chrysogenum*, onde foi observada a expressão da proteína de fusão (KOLAR *et alii*, 1988).

2.3.4- Análise dos transformantes

A transformação envolve a entrada de DNA exógeno em uma célula e a sua expressão, estando ou não integrado no genoma hospedeiro. O modo como este DNA duplica-se e persiste nesta célula é fundamental para expressão da sua informação genética. Em fungos filamentosos, na maioria dos casos, o DNA exógeno é integrado ao genoma hospedeiro, duplicando-se junto com este. Três tipos de integrações são observadas: integração homóloga, heteróloga e troca gênica. A integração homóloga ocorre quando o plasmídeo recombina com o próprio gene mutado, integrando ao lado deste ou dentro dele. A integração heteróloga ocorre por recombinação com regiões do genoma que não estão relacionadas com a mutação. A integração por troca gênica se dá pela substituição do gene presente no genoma pelo gene

carregado pelo plasmídio por dupla permuta. Neste último caso, a sequência do vetor não é detectada (Figura 2).

O tipo de integração ocorrido e a sua estabilidade podem ser medidos pela análise genética, observando-se a estabilidade mitótica, estabilidade meiótica e análise molecular pelo Southern blot.

UPSHALL(1986) fez a análise genética e molecular de trinta e três transformantes argB de *A.nidulans*. A maior parte dos transformantes resultaram de integração em "tandem" do DNA exógeno no locus argB. Foram observadas também substituições de genes e integrações não homólogas. A maior parte dos transformantes mostrou baixo nível de instabilidade meiótica e foi mapeado no cromossomo III.

Na maioria dos relatos da literatura, dois tipos de transformantes são descritos: aqueles que apresentam um crescimento vigoroso desde o início e aqueles que apresentam uma inibição inicial do crescimento, e que posteriormente, podem dar origem a setores vigorosos. Esse segundo grupo é conhecido como transformante "abortivo"(TILBURN *et alii*, 1983).

WERNADS *et alii* (1986) correlacionaram o "background" genético da linhagem MH1277 amdS de *A.nidulans*, com o tipo de integração ocorrida com diversos vetores, pela utilização da genética clássica para a construção de diferentes linhagens amdS⁻. Com a análise do Southern, foi concluído que todos os transformantes continham repetições em "tandem", ou seja, cópias múltiplas do DNA do vetor inserido, e que isso estava relacionado com a linhagem receptora.

WARD *et alii* (1986) construíram o plasmídio pMW2 que continha o gene oliC31 de *Anidulans* e o gene pvr4 de *N.crassa*. A linhagem G191 (pabaA,pvrG) de *A.nidulans* foi transformada com este plasmídio e foram selecionadas as colônias resistentes à oligomicina. Os transformantes resistentes à oligomicina foram colocados em três classes fenotípicas maiores: 1) completamente resistentes quando comparados com o mutante original oliC31; 2) semi-resistentes, mas dando setores fortemente resistentes, quando crescidos em meio com oligomicina; 3) semi-resistentes, mas raramente produzindo setores completamente resistentes. A frequência de cada tipo foi

dependente do meio de seleção aplicado, isto é, seleção para resistência à oligomicina ou seleção para crescimento em meio sem uracila.

PARSONS *et alii* (1987) desenvolveram um sistema de transformação genética para o fungo *Magnophora grisea*, o agente causal da doença "rajada" do arroz. Foi usado um plasmídio carregando o gene argB de *A.nidulans* e como linhagem receptora um mutante específico de *M.grisea*. A integração de cópias simples ou múltiplas do plasmídio ocorreu em um simples sítio no genoma de cada transformante e foram criados, geralmente, rearranjos durante a integração. Quando segmentos genômicos de *M.grisea* foram incorporados aos plasmídios, a frequência de transformação não foi grandemente afetada. A integração por recombinação homóloga ocorreu quando o plasmídio foi linearizado por clivagem em um único sítio dentro do segmento de *M.grisea*.

MELLON *et alii* (1987) transformaram o fungo *Coprinus cinereus* com plasmídio pHIONA 1 contendo o gene acu7 (isocitrato liase) deste organismo. Os transformantes acu⁺ foram obtidos por cotransformação de um duplo mutante trp1 e acu7, com um plasmídio contendo o gene trp1. Foi observado que o gene acu7 integrou-se em sítios não homólogos e frequentemente, em múltiplos sítios no genoma de *C.cinereus*.

A integração em múltiplos sítios também foi observada por BERI & TURNER(1987) em *P.chrysogenum* transformado com o gene amdS (acetamidase) de *A.nidulans*.

Segundo PICARD *et alii* (1987) a proporção entre eventos de integração homóloga e não homóloga varia amplamente de um organismo para outro, de uma linhagem para outra e de um plasmídio para outro. Eles sugerem que os cosmídios podem ser uma alternativa em fungos filamentosos, uma vez que a grande maioria dos transformantes obtidos com cosmídios por esses autores em *P.anserina* ocorreram por integração homóloga.

Segundo DUNNE & OAKLEY (1988) é importante quantificar a estabilidade dos plasmídios usados em transformações por três motivos. Primeiro, os *Aspergillus* têm se tornado organismos escolhidos para a expressão de genes heterólogos, assim sua estabilidade é comercialmente importante. Segundo, a excisão de sequências transformantes por recombinação homóloga é essencial para o processo de troca gênica em duas

a) Homóloga

b) Heteróloga

c) Troca Gênica

Figura 2 : Tipos de integrações de plasmídios observadas em *A.nidulans* :

a) Integração homóloga - ocorre por meio de uma permuta simples que leva à integração de todo o plasmídio ao lado do gene estudado ; b) Integração heteróloga - ocorre por meio da integração do plasmídio em qualquer sítio no genoma, não ligado ao gene em estudo ; c) substituição gênica: ocorre por meio de duas permutas , onde o gene presente no genoma da linhagem receptora é trocado pelo gene carregado pelo plasmídio.

etapas. Isto pode ser usado para trocar genes de *A.nidulans* por alelos criados "in vitro". Terceiro, a capacidade de recuperar plasmídios que são excisados do genoma do fungo, por transformação de *E.coli*.

WANG *et alii* (1988) fizeram uma fusão do promotor de um gene que confere tolerância ao choque térmico de *U.maydes* com o gene para higromicina β -transferase de *E.coli*, e usaram para transformar este fungo. A forma predominante de integração do vetor foi por recombinação não homóloga. A outra parte dos transformantes integrou no locus do gene que confere tolerância ao choque térmico. A atividade da higromicina fosfotransferase e resistência à higromicina estava correlacionada com o número de cópias do vetor integrado em uma localização homóloga. O DNA transformante foi estavelmente mantido durante a mitose e meiose. Três fatores contribuíram para o aumento da frequência de transformação: o uso de células na fase logarítmica de crescimento; a linearização do plasmídio e o "background" da linhagem receptora.

RAZAMAMPARANY & BEGUERET (1988) estudaram o mecanismo de integração de três transformantes do fungo *Podospora anserina*, obtidos pela transformação do mutante com um vetor contendo o gene ura5 deste fungo. Foram clonadas as junções entre o DNA plasmidial e o DNA genômico dos transformantes e determinadas as sequências nucleotídicas. Foi observado que existia pouca homologia entre o DNA plasmidial e o DNA genômico e que haviam ocorrido perdas de sequências do plasmídio no sítio de integração. Estes rearranjos foram explicados pela formação de plasmídios multiméricos antes da integração.

BEJ & PERLIN (1989) observaram pela técnica do Southern blot, que o plasmídio pUCH1, que carrega o gene para a resistência à higromicina fundido ao promotor do ascomiceto *C.helerastrophus*, integrava-se em múltiplos sítios quando usado para transformar *Ustilago violacea*. O fenótipo resistência à higromicina foi 100% estável nos transformantes por, pelo menos, 30 gerações de crescimento mitótico sob condições não seletivas. Quando o DNA dos transformantes foi usado para transformar *E.coli*, os transformantes apareceram em uma frequência de 12/ μ g de DNA. Estes plasmídios recuperados eram, em sua maioria, o plasmídio pUCH1 incompletos,

tendo perdido parte da sua sequência de DNA. Este resultado sugeriu a baixa produção de moléculas circulares dentro das sequências integradas.

CARRAMOLINA *et alii* (1989) observaram entre os transformantes heterólogos de *P.chrysogenum*, obtidos com um vetor que confere resistência à sulfamidas, três situações diferentes: integração de cópias repetidas em "tandem" em um simples locus; integração de cópias simples em múltiplos loci e integração de múltiplas e simples cópias em múltiplos loci.

2.3.5- Transformação e clonagem de genes

A transformação pode ser usada em fungos filamentosos com diversas finalidades. Entre estas merece especial destaque a clonagem de genes. Entre os fungos filamentosos, *A.nidulans* tem sido o mais utilizado como receptor de genes heterólogos e para clonagem gênica.

Duas estratégias podem ser utilizadas para clonagem de genes de fungos filamentosos pela transformação: complementação e inativação gênica.

YELTON *et alii* (1985) construíram um vetor de clonagem pKBY2, que carregava o gene trpC, para isolar genes por complementação em *A.nidulans*. Este cosmídio foi utilizado para construção de um banco genômico de uma linhagem selvagem de *A.nidulans*. Os cosmídios recombinantes foram usados para a transformação de uma linhagem yA de *A.nidulans*. Os cosmídios que complementavam a mutação foram recuperados e foi feita uma análise de restrição e complementação, onde foi demonstrado que um fragmento do cosmídio correspondia ao gene yA. Posteriormente, MAYORGA & TIMBERLAKE(1990) usaram este mesmo banco para o isolamento por complementação do gene wA de *A.nidulans*. Um entre 2.950 transformantes complementaram a mutação. Esta colônia foi purificada, o DNA foi isolado, sujeito ao empacotamento "in vitro" e usada para infectar *E.coli*. Assim, o cosmídio com o gene foi recuperado e analisado.

JOHNSTONE *et alii* (1985) clonaram o gene de desenvolvimento brl de *A.nidulans* por complementação da mutação com um banco genômico feito em plasmídio. Após a complementação, o plasmídio foi recuperado pela extração do seu DNA total, transformação de *E.coli* e seleção para resistência à ampicilina. As evidências sugerem que a transformação ocorreu por integração, mas a excisão espontânea do plasmídio integrado foi aparentemente bastante frequente para permitir a recuperação de plasmídios transformantes em *E.coli*.

As sequências de DNA, quando introduzidas no fungo, podem integrar por recombinação com sequências homólogas ou em sítios heterólogos. Durante a integração, estas sequências podem inativar genes, se no caso, integrarem dentro deles. Uma das dificuldades encontradas para detecção dessas inativações é que, geralmente, no caso de mutações auxotróficas, os transformantes são selecionados em meio seletivo, um gene essencial que seja inativado por um plasmídio não poderá ser detectado. No caso de mutações morfológicas que não impossibilitam o crescimento do fungo, a detecção torna-se mais fácil. Também pode-se usar meios específicos que permitem a visualização de determinadas mutações.

DIALLINAS & SCAZZOCCHIO (1989) transformaram uma linhagem de *A.nidulans* que não apresentava o gene que codifica a acetamidase (amdS), com um plasmídio que carregava este gene. Os transformantes foram regenerados em um meio específico para detecção de mutação no gene uapA. A inativação ocorreu com uma frequência de 0,3%. O gene foi isolado pela recuperação do plasmídio em *E.coli*, que trouxe consigo parte do gene uapA. Este fragmento do gene uapA foi usado para isolar o gene inteiro em um banco genômico de *A.nidulans*, feito no fago EMBL4. Desta maneira, o gene foi clonado por meio da sua inativação.

TILBURN *et alii* (1990) durante experimentos de transformação com um gene envolvido no catabolismo da prolina, observaram o aparecimento de uma colônia branca(wA). Esta colônia surgiu devido a inserção de várias cópias do plasmídio dentro do gene wA. Um fragmento do plasmídio foi usado como sonda para selecionar o gene em um banco genômico de *A.nidulans* e foi feita a clonagem do gene.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MICRORGANISMOS

3.1.1- Bactéria.

A linhagem de *Escherichia coli* utilizada neste trabalho foi a linhagem DH5 α (MANIATIS *et alii*, 1982) pertencente à coleção do setor de Genética de Microrganismos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP.

3.1.2- Linhagens de *Aspergillus nidulans*

As linhagens de *A.nidulans* usadas neste trabalho pertencem à coleção do setor de Genética de Microrganismos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP e do laboratório de genética de microrganismos da Université de Paris-Sud, Orsay, França.

a) Linhagens "A" e "B", que possuem a porção terminal do grupo de ligação I duplicada e translocada para o grupo de ligação II (NGA & ROPER, 1968) (Figura 3).

b) Variantes V2, V3, V5 e V17, provenientes das linhagens "A" e "B" (AZEVEDO & ROPER, 1970)(Figura 4).

c) Linhagem "MSF" (master strain F) que possui marcadores genéticos nos oito grupos de ligação (Figura 4).

d) Linhagem CS2108 que apresenta os marcadores argB1 e pyrG1.

e) Linhagem CS2158 que apresenta os marcadores puA2; sB43; prnA; fwA, niaD.

f) Linhagem R1 que apresenta os marcadores yA, biA1.

Linhagens	Grupos de Ligação	Marcadores Genéticos
A	I	proA1 pabaA1 yA2 + +
	II	+ adE20 biA1
B	I	proA1 pabaA1 + adE20 biA1
	II	yA2 + +

proA1 = requer prolina

pabaA1 = requer paba

adE20 = requer adenina

biA1 = requer biotina

yA2 = conídios amarelos

Figura 3: Linhagens duplicadas "A" e "B" de *A.nidulans*.

Grupos de Ligação	Marcadores Genéticos
I	suA1adE20 proA1 yA2 pirG adE20 biA1
II	acrA1 v 2 v 3 puA
III	argB galA1
IV	pyroA4
V	facA303 hxA1
VI	sB
VII	prnA nicB8 v17
VIII	fwA niaD v 5 riboB

suA1adE20 : supressor do gene adE20 adE20 : requer adenina proA1 : requer prolina yA2 : conídios amarelos pirG : requer uracila biA1 : requer biotina acrA1 : resistência a acriflavina v 2 : deteriorado 2 v 3 : deteriorado 3 argB : requer arginina galA1 : não utiliza galactose pyroA4 : requer piridoxina	hxA1 : não utiliza hipoxantina sB : requer tiosulfato de sódio prnA : regulador da utilização de prolina nicB8 : requer nicotinamida v17 : conídios pálidos fwA : conídios verde palha niaD : não utiliza nitrato v 5 : deteriorado 5 riboB : requer riboflavina puA : requer putrescina facA303 : não utiliza acetato
--	--

Figura 4 : Marcadores genéticos usados neste trabalho.

3.2- PLASMÍDIOS

Plasmídios	Marcadores
- pFB39	- <u>Ap^R, argB1</u>
- pP22	- <u>Ap^R, argB1, v17</u>
- pP22.2	- <u>Ap^R, argB, v17</u>
- pP22.8	- <u>Ap^R, argB,</u> fragmento do gene <u>v17</u>

3.3- SÍMBOLOS E FENÓTIPOS DOS MUTANTES DE *A.nidulans*
ESTUDADOS NESTE TRABALHO

Símbolos	Fenótipo
Mutantes nutricionais	Requerem
- <u>adeE20</u>	- adenina
- <u>argB1</u>	- arginina
- <u>methG1</u>	- metionina
- <u>nicB8</u>	- ácido nicotínico
- <u>pabaA6</u>	- ácido <i>p</i> -aminobenzóico
- <u>proA1</u>	- prolina
- <u>pvroA4</u>	- piridoxina
- <u>riboB2</u>	- riboflavina
- <u>sB3</u>	- tiosulfato de sódio

Mutantes morfológicos

Símbolo	Fenótipos
- <u>fawnA1</u>	- conídios fawn
- <u>wA3</u>	- conídios brancos
- <u>yA2</u>	- conídios amarelos
Outros	
- <u>Acri1</u>	- resistência à acriflavina
- <u>facA303</u>	- incapacidade para utiliza acetato
- <u>galA1</u>	- incapacidade para utilizar galactose
- <u>hxA</u>	- não utiliza hipoxantina
- <u>niaD</u>	- incapacidade para utilizar nitrato como fonte de nitrogênio
- <u>uayA</u>	- utilização de ácido úrico

3.4- MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

3.4.1- Meio de Luria-Bertani (LB)

Bacto-triptona.....	10g
Bacto-extrato de levedura.....	5g
NaCl.....	10g
H ₂ O.....	1000ml
Ágar.....	15g

O pH foi ajustado com NaOH 1N para 7,5.

3.4.2- Meio mínimo (PONTECORVO *et alli* ,1953)

NaNO ₃	6,0g
KH ₂ PO ₄	1,5g
KCl.....	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
FeSO ₄	0,01g
ZnSO ₄	0,01g
Glicose.....	10,0g
Ágar.....	15,0g
H ₂ O.....	1000ml

O pH foi ajustado para 6.8 com NaOH 1N.

3.4.3-Meio de regeneração dos protoplastos.

Para regeneração dos protoplastos foi utilizado o meio mínimo (item 3.4.2.) onde foi adicionado o estabilizador osmótico apropriado. Na técnica de transformação 1 o estabilizador usado foi o sorbitol 1,2M e na técnica de transformação 2 foi a sacarose 1M (item 3.5.2.2).

3.4.4- Meio completo (PONTECORVO *et alii* , 1953).

Meio mínimo adicionado de:

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

3.4.5- Meio de acetato de amônia (APIRION, 1962)

Acetato de amônia.....	12,0g
------------------------	-------

KH ₂ PO ₄	43,0g
NaCl.....	2,0g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
FeSO ₄	0,01g
ZnSO ₄	0,01g
Ágar.....	15g
Água destilada.....	1000ml

O pH foi ajustado para 5,1 com NaOH 1 N.

3.4.6. Meio mínimo galactose (ROBERTS, 1959)

No meio mínimo (item 3.4.2) a glicose foi substituída por igual quantidade de galactose e o pH foi ajustado para 6 com NaOH 1 N.

3.4.7- Solução de vitaminas

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

A solução foi mantida a 100°C em banho-maria por 15 minutos e guardada em frasco escuro no refrigerador.

3.4.8- Solução de Tween-80 v/v 0,1%

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

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

3.4.9- Solução salina p/v 0,85%

NaCl.....	8,5g
Água destilada.....	1000ml

Foram distribuídos 9ml por frasco e feita a autoclavagem.

3.4.10- Solução de Benlate (HASTIE, 1970)

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

A 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 a 100°C por 15 minutos e conservada no refrigerador.

3.4.11-Suplementos adicionados ao meio mínimo

Solução estoque	mg/100ml H ₂ O	Concentração final (µg/ml)
Adenina	500,00	25,00
Acido nicotínico	10,00	0,50
Acido 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
Tiosulfato de sódio	2000,00	100,00
Arginina	5300,00	53000,00

Os estoques foram preparados em água destilada esterilizada. As soluções foram mantidas a 100°C em banho-maria 15 minutos ou filtradas, e conservadas no refrigerador.

3.4.12- Solução de ampicilina.

A ampicilina foi dissolvida em água (25mg/ml), esterilizada por filtração e estocada a -20°C. Foram usadas as seguintes concentrações: 50µg/ml em meio sólido; 30µg/ml em meio líquido.

3.4.13- Enzimas

3.4.13.1- Lisozima

O estoque de lisozima foi preparado na concentração de 50mg/ml, em água. As alíquotas foram estocadas a -20°C.

3.4.13.2- RNase

A RNase pancreática (RNase A) foi preparada em uma concentração de 10mg/ml, em 10mM de Tris-HCl (pH=7,5), 15mM de NaCl. Foi aquecida a 100°C por 15 minutos e estocada a -20°C.

3.4.13.3- Enzimas de restrição

As enzimas de restrição utilizadas foram enzimas comerciais fornecidas pela PHARMACIA, BOEHRINGER e BIOLABS.

3.4.14- Tampão TE

Tris-HCl (pH= 7,6).....	10mM
EDTA (pH=8,0).....	1mM

3.4.15- Tampão TBE

Tris-borato.....	45mM
EDTA.....	1mM

3.4.16- Tampão TBE 0,5x

O tampão TBE 0,5x foi usado para separação dos cromossomos de *A.nidulans*. Neste caso o tampão citado no item anterior(TBE 1x) foi diluído em um volume igual de água destilada.

3.4.17- Tampão TAE 0,5x

Tris-acetato.....	20mM
EDTA.....	0,5mM

3.4.18- Solução de SSC (20x)

NaCl.....	175,3g
Citrato de sódio.....	88,2g
Água destilada.....	100ml

O pH foi ajustado para 7,0 com uma solução 10N de NaOH.

3.4.19- Estabilizadores osmóticos.

3.4.19.1- Solução de sorbitol 1 M , CaCl₂ 50mM, Tris-HCl 10mM pH=7,5

Foram adicionados 18,2g de sorbitol para 60ml de água destilada, em seguida foram adicionados 5ml de uma solução de CaCl₂ 1M e 1ml de uma solução de Tris-HCl pH=7,5 1M. O volume final(100ml) foi completado com água destilada e a solução foi filtrada e conservada a 4°C.

3.4.19.2- Solução de sorbitol 0,6M, Tris-HCl 10mM.

Foram adicionados 10,9g de sorbitol em 80ml de água destilada, em seguida foi adicionado 1ml de uma solução de Tris-HCl pH=7,5. O volume foi completado (100ml) com água e a solução foi filtrada e conservada à temperatura ambiente.

3.4.19.3- Solução de MgSO₄ 1,2M, pH=5,8

Em 100ml de água destilada foram adicionados 59g de MgSO₄.7H₂O. Em seguida, o pH foi acertado para 5,8 com as soluções de NaH₂PO₄ e Na₂HPO₄ 0,5M, para a molaridade final de 10mM. O volume final foi completado (200ml) com água destilada e a solução foi filtrada e conservada à temperatura ambiente.

3.4.19.4- Solução estabilizadora para extração de plasmídios

Tris-HCl pH=8,0.....50mM

Sacarose.....25%

3.4.19.5- Solução de KCl 0,6 M, pH=5,8

Em 70ml de água destilada foram adicionados 4,47g de KCl. Em seguida, o pH foi ajustado para 5,8 com as soluções de NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4 0,5M. O volume final foi completado para 100 ml com água destilada e a solução foi filtrada e conservada à temperatura ambiente.

3.4.20- Solução GMB (pulsed-field)

EDTA pH=7,5.....125mM

Sorbitol.....0,9M

3.4.21- Solução de NDS (pulsed-field)

EDTA pH=8,0.....10mM

N-laurilsarcosinato de sódio p/v.....1%

3.4.22- Solução de Denhardt.

Ficol.....5g

Polivinilpirrolidona.....5g

Soro albumina bovina.....5g

H₂O destilada.....500ml

A solução foi armazenada em alíquotas de 50ml, a -20°C.

3.4.23- Solução para desnaturação do DNA em gel de agarose

NaOH.....500mM

NaCl.....1,5M

3.4.24- Solução para neutralização do DNA em gel de agarose

NaOH.....20mM
 Acetato de amônio.....1 M

3.4.25- Solução de lise - Triton X-100

Triton X-100 10%.....3%
 EDTA 0,5M.....37%
 Tris-HCl 1M pH=8,0.....15%

A solução foi preparada somente no momento do uso.

3.4.26- Tampão de extração do DNA do fungo (Técnica 1)

Tris-HCl pH=8,0.....200mM
 NaCl.....250mM
 EDTA pH=8,0.....25mM
 SDS p/v.....1%

Esta solução foi preparada somente no momento do uso.

3.4.27- Tampão de extração do DNA do fungo (Técnica 2)

Tris-HCl pH=8,0.....50mM
 EDTA pH=7,5.....20mM
 SDS p/v.....1%

3.4.28- Solução de acetato de potássio

Foram adicionados a 60 ml de uma solução de acetato de potássio 5M, 11,5 ml de ácido acético glacial e 28,5 ml de água destilada.

3.4.29- Tampão de ligação (10x)

Tris-HCl pH=7,6.....	500mM
MgCl ₂	100mM
Ditiotreitol.....	100mM
Soro albumina bovina.....	500µg/ml

O tampão foi estocado em alíquotas a -20°C.

3.4.30- Tampão STE

Tris-HCl pH=7,5.....	10mM
NaCl.....	10mM
EDTA.....	1mM

3.4.31- Tampão Klenow(10x)

Tris-HCl pH=7,6.....	500mM
MgCl ₂	100mM

3.4.32- Tampão para reação de "Random-Primer" (10x)

HEPES pH=6,6	900mM
MgCl ₂	100mM

3.4.33- Tampão de corrida do DNA em gel de agarose (6x)

Azul de bromofenol	250mg
Xileno cianol FF.....	250mg
Ficol.....	15g
H ₂ O.....	100ml

Este tampão foi conservado à temperatura ambiente.

3.4.34- Solução de hibridação

Solução de SSC.....	6x
---------------------	----

Solução de Denhardt	5x
Solução de SDS p/v.....	0,1%

A pré-hibridação foi feita a 60-65°C por no mínimo duas horas e a hibridação foi feita durante toda a noite.

3.4.35- Solução de lavagem das membranas após hibridação com material radioativo

3.4.35.1- Primeira lavagem

SSC v/v.....	2x
SDS p/v.....	0,1%

3.4.35.2- Segunda lavagem

SSC v/v.....	1x
SDS p/v.....	0,1%

3.4.35.3- Terceira lavagem

SSC v/v.....	0,1%
SDS p/v.....	0,1%

3.5- ESTERILIZAÇÃO E INCUBAÇÃO

Os meios de cultura e soluções foram esterilizados em autoclave, 1 atmosfera, durante 15 minutos. Em alguns casos as soluções foram filtradas em membrana da Milipori. As placas foram incubadas a 37°C para o crescimento do fungo, e em alguns casos, a 28°C para esporulação.

3.5.1- Obtenção de protoplastos

3.5.1.1- Técnica 1 (BALLANCE & TURNER, 1985)

Foram inoculados conídios em placas de Petri com meio mínimo suplementado com os requerimentos nutricionais, de acordo com a linhagem usada. A incubação foi feita por um período de , no máximo, quatro dias, a 37°C. Decorrido este período foi feita uma suspensão de conídios em solução de Tween 80(aproximadamente 10^6 conídios/ml). Em seguida, 1ml da suspensão foi colocada em frascos erlenmeyer contendo 100ml de meio mínimo mais os requerimentos nutricionais.

Os frascos foram colocados no agitador por 12-18 horas, a 37°C. Após este período, o micélio foi coletado por filtração em filtro Büchner com papel de filtro esterilizado, lavado com KCl 0,6M e pesado. Para cada 200mg de micélio foram adicionados 5ml de KCl 0,6M, pH=5,8 e 20 mg da enzima lítica usada. Neste caso, foi utilizada uma mistura de Novozym e celulase Onozuka. A incubação do micélio com o sistema lítico foi feita a 28°C (120rpm) durante 90 minutos. Em seguida, os protoplastos foram filtrados em seringa com lã de vidro esterilizada e lavados por centrifugação (4000rpm/5 minutos) três vezes com sorbitol 1M, 50mM de CaCl_2 , 10mM de Tris-HCl. No final, os protoplastos foram ressuspensos em 500 μ l da mesma solução, para dar uma concentração final de 10^7 protoplastos/100 μ l de solução.

Para determinar a frequência de regeneração, os protoplastos foram contados, diluídos e plaqueados em diversas densidades em meio completo e meio completo mais estabilizador osmótico, onde foi feita a contagem do número de colônias.

3.5.1.2- Técnica 2 (YELTON *et alii*, 1985)

Foi preparada a solução de conídios, como descrito na técnica anterior, e foram inoculados 10ml desta suspensão em frascos erlenmeyers de 2 l com 400ml de meio de cultura. Os frascos foram agitados 12 horas a 25°C. Após este período, o micélio foi filtrado e lavado com MgSO_4 1,2M. Este foi pesado e para cada grama dele foram adicionados 30mg de enzima lítica, neste caso, somente Novozym 234 e 10ml de uma solução osmótica de MgSO_4 1,2M

pH=5,8. A incubação do micélio com o sistema lítico foi feita como na técnica anterior, a 28°C com uma agitação de 120rpm durante 90 minutos. Em seguida, os protoplastos foram colocados em tubos e foi adicionado igual volume de sorbitol 0,6M, Tris-HCl 10 mM, cuidadosamente, podendo ser observada as duas fases. Foi feita, então, uma centrifugação de 15 minutos a 6000rpm. Foi observada a banda de protoplastos entre as duas fases e esta foi coletada em um novo tubo. A este foram, então, adicionados 10-15 ml de sorbitol 1M, CaCl₂ 50mM, Tris-HCl 10mM. Foram feitas em seguida três lavagens com esta solução e no final, os protoplastos foram ressuspensos em 1ml da mesma solução, dando uma concentração final de 10^7 - 10^8 protoplastos para cada 100µl de solução. Para promover a regeneração foi usado o mesmo método citado no item anterior.

3.5.2- Transformação

3.5.2.1- Técnica 1 (BALLANCE & TURNER, 1985)

Após a obtenção dos protoplastos foram colocados 100µl de suspensão em tubos de ensaio e foi adicionada a quantidade de plasmídeo apropriada (1-15µg de DNA). A mistura foi deixada à temperatura ambiente por 25 minutos e, em seguida, foram adicionados 200µl de uma solução de 60% de PEG 3445, 50mM de CaCl₂, 10mM de Tris-HCl pH=7,5. Depois, novamente 200µl e por fim 850 µl da mesma solução. Foi feita, então, uma incubação de 20 minutos à temperatura ambiente. Após este período, foi feita uma diluição com 5ml de solução estabilizadora (sorbitol 1M) e foi feita a semeadura em meio mínimo contendo o estabilizador osmótico, neste caso sorbitol 1M. As placas foram deixadas na estufa por três a cinco dias e as colônias foram contadas e purificadas.

3.5.2.2- Técnica 2 (YELTON *et alii*, 1985)

Após a obtenção dos protoplastos foram adicionados 200 µl de suspensão por tubo eppendorf, e nestes, 10-20µg de plasmídios e 50 µl de uma solução de 60% de PEG 6000, 50mM de CaCl₂ e 10mM de Tris-HCl pH=7,5. Os tubos

foram colocados em gelo e deixados durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 µl da mesma solução de PEG e foi feita uma incubação de 20 minutos à temperatura ambiente. Depois deste período, foi feita uma centrifugação a 12000 rpm e os protoplastos foram ressuspensos em 200µl do estabilizador osmótico. Foi feita a semeadura dos protoplastos em meio seletivo, onde foi utilizada a sacarose 1M como estabilizador osmótico. O período de incubação foi o mesmo citado no item anterior.

3.5.3- Estabilidade mitótica

Após a regeneração, os transformantes foram repicados em meio mínimo e purificados por semeadura dos conídios e isolamento de colônias monospóricas. Os transformantes purificados foram repicados em meio completo, para observação da estabilidade pela presença de setores. Dois transformantes foram escolhidos. Um deles não apresentou qualquer setor em meio completo e o outro apresentou uma alta instabilidade. Estes transformantes foram denominados TVE e TVI respectivamente. Os mesmos foram inoculados em meio mínimo e foram incubados por 5 dias a 37°C. Após este período, foram feitas suspensões de esporos e a semeadura dos mesmos em meio completo. Como o caráter analisado foi a coloração dos conídios, as colônias que haviam perdido o plasmídeo inserido foram observadas diretamente no meio completo. Foram analisadas cerca de 100 colônias.

3.5.4 - Análise meiótica

Os transformantes selecionados e purificados foram cruzados com uma linhagem selvagem para o gene v17. Para a obtenção dos heterocáries as linhagens analisadas foram inoculadas em quatro pontos, em uma placa de Petri, contendo meio completo. Ao lado de cada uma foi inoculada a linhagem selvagem, a uma distância de aproximadamente 1cm e as placas foram incubadas a 37°C por 2 dias. Após este período, o ponto de união entre as duas colônias foi cortado do ágar e colocado em uma placa de Petri pequena com meio mínimo. Esta foi vedada com fita adesiva e incubada a 37°C por 7 dias. Em seguida, os cleistotécios foram retirados, limpos em ágar-água e

esmagados em solução de Tween 80. Os ascósporos foram semeados em meio completo, sendo analisados 100 segregantes quanto à presença da mutação v17.

Para o mapeamento genético 52 segregantes foram usados na preparação de duas placas mestras. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas e, após este período, as colônias foram transferidas para placas de análise pelo repicador multifio. A leitura foi feita após 24, 48 e 72 horas.

A ligação entre dois loci foi determinada pela utilização da fórmula :

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

c= porcentagem 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.

3.5.5- Mapeamento pelo ciclo parassexual

3.5.5.1- Isolamento de diplóide

A técnica utilizada foi a de ROPER (1952). Foi feita uma suspensão de conídios do heterocário em solução de Tween 80, de

aproximadamente 10^7 conídios/ml. Em seguida, foi feita a semeadura desta suspensão em placas de Petri com meio mínimo, sendo colocado 0,2 ml da suspensão por placa. Após 72 horas já foi possível observar algumas colônias, que eram diplóides heterozigotos, pois os conídios haplóides não eram capazes de crescer em meio mínimo. Os diplóides foram isolados e estocados em placas de Petri com meio mínimo.

3.5.5.2- Análise mitótica

A análise mitótica foi feita por meio do ciclo parassexual, onde os diplóides heterozigotos foram haploidizados com Benlate, na concentração 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de produto ativo em meio completo.

Os conídios de um dos diplóides foram inoculados em placas de Petri com meio completo mais benlate. Após 7 dias de crescimento a 37°C, os setores haplóides foram isolados e purificados em meio completo. Em seguida, estes segregantes foram usados para a montagem de duas placas mestras, sendo transferidos para placas de análise pelo replicador multifio (AZEVEDO *et alii*, 1976). Após 24, 48 e 72 horas foram feitas as leituras.

3.5.6- Extração do DNA total do fungo

3.5.6.1- Mini-extração (RAEDER & BRODA, 1985)

Foi inoculado 1ml de uma suspensão de conídios ($10^7/\text{ml}$) em 100ml de meio mínimo com suplementos. O micélio foi coletado após 18 horas de crescimento a 37°C, com agitação de 120rpm, filtrado e lavado com água destilada esterilizada. Ele foi ,então, macerado em grau com nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Foram colocados 50-100 mg do macerado por eppendorf e adicionados 700 μl do tampão de extração (item 3.4.26) e misturados até a homogeneização. Em seguida, os eppendorfs foram colocados a 70°C por 15 minutos, foram adicionados 300 μl de fenol e 300 μl de clorofórmio, e os tubos foram agitados lentamente. O material foi centrifugado por 15 minutos em microcentrífuga sendo retirada a fase líquida superior. A

esta foram adicionados 5µl de RNase e feita uma incubação de 10 minutos a 37°C.

Foi colocado, em seguida, meio volume de isopropanol e os tubos foram invertidos suavemente até a formação do grumo de DNA. Foi feita uma centrifugação de 3 segundos, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70%. O precipitado foi seco e o DNA ressuscitado em 50 µl de TE, sendo posteriormente quantificado.

Quando o DNA extraído foi usado para transformação de *E.coli*, a precipitação foi feita durante toda a noite e posterior centrifugação de 20 minutos, a 12000 rpm.

3.5.6.2- Extração em grande escala

3.5.6.2.1- Técnica 1 (RAEDER & BRODA, 1985)

Foram inoculados 2ml de uma suspensão de conídios (10^7 conídios/ml de solução de Tween) em 300 ml de meio de cultura líquido e incubados a 37°C por 18 horas, com uma agitação de 120rpm. Após este período, o micélio foi coletado por filtração e lavado em água destilada. O micélio foi pesado e transferido para um grau com nitrogênio líquido e macerado até a formação de um pó fino. Para cada 5g de micélio foram adicionados 10ml de tampão de extração (item 3.4.26), o qual foi homogeneizado e feita uma incubação de 15 minutos a 70°C. Em seguida, foi adicionado meio volume de fenol e meio volume de clorofórmio, misturados e centrifugados 20 minutos a 5000rpm. A fase superior foi coletada e transferida para um novo tubo, onde foi colocada RNase para a concentração final de 50µg/ml, e incubado a 37°C por 15 minutos. Depois foi colocado igual volume de clorofórmio no tubo e feita uma centrifugação a 5000 rpm durante 15 minutos. A fase superior foi coletada e adicionou-se à mesma 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 0,5 volume de isopropanol. O DNA foi enrolado em bastão de vidro, lavado com etanol 70% e colocado para secar a 37°C. Foi ressuscitado em 1ml de TE durante toda a noite.

3.5.6.2.2- Técnica 2 (SPECHT *et alii*, 1982)

O micélio foi obtido e macerado em nitrogênio líquido como descrito no item 3.5.6.2.1. O macerado foi ressuspensionado em 15 ml da solução de extração (item 3.4.27) e incubado durante 30 minutos a 60°C. Em seguida, foram adicionados 4,5 ml da solução de acetato de potássio (item 3.4.28) e a preparação foi mantida em gelo por 30-60 minutos. Esta foi então centrifugada 10 minutos a 10000 rpm e o sobrenadante foi filtrado através de uma gaze. Foram, então, adicionados dois volumes de etanol e o tubo foi mantido a -20°C durante toda a noite. Foi feita uma centrifugação de 20 minutos a 10000 rpm e o precipitado foi ressuspensionado em 5 ml de TE. Foram colocadas 300 µg de RNase e feita uma incubação de 30 minutos a 37°C. Por fim, foi adicionado igual volume de isopropanol e o tubo foi invertido suavemente até a formação do grumo de DNA. Este foi retirado, colocado em um tubo eppendorf e o DNA foi seco a 37°C. O DNA foi ressuspensionado em 0,5-1 ml de TE e quantificado.

Em alguns casos, quando necessário, foi feita purificação com fenol e clorofórmio.

3.5.7- Extração do DNA plasmidial

3.5.7.1 - Mini-extração

As bactérias foram crescidas com agitação, 200 rpm, em 3,5 ml de meio líquido LB com o antibiótico apropriado, durante a noite a 37°C. As células foram coletadas por centrifugação durante 15 minutos, a 5000 rpm. Foram então ressuspensionadas em 300 µl de solução osmótica (item 3.4.19.4) e mantidas em gelo por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 6 µl de lisozima (50 mg/ml), 4 µl de RNase e 7,5 µl de EDTA 0,5 M, pH=8,2. Foi feita uma incubação por 15 minutos em gelo e após este período foram adicionados 150 µl de solução de lise (item 3.4.24), preparada no momento do uso. As células foram homogeneizadas lentamente e incubadas em gelo até a lise. Foi feita uma centrifugação de 25 minutos em microcentrífuga e o sobrenadante foi retirado cuidadosamente. Foram adicionados 300 µl de fenol, feita uma centrifugação de 5 minutos e retirada a fase superior. Então foram colocados 300 µl de clorofórmio e usado o mesmo tempo de centrifugação. A fase superior

foi retirada e foi colocado acetato de sódio para a molaridade final de 0,3M e dois volumes de etanol absoluto. Os tubos foram colocados a -20°C por, no mínimo, uma hora. Após este período, o material foi centrifugado a 12000 rpm, durante 20 minutos, e o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspensionado em 50 µl de TE.

3.5.7.2- Extração em grande escala

Inicialmente foi inoculada uma colônia isolada em 5ml de LB contendo o antibiótico apropriado. A cultura foi crescida durante a noite, conforme descrito no item 3.5.7.1. Esta cultura foi inoculada em 400 ml de LB contendo o antibiótico e crescida novamente durante a noite. Após este período, foi feita uma centrifugação de 10 minutos a 6000 rpm (4°C), o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 7,5 ml de solução osmótica (item 3.4.19.4) em gelo. Foi medido o volume final e completado para 10 ml com a mesma solução. Foram adicionados 200 µl de lisozima (50 mg/ml), os quais foram misturados lentamente. O material foi incubado em gelo por 10 minutos e foi colocado 100µl de RNase (10mg/ml) e 4 ml de EDTA 250 mM pH=8,2 e deixado no gelo 5 minutos. Foi colocado, então, o mesmo volume de tampão Triton (item 3.4.25) e misturado lentamente. Foi feita uma centrifugação por 1 hora (18000-20000 rpm), a 4°C. Após este período, foi retirado o sobrenadante e acrescentado à este, SDS para concentração final de 1%. Foi adicionado igual volume de fenol-clorofórmio e misturado lentamente por 5 minutos. Foi feita uma centrifugação de 5 minutos, a 5000 rpm e removida a fase superior. Depois foi feita a mesma extração somente com clorofórmio. Foi retirada a fase superior e a esta adicionados 0,1 volume de acetato de sódio 3M e dois volumes de etanol. O material foi incubado por uma hora a -20°C e centrifugado por 15 minutos a 5000 rpm. O precipitado foi seco e ressuspensionado em 5ml de TE.

3.5.8- Gradiente em cloreto de cério

Aos plasmídios obtidos na extração em grande escala (item 3.5.7.2) foram adicionados 5g de cloreto de cério e 150 µl de brometo de etídio

(10mg/ml). A solução foi colocada em um tubo de ultracentrífuga e este foi completado com Nujol. Foi feita uma centrifugação a 46000 rpm, durante 46 horas, a temperatura de 20°C. Após este período, a banda plasmidial foi coletada com o auxílio de uma seringa de 1 ml. O brometo de etídio foi retirado com álcool isoamílico e a solução foi colocada para dialisar em um litro de TE por três horas. Em seguida, o tampão TE foi trocado, e a solução de plasmídios foi dialisada durante toda a noite. O material foi retirado do saco de diálise e quantificado.

3.5.9- Método "Freeze-Squeeze" para recuperação de fragmentos de DNA do gel de agarose (TAUTZ & RENZ, 1983)

Após a corrida do DNA em gel de agarose, o fragmento desejado foi isolado cortando-se a banda correspondente. Esta banda foi colocada em uma solução de acetato de sódio 0,3M (1mM de EDTA, pH=7,0) em um tubo tipo corex. O tubo foi enrolado em papel alumínio e colocado no escuro por 15 minutos. Depois o bloco de gel foi transferido para um eppendorf pequeno (0,5ml), furado na tampa e no fundo, que possuía uma pequena camada de lã de vidro siliconizada no fundo. Em seguida, o eppendorf foi colocado em nitrogênio líquido e deixado congelar 1-2 minutos. Após este período, o material foi centrifugado 15 minutos, a 12000 rpm, tendo sido colocado antes o eppendorf pequeno dentro de um eppendorf normal (1,5 ml). O DNA eluído passou para o segundo tubo e a ele foi adicionado 1/100 do volume de MgCl₂ 1M/10% de ácido acético, e 2,5 volumes de etanol absoluto. O DNA foi colocado para precipitar a -20°C durante, no mínimo, uma hora. Foi então centrifugado a 12000 rpm durante 15 minutos, o precipitado lavado com etanol 70%, colocado para secar a 37°C durante 10 minutos e ressuspendido em 10 µl de TE.

3.5.10- Recuperação de plasmídios em *E.coli*

3.5.10.1- Utilização do DNA íntegro

Para recuperação dos plasmídios dos fungos transformantes, foi feita a transformação de *E.coli* com o DNA total íntegro destes transformantes (5mg de DNA) e foi feita a seleção em meio LB com ampicilina.

3.5.10.2- Utilização do DNA clivado

Em alguns casos, não foi possível o isolamento dos plasmídios em *E.coli* usando o DNA íntegro do fungo. Neste caso, foi feita uma clivagem parcial do DNA total dos transformantes e a ligação destes com a enzima DNA ligase como descrito por MANIATIS *et alii* (1982). Os fragmentos ligados foram, então, usados para transformar *E.coli* e feita a seleção em meio LB com ampicilina.

3.5.11- Transformação de bactérias

Uma colônia bacteriana foi inoculada em 3 ml de LB e deixada durante toda a noite, a 37°C, com agitação. Foram inoculados então 300 µl em 30 ml de meio LB, e o material aerado durante aproximadamente duas horas (OD=0,4). A partir desta etapa as células foram mantidas em gelo e foi usada sempre a centrífuga refrigerada a 4°C. As células foram coletadas por centrifugação, 5000 rpm, durante 5 minutos. Em seguida, elas foram ressuspensas em 5 ml de MgCl₂ 100mM gelado e novamente centrifugadas 5 minutos, a 5000 rpm. O precipitado foi ressuspensado em 5 ml de CaCl₂ 100mM e mantido em banho de gelo por 20 minutos. Então uma nova centrifugação foi feita, como nas etapas anteriores, e as células foram ressuspensas em 1 ml de CaCl₂ 100mM e deixadas em banho de gelo por 1-24 horas.

Para transformação foram colocados 100 µl de células por tubo de vidro gelado e adicionado o DNA (plasmidial ou DNA total). As células foram então deixadas 30 minutos a 0°C e 2 minutos a 42°C. Foram adicionados 400 µl de LB líquido e feita uma incubação de uma hora a 37°C. Foi feita, então, a semeadura das células em placas de Petri com meio LB contendo ampicilina.

3.5.12- Marcação das sondas de DNA

3.5.12.1- Randon-primer

Foi usada a seguinte reação:

30 μ l de DNA (50-100 ng)
10 μ l de solução de nucleotídeos
5 μ l de primer
3 μ l de dCTP (10 μ Ci/ μ l)
2 μ l de enzima klenow

A reação foi deixada a 37°C durante uma hora e depois foi passada em coluna de sephadex G-50.

3.5.13- Hibridação

3.5.13.1- Southern blot

Os DNAs clivados foram corridos em gel de agarose (0,7%) para separação dos diversos fragmentos de acordo com o peso molecular. Após a migração, o gel foi colocado em uma solução de desnaturação (item 3.4.23) durante 30 minutos com leve agitação. Em seguida, o gel foi lavado em água bidestilada e colocado durante o mesmo período em solução de neutralização (item 3.4.24). Foi então, novamente, lavado em água bidestilada. A transferência para membrana de nylon foi feita como descrito por MANIATIS *et alii* (1982). O gel foi colocado sobre um suporte coberto com papel Whatman 3MM que estava posicionado dentro de uma vasilha pirex com uma solução de SSC 10x. Sobre o gel foi colocado o filtro de nylon, cortado do mesmo tamanho deste e embebido em solução de SSC 10x, e sobre este duas folhas do mesmo tamanho, do mesmo papel de filtro que cobriu o suporte, também embebidas em SSC 10x. Todos os espaços ao redor do gel foram cobertos com plástico. Sobre a última camada de papel Whatman foram colocados 8 cm de papel toalha e em cima deste um peso apropriado. A transferência foi feita durante 12-18 horas.

O DNA foi fixado à membrana pela exposição da mesma à luz ultravioleta de 2-5 minutos ou em forno a 80°C durante duas horas. A pré-hibridação foi feita colocando-se a membrana em solução de hibridação durante duas horas, a 60-65 °C. Após este período, a solução foi retirada e foi adicionada a sonda, devidamente desnaturada a 95°C durante 5 minutos, em 10 ml de solução de hibridação. A hibridação foi feita durante 12-18 horas com agitação leve, a 60-65°C.

Após o período de hibridação, a sonda foi retirada e a membrana foi lavada com as soluções de lavagem. As primeiras lavagens foram feitas à temperatura ambiente em dois períodos de 15 minutos. A segunda solução de lavagem foi usada em duas lavagens de 15 minutos a 65°C. A terceira lavagem foi feita durante 10 minutos a 65°C.

Após as lavagens, as membranas foram envolvidas em plásticos e foi feita a exposição a um filme de raio-x.

3.5.14- Preparação das inclusões de DNA em agarose para corrida de eletroforese em campo pulsado

Após a última lavagem dos protoplastos, descrita no item 3.5.1.2, os protoplastos foram novamente centrifugados e ressuspensos na solução GMB, de modo que o número de protoplastos por ml ficasse maior que 3.10^8 . Estas células foram aquecidas a 42°C, misturadas com igual volume de 1,4% de agarose(FMC) preparada em GMB e mantidas a 42°C. A mistura foi homogeneizada lentamente, colocada em um molde e este foi inserido em banho de gelo durante 10 minutos para que a agarose solidificasse. As inclusões foram então colocadas em tampão NDS contendo proteinase K (1mg/ml) e mantidas durante a noite a 50°C. Após este período, o NDS foi trocado por EDTA 50mM pH= 8,0, contendo 1% de sarcosil e colocado a 50°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido duas vezes. As inclusões foram, por fim, estocadas em 50 mM de EDTA a 4°C.

3.5.15- Eletroforese em campo pulsado

O aparelho usado foi o CHEF DRII (BIO-RAD). Os tampões de corrida usados foram o TAE 0,5x e o TBE 0,5x e os parâmetros eletroforéticos foram os seguintes: pulsos de 50 minutos por 73 horas; em seguida, pulsos de 45 minutos por 18 horas, e por fim, pulsos de 37 minutos por 73 horas, a 46V (3V/cm). A concentração de agarose no gel foi de 0,7%. Para detecção de plasmídios livres foi usado um pulso inicial de 5s e final de 20s. A corrida foi feita durante 18 horas, a 200V. O gel foi preparado com uma concentração de agarose de 1%.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho o tópico " Resultados e Discussão" será apresentado em duas partes. A primeira parte será a caracterização molecular das linhagens "A" e "B" de *Aspergillus nidulans* e dos deteriorados V17, V5, V3 e V2, pela utilização da técnica de eletroforese em campo pulsado. Na segunda parte será mostrado um estudo da mutação v17, por meio do seu mapeamento, cruzamento com outros mutantes relacionados com a coloração dos conídios e serão apresentados e discutidos os resultados referentes à clonagem do gene v17 pela transformação do mutante com um banco genômico da linhagem selvagem construído em plasmídio.

4.1 - CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS "A" E " B" DE *A.nidulans* E SEUS VARIANTES POR ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS).

O fungo filamentoso *A.nidulans* possui um mapa genético bastante completo. A presença do ciclo sexual e parassexual possibilitou o mapeamento de centenas de mutações e a distribuição destas em oito grupos de ligação. Este microrganismo apresenta uma classe bastante interessante de mutantes, que são os mutantes que apresentam aberrações cromossômicas. Entre as aberrações cromossômicas mais estudadas em *A.nidulans* , as duplicações e translocações merecem especial destaque, devido a instabilidade mitótica observada em linhagens que apresentam este tipo de aberração.

As linhagens duplicadas "A" e "B" de *A.nidulans* começaram a ser estudadas em 1968 por NGA & ROPER. Estas linhagens apresentavam

instabilidade mitótica demonstrada pela presença de setores. Estes setores foram analisados geneticamente (NGA & ROPER, 1968; AZEVEDO & ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971) e foram descritos três tipos distintos. O primeiro tipo chamado "melhorado", originou-se por perda do segmento duplicado. No entanto, devido à presença de apenas três marcadores, não se podia determinar a extensão desta perda, pois também não se tinha conhecimento do tamanho exato do segmento duplicado. O segundo tipo de setor foi chamado "deteriorado" e apresentava uma morfologia bastante alterada em relação à linhagem original, tendo sido descritos vários tipos distintos de acordo com a sua origem. O terceiro tipo foi chamado "heterocariótico", pois apresentava uma mistura de conídios com núcleos que possuíam a duplicação e núcleos com perdas cromossômicas, que eram melhorados pois haviam perdido a duplicação, porém letais.

No presente trabalho foi feita a caracterização molecular das linhagens "A" e "B" de *A.nidulans* e seus variantes (V17,V5,V3, e V2) pela aplicação da eletroforese em campo pulsado. Estas linhagens, como citado anteriormente, apresentam uma duplicação de parte do cromossomo I, translocada para o cromossomo II, mostrando assim uma grande instabilidade mitótica, revelada pela presença constante de setores. A existência de alguns marcadores genéticos permitiu o acompanhamento da duplicação e a caracterização genética dos setores.

O sistema usado foi o CHEF-DR II (BIO-RAD), que apresenta um campo elétrico uniforme em todos os campos do gel e um ângulo de 120° de pulsos alternados. Este sistema tem sido usado para desenvolver cariótipos eletroforéticos em *A.nidulans* (BRODY & CARBON, 1989), *N.crassa* (ORBACH *et alii*, 1988), *P. megasperma* (HOWLETT, 1989), *C. gloeosporoides* (MARSEL *et alii*, 1990), etc.

Neste trabalho, inicialmente foram usadas as condições relatadas na pesquisa citada anteriormente. No entanto, foi observado que o cromossomo IV, isto é, o menor dos cromossomos, não apresentava uma nítida separação da banda formada pelos cromossomos III e VI (Figura 5, b). Esta separação só foi conseguida quando o tampão de corrida foi modificado, passando-se a utilizar o tampão TBE 0,5x (Figura 5, a). Foi observado que o

tampão TAE produzia uma maior migração, mas uma menor resolução da banda de menor peso molecular.

Em geral, na separação de grandes moléculas, tampões com alta força iônica como o TAE são preferidos, isto porque estes tampões permitem às moléculas se reorientarem de uma maneira mais rápida. Tampões como o TBE são geralmente usados para separação de moléculas menores que 1Mb. No entanto, este tampão foi usado na separação dos cromossomos de *N.crassa*, que apresenta cromossomos de até 12 Mb e no presente trabalho permitiu uma melhor resolução da banda de menor peso molecular (Figura 5).

Figura 5 - Gel de eletroforese em campo pulsado (CHEF) com cromossomos do fungo *A.nidulans* : a) tampão de corrida TBE 0,5x; b) tampão de corrida TAE 0,5x.

A Figura 5 mostra apenas um dos testes feitos inicialmente. A separação dos cromossomos e a sua organização por peso molecular, pode ser melhor observada na Figura 6. Nesta figura estão representados : 1) linhagem melhorada; 2) linhagem "A"; 3) linhagem "B"; 4) deteriorado V17 proveniente da linhagem "B"; 5) linhagem selvagem. Como se pode observar, tendo a linhagem selvagem como padrão, o maior cromossomo apresentado pelo fungo *A.nidulans* é o cromossomo VIII (5Mb) e o menor deles é o cromossomo IV (2,9 Mb).

Estes cromossomos foram classificados por BRODY & CARBON (1989), que descreveram pela primeira vez o cariótipo eletroforético de *A.nidulans*. O tamanho dos cromossomos foi estimado em 2,9-5,0 Mb, com o genoma total de aproximadamente 31Mb. As bandas cromossômicas foram classificadas na seguinte ordem: VIII (5Mb); VII (4,8Mb); II (4,2Mb); I e V (3,8Mb); III e VI (3,5Mb) e IV (2,9Mb). Estes cromossomos foram identificados por hibridação do gel com genes clonados, que possuíam sua localização bem mapeada pela genética clássica. As bandas duplas foram caracterizadas por meio da análise de linhagens que apresentavam translocações.

Estes resultados confirmam a análise citológica feita por ELLIOTT (1960) que investigando linhagens haplóides e diplóides de *A.nidulans*, mostrou que o número haplóide de cromossomos neste organismo era oito. Este resultado concordava com o obtido anteriormente por KAFER (1958), que, por meio da análise mitótica, demonstrou a existência de oito grupos de ligação neste microrganismo. Estes grupos de ligação foram classificados por AZEVEDO *et alii* (1983), que fizeram uma correlação entre estes e os cromossomos de *A.nidulans*, usando diferentes parâmetros, como: número de quebras cromossômicas, média de recessivos letais, unidades de recombinação, variantes morfológicas e sobrevivência de dissômicos ao EMS. Os grupos de ligação VIII, I e VII foram correlacionados aos maiores cromossomos, o II e o III aos médios e o IV, VI e V aos menores cromossomos. Este resultado está bastante próximo do apresentado por BRODY & CARBON (1989).

Na Figura 6, nas canaletas 2, 3 e 4, podemos observar as linhagens "A", "B" e o variante V17 de *A.nidulans*. Nestas linhagens a banda correspondente ao cromossomo II, que deveria possuir 4,2 Mb, desaparece e

surge uma nova banda de cerca de 5,2 Mb. A Figura 7 (a) mostra o resultado da hibridação do gel apresentado na Figura 6, com o gene wA de *A.nidulans*, que se localiza no cromossomo II. Este gene foi clonado recentemente por TILBURN *et alii* (1990). Esta hibridação confirma os dados obtidos pela genética clássica, demonstrando a presença da duplicação no cromossomo II de *A.nidulans*. A Figura 7(b) mostra uma outra hibridação, que foi feita neste mesmo gel, com o gene uapA, que se localiza no cromossomo I, na região duplicada. Este gene foi clonado por DIALLINAS & SCAZZOCCHIO (1991). Neste caso, pode ser vista a hibridação do gene em dois cromossomos distintos, nas linhagens duplicadas, e em apenas um cromossomo nas linhagens sem duplicações. As regiões de hibridação correspondem aos cromossomos I e II, demonstrando que o segmento duplicado presente no cromossomo II é parte do cromossomo I.

Isso indicou que o segmento duplicado possuía cerca de 1Mb. Na canaleta 1 desta mesma Figura, foi representada uma linhagem melhorada, amarela, proveniente da linhagem "A". Neste caso, todas as bandas cromossomais apresentam o mesmo peso molecular que a linhagem controle (canaleta 5, Figura 6), demonstrando que todo o segmento duplicado foi perdido.

Segundo NGA & ROPER (1968), os setores melhorados surgem devido à perdas, em tamanhos variados do segmento adicional. BARROS (1977) observou que os diâmetros dos núcleos de uma linhagem melhorada são semelhantes aos da linhagem controle e inferiores aos da linhagem "A". Foram formuladas duas hipóteses: 1) ocorrência de perda parcial do segmento translocado na linhagem melhorada; 2) perda total do segmento translocado nesta linhagem. Por meio da análise genética foi confirmada a hipótese 2, que afirma que todo o segmento translocado foi perdido na linhagem melhorada.

Os resultados apresentados na Figura 6, confirmam as análises feitas anteriormente, demonstrando que a linhagem melhorada perdeu todo o segmento duplicado.

Os setores deteriorados surgem como resultado de vários fenômenos, como: a) novas duplicações em "tandem"; b) perdas no segmento duplicado; c) translocações do determinante de deterioração para outros cromossomos. Para analisar esses setores quatro deteriorados foram escolhidos: V17, V5, V3 e V2. Esses deteriorados foram mapeados por AZEVEDO (1971) e

Figura 6 - Cariótipos eletroforéticos de linhagens de *A.nidulans* : 1) linhagem melhorada proveniente da linhagem "A"; 2) linhagem "A"; 3) linhagem "B"; 4) deteriorado V17; 5) linhagem selvagem.

Figura 7 - Cariótipos eletroforéticos de linhagens de *A.nidulans* : 1) linhagem melhorada proveniente da linhagem "A"; 2) linhagem "A"; 3) linhagem "B"; 4) deteriorado V17; 5) linhagem selvagem. Hibridados com os genes wA (a) e uapA (b) de *A.nidulans*.

apresentam os determinantes de deterioração nos cromossomos VII, VIII e II, respectivamente.

A Figura 8 mostra os cariótipos eletroforéticos dos deteriorados V17(2), V5(3), V2(4) e V3(5). Se for tomado como exemplo o deteriorado V17, canaleta 2, que carrega o determinante de deterioração no grupo de ligação VII, observa-se que o seu cromossomo VII é similar ao mesmo cromossomo presente na linhagem selvagem (Figura 8, canaletas 1 e 6). Neste caso, não se pode detectar a presença de grandes translocações envolvidas na determinação da deterioração. O segmento translocado, que seria o responsável pela deterioração, é sem dúvida bastante reduzido em relação a duplicação original, não podendo ser detectado nesta eletroforese. No caso, talvez fosse necessária a clivagem destes cromossomos, que apresentam determinantes de deterioração, com enzimas que cortam em sítios raros. Isto permitiria uma comparação mais detalhada dos fragmentos.

Na Figura 8, na canaleta 3, que representa o deteriorado V5, não se pode observar as bandas correspondentes aos cromossomos I e V. Talvez nas sucessivas repicagens tenha sido selecionada uma colônia V5 que perdeu o segmento duplicado no cromossomo I. Como a duplicação tem, em torno, de 1Mb, este cromossomo ficaria com um tamanho de 2,8 Mb e poderia migrar junto com o cromossomo IV (2,9 Mb), não sendo detectado. Pôde-se constatar, também, que o deteriorado V2 (canaleta 5) perdeu a duplicação original, no cromossomo II, passando a apresentar o mesmo padrão eletroforético da linhagem selvagem. Outro fator interessante é que nenhum dos deteriorados estudados parecem apresentar novas duplicações em "tandem", ou estas duplicações são tão pequenas que não podem ser detectadas neste tipo de eletroforese.

Figura 8 - Cariótipos eletroforéticos de linhagens deterioradas de *A.nidulans* :
1) linhagem selvagem; 2) deteriorado V17; 3) deteriorado V5;
4) deteriorado V2; 5) deteriorado V3; 6) linhagem selvagem.

Pelo conhecimento da extensão da duplicação, trabalhos posteriores poderão analisar o segmento duplicado, observando os genes que estão inseridos na duplicação e a participação destes genes na instabilidade genética, principalmente na produção de setores deteriorados. A utilização da eletroforese em campo pulsado é extremamente importante para a análise de aberrações cromossômicas e determinação dos fatores responsáveis pela instabilidade genética.

4.2 - CARACTERIZAÇÃO DO DETERIORADO V17 DE *A.nidulans*

O deteriorado V17 surgiu como um setor espontâneo na linhagem "B" de *A.nidulans*. A linhagem "B" devido à presença da duplicação cromossômica, produz constantemente setores, que podem ser classificados como melhorados ou deteriorados. Este mutante surgiu como um setor deteriorado e foi mapeado em 1970 por AZEVEDO & ROPER. Inicialmente ele foi caracterizado somente como um setor deteriorado que apresentava uma morfologia um pouco distinta da linhagem original e posteriormente foi observado que seus conídios apresentavam uma coloração distinta da linhagem selvagem. Ele apresentava uma atenuação na coloração dos conídios. O verde era muito mais claro que o normal, como observado na Figura 9. Esta Figura mostra a linhagem "A" (a) e o deteriorado V17 (b), podendo-se observar que a linhagem "A" produziu um setor melhorado amarelo.

Os esporos assexuais ou conídios do fungo *A.nidulans* apresentam uma coloração verde, que é dada por um pigmento presente nas suas paredes celulares. Este pigmento protege os conídios contra os raios ultravioleta. Diversos mutantes foram isolados que apresentam uma deficiência na produção ou na deposição deste sob a parede celular.

Entre os mutantes estudados, merecem especial destaque os mutantes *yellow* (*yA*), *white* (*wA*) e *fawn* (*fwA*) (CLUTTERBUCK, 1972; TIMBERLAKE, 1990). Estes mutantes controlam ou codificam enzimas que catalizam a síntese do pigmento da parede celular. Nesta classe podem também ser colocados os mutantes que afetam a estrutura da parede conidial. Foi

observado que a mutação wA é epistática a todas as outras mutações que afetam a pigmentação dos conidiósporos (PONTECORVO *et alii*, 1953; CLUTTERBUCK, 1972). Esta mutação confere ao conídio a cor branca, sendo observado por análise bioquímica e ultraestrutura da parede, que este mutante não possui alguns componentes estruturais desta, presentes no conídio selvagem, incluindo melanina e uma camada eletrodensa contendo 1,3-glucana (OLIVER, 1972; CLAVERIE-MARTIN *et alii*, 1988).

O gene yA se localiza no grupo de ligação I de *A.nidulans* e é responsável pela enzima conidial lacase, que participa da conversão do pigmento amarelo a verde. O mutante para esse gene, apresenta um forte pigmento amarelo e é completamente deficiente na produção desta enzima. O gene fwA no grupo de ligação VIII e seu produto ainda não foi estudado. Este mutante não apresenta qualquer deficiência com relação à enzima lacase e confere aos conídios um pigmento "verde-palha".

Como o determinante de deterioração v17 representa um novo gene para coloração de conídios, não se sabendo nada sobre a sua relação com outros genes de pigmentação, foram obtidos mutantes duplos com os genes yA e fwA. A Figura 10 mostra os mutantes simples e duplos, onde se pode observar o efeito do gene v17 sobre fwA e yA, provocando uma atenuação na coloração dos conídios. Estudos bioquímicos mais detalhados devem ser feitos para avaliar a causa desta diminuição da pigmentação. É provável que o mutante v17 apresente, assim como wA, alterações na parede celular que dificultariam a deposição do pigmento. Para avaliar este fator poderão ser feitas futuramente análises com a ajuda da microscopia eletrônica, para a observação da deposição do pigmento na parede celular e para uma melhor caracterização deste gene.

No presente trabalho foi feito um novo mapeamento do deteriorado V17 por meio do cruzamento com linhagem master "MSF", análise pelo ciclo parassexual e sexual.

Figura 9 : Linhagens de *A.nidulans* : a) linhagem "A" com um setor melhorado;
b) deteriorado V17.

Figura 10 - Linhagens de *A.nidulans* : 1) linhagem "A" com um setor melhorado
2) setor melhorado amarelo da linhagem "A"; 3) mutante fwA;
4) deteriorado V17; 5) duplo mutante v17; vA; 6) duplo mutante v17;
fwA.

Tabela 2 - Análise mitótica dos segregantes do cruzamento do mutante v17 com linhagem "MSF".

Grupo de ligação	Marcadores Genéticos	Selvagem	v17
I	pro ⁺ paba ⁺	14	11
	pro ⁻ paba ⁻	3	3
II	Acr ⁺	0	0
	Acr ⁻	17	14
III	gal ⁺	9	9
	gal ⁻	8	5
IV	pyro ⁺	5	6
	pyro ⁻	12	8
V	fac ⁺	17	14
	fac ⁻	0	0
VI	sB ⁺	17	13
	sB ⁻	0	1
VII	nic ⁺	0	14
	nic ⁻	17	0
VIII	ribo ⁺	7	9
	ribo ⁻	10	5

Tabela 3 - Análise meiótica do cruzamento da linhagem "MSF" com o deteriorado V17.

Grupo de Ligação	Marcadores Genético	Colônias v17 ⁺	Colônias v17 ⁻	Frequência de recombinação	s
VII	nicB ⁺	5	19	16%	+ 5,1%
	nicB ⁻	24	3		

De acordo com os resultados obtidos com a análise mitótica (Tabela 2), pôde-se concluir que o gene v17 se localiza no cromossomo VII de *A.nidulans* como descrito por AZEVEDO & ROPER(1970). Esta tabela mostra também que parece ter havido uma seleção contra os grupos de ligação que carregam as mutações sB e fac. Possivelmente, isso ocorreu ao acaso, uma vez que não foram detectados na linhagem V17, aberrações envolvendo esses cromossomos. Outro fator observado, foi a ausência de segregantes acridina sensíveis. É provável que isso tenha ocorrido devido à presença da duplicação no cromossomo portador deste gene, acrA⁺, levando a uma seleção contra segregantes portadores desta duplicação.

A Tabela 3 mostra a análise meiótica, feita por meio do cruzamento do deteriorado V17 com a linhagem master "MSF". Pela frequência de recombinação observada o gene v17 está ligado ao gene nicB. Em trabalhos posteriores poderá ser feito um mapeamento com outros mutantes localizados próximos a esses dois genes.

4.3 - Clonagem do gene v17 de *A.nidulans*.

As linhagens "A" e "B" de *A.nidulans* apresentam uma alta instabilidade mitótica, dando origem a setores deteriorados que são mapeados nos diversos grupos de ligação. Acredita-se que esta instabilidade possa ser decorrente da presença de um elemento genético móvel que poderia ter sido ativado pela duplicação. Há dezenas de anos essas linhagens e seus derivativos

vêm sendo estudadas, no entanto, os trabalhos têm sido limitados somente a análise genética clássica, necessitando agora de um estudo ao nível molecular.

Uma das dificuldades para o estudo dos variantes deteriorados é que, como o nome indica, eles apresentam, em geral, colônias com menor crescimento e reduzida esporulação. No entanto, seu estudo e manipulação ao nível molecular é possível.

Para análise molecular do fator que determina a deterioração, o primeiro passo seria clonagem dos genes responsáveis por essa característica. Poderia ser escolhido um deteriorado que apresenta uma certa estabilidade. A clonagem poderia ser feita por transformação do deteriorado com um banco genômico de uma linhagem selvagem e complementação da mutação, como descrito por MAYORGAN & TIMBERLAKE (1990).

Segundo MOLINA & AZEVEDO (1990) colônias deterioradas quando colocadas em alta pressão osmótica produzem fenocópias de linhagens normais. Isto dificultaria, em uma clonagem por transformação, a seleção do transformante com morfologia normal, isto é, esporulação eficiente e crescimento similar à linhagem "A" ou "B". Como, após a transformação, os protoplastos seriam regenerados em meio com estabilizador osmótico, isto é, neste meio eles seriam fenocópias de colônias normais. Para seleção do transformante desejado seria necessária a transferência de cada colônia para um meio sem estabilizador osmótico. Em uma clonagem gênica não se pode prever com exatidão quantos transformantes serão necessários para a clonagem de um determinado gene. Isto iria depender de vários fatores, inclusive do estado do banco gênico usado.

Por todos esses fatores, o ideal seria analisar um deteriorado com uma certa estabilidade mitótica, em que a deterioração estivesse relacionada com um único gene e pudesse ser selecionada a complementação da mutação em meio com alta osmolaridade. Neste caso, entre mais de cem deteriorados existentes, o variante V17 foi escolhido. Ele se apresentava como um candidato ideal, uma vez que tinha surgido espontaneamente na linhagem "B" de *A.nidulans*, foi originado por mutação em um único gene, apresentava baixa taxa de reversão e a complementação da sua mutação poderia ser selecionada em meio com alta osmolaridade. Além disso, sua clonagem seria extremamente importante para o estudo de pigmentação em *A.nidulans*.

A técnica de transformação gênica vem sendo bastante utilizada para a clonagem de genes em *A.nidulans*, uma vez que é possível a obtenção de um grande número de transformantes; a construção de um banco genômico é uma tarefa relativamente simples e é possível a recuperação do plasmídio mesmo quando este está integrado no DNA do fungo.

Esta clonagem envolve : a) a construção de um banco genômico de uma linhagem de *A.nidulans* selvagem em um plasmídio que possua um gene marcador (argB) para seleção dos transformantes; b) a presença da mutação correspondente ao gene presente no plasmídio (argB), que será usada para seleção dos transformantes, na linhagem receptora (V17); c) transformação da linhagem receptora com o banco genômico e seleção dos transformantes em meio seletivo; d) isolamento e purificação do transformante que apresentou a complementação da mutação, isto é, passou a apresentar fenótipo selvagem; e) extração do DNA; f) recuperação do plasmídio em *E.coli* e análise molecular do mesmo.

4.3.1 - Introdução da marca argB no deteriorado V17.

Para a clonagem do gene v17, foi usado um banco genômico construído no plasmídio pFB39 (Figura 11). Este plasmídio é formado pelo vetor pUC8 e o gene argB de *A.nidulans*. Este banco foi constituído de fragmentos de DNA de 5Kb, digeridos parcialmente por *Sau3A* e inseridos no sítio *BamH1* deste vetor. Para a seleção dos transformantes do deteriorado V17 com este banco genômico, foi necessária a introdução da marca arginina (argB) neste deteriorado. Para isso, foi feito um cruzamento com uma linhagem argB de *A.nidulans* e seleção dos segregantes argB; v17. A Tabela 4 mostra o número de cleistotécios analisados, onde é claramente demonstrada a segregação 1:1 do gene v17, confirmando que se trata de um caráter monogênico.

Os segregantes que apresentavam a mutação v17, foram organizados em placas mestras e foram analisados em meio seletivo. Foram escolhidos três segregantes que apresentavam o genótipo v17; argB. No entanto, dois destes apresentaram após sucessivas repicagens, uma certa

instabilidade demonstrada pela presença de setores selvagens. Até este momento a linhagem jamais havia apresentado setores selvagens, demonstrando que esta instabilidade poderia estar associada com o "background" dos segregantes. Isto tornou ainda mais interessante a clonagem deste gene e futuro sequenciamento da mutação.

Finalmente foi escolhido o segregante designado V17.3, pois foi o terceiro segregante analisado, que apresentava o genótipo pabaA; argB; v17. Foi observado durante a análise que este segregante também apresentava a duplicação cromossômica.

Figura 11 - Plasmídeo pFB39 (BUXTON *et alii*, 1985) que é formado pelo vetor pUC8 e o gene argB de *A.nidulans*. . Amp^r: resistência à ampicilina.

Tabela 4 - Fenótipo dos segregantes da linhagem V17 com a linhagem pirG; argB de *A.nidulans*.

Cleistotécios Analisados	Fenótipo dos segregantes			X ²
	Normal	v17	Total	
1	64	83	147	2,44 ns
2	53	44	97	0,84 ns
3	297	316	613	0,60 ns

4.3.2 - Transformação da linhagem V17.3 com um banco genômico de *A.nidulans*.

Para transformação da linhagem V17.3 de *A.nidulans* com o banco genômico construído em plasmídio, foram usadas 10 alíquotas de uma mesma preparação de protoplastos, contendo cerca de 10^8 protoplastos e a cada alíquota foram adicionados 14 µg de DNA plasmidial. A detecção das colônias transformadas foi feita em meio mínimo contendo ácido p-aminobenzóico. Cada alíquota foi semeada em uma única placa de Petri. A Tabela 5 mostra o resultado das transformações.

Tabela 5 : Número de transformantes da linhagem V17.3 de *A.nidulans* com o banco genômico construído no vetor pFB39.

Transformações	Transformantes <u>argB</u> ⁺	Transformantes <u>v17</u> ⁺
<hr/>		
1	305	0
2	202	0
3	241	0
4	223	0
5	300	1
6	254	0
7	280	0
8	305	0
9	301	0
10	200	0
Total	2611	1

Como se pode observar, de 2611 transformantes, foi obtido somente um transformante com fenótipo selvagem. Este transformante foi denominado TV17.3. Como citado anteriormente, durante a clonagem gênica por transformação, o número de transformantes necessários para se clonar um gene é extremamente variável. Isto pode ser bem exemplificado em *A.nidulans*. JOHNSTONE *et alii* (1985) descreveram a clonagem do gene brlA de *A.nidulans* utilizando um banco genômico construído no plasmídio pILJ16, que apresenta o marcador argB. Foram isolados 2.10^4 transformantes arg⁺ dos quais três apresentavam fenótipo brl⁺. YELTON *et alii* (1985) clonaram o gene vA usando um banco genômico construído no cosmídio pKBY2, que contém o

gene trpC de *A.nidulans*. Foram obtidos três transformantes que complementavam a mutação yA entre 1.10³ transformantes trp⁺ analisados. ADAMS et alii (1992) isolaram e caracterizaram o gene acoD de *A.nidulans*. Foi utilizado para isto uma biblioteca construída no plasmídio pGM3, que possui o gene pyr4 de *N.crassa*. Aproximadamente 500 transformantes foram selecionados e destes, um apresentou a complementação da mutação.

A linhagem V17.3 apresentou uma baixa frequência de transformação (aproximadamente 19 transformantes/ μ g de DNA). Esta frequência é extremamente baixa em *A.nidulans*, onde, em transformações com o plasmídio pDJB3 (BALLANCE & TURNER, 1985), é possível a obtenção de até 5000 transformantes/ μ g de DNA. Possivelmente devido à presença da duplicação cromossômica, esta linhagem seja bastante refratária à integração de DNA exógeno, que provocaria um desequilíbrio ainda maior em seu genoma, tornando assim grande parte dos transformantes inviáveis.

4.3.3 - Análise do transformante TV17.3.

O primeiro passo para a caracterização do transformante TV17.3 foi a comprovação de que se tratava realmente de um transformante e não de um simples contaminante. Para isso, primeiro foi verificada a presença do marcador pabaA no transformante selecionado, e em seguida foi feita a extração do DNA e a clivagem com a enzima *XhoI*, que não cliva o vetor. A clivagem com uma enzima de restrição que não corta o vetor permite a detecção pela hibridação, do número de integrações ocorridas. É possível assim, determinar se a integração ocorreu em um único sítio no genoma do fungo e se ela é homóloga ao gene usado como marcador (argB).

O DNA clivado foi corrido em gel de agarose 0,8% e transferido para uma membrana de nylon (SOUTHERN, 1975). Foi então feita a hibridação com os plasmídios pUC8 e pFB39, como observado na Figura 12. Quando o DNA clivado foi hibridado com o plasmídio pUC8 foi observada a presença de uma única banda na linhagem transformada (Figura 12, a-2), comprovando a autenticidade do transformante, pois não existe no genoma de *A.nidulans* qualquer sequência homóloga à sequência de DNA do plasmídio pUC8. Foi

demonstrado assim, que se tratava de uma integração simples. Esse mesmo DNA hibridado com o plasmídio pFB39 (Figura 12, b-2) apresentou duas bandas de hibridação, uma que representa o gene argB presente na linhagem receptora (Figura 12, b - 1) e outra que mostrava o próprio plasmídio integrado. Pôde-se constatar que se tratava de uma integração heteróloga à arginina, pois a banda que representa este gene está intacta, isto é, apresenta o mesmo tamanho observado na linhagem selvagem. No caso de uma integração homóloga à arginina, este gene, presente no genoma do fungo, deveria apresentar uma banda de peso molecular superior ao observado na linhagem controle.

Figura 12 - DNA total das linhagens de *A.nidulans*, selvagem (1) e o transformante TV17.3, clivados com a enzima *XhoI* e hibridados com o plasmídio pUC8 (a) e pFB39 (b).

4.3.4 - Transformação de *E.coli* com o DNA total do transformante TV17.3

Após a obtenção do transformante que apresentou a complementação da mutação na linhagem V17, o próximo passo foi a

recuperação do plasmídio recombinante, que apresentava o gene v17, uma vez que complementava esta mutação.

O plasmídio pFB39 é integrativo, não sendo possível sua autoduplicação dentro do fungo. Isto dificulta um pouco a recuperação do DNA do transformante, uma vez que ele se encontra integrado no genoma do fungo. JOHNSTONE *et alii* (1985) demonstraram que era possível recuperar o plasmídio pILJ16 (que é similar ao pFB39) integrado no genoma de *A.nidulans*, transformando células competentes de *E.coli* com o DNA genômico do transformante não digerido.

Para recuperação do plasmídio recombinante, foram usadas cinco alíquotas de 10µg de DNA íntegro do transformante TV17.3, para transformar células competentes de *E.coli* DH5α e feita a seleção em meio com ampicilina. Não foram obtidas colônias resistentes à ampicilina. Uma segunda estratégia foi usada. O DNA total do transformante foi digerido parcialmente com a enzima *XhoI*, que não cliva o vetor e feita a ligação dos fragmentos com a enzima DNA ligase. Esse material foi usado para uma nova transformação da bactéria e foram obtidas 30 colônias de *E.coli* resistentes à ampicilina.

Os plasmídios dessas colônias foram extraídos e clivados com a enzima *HindIII*. Deste modo, eles foram classificados em cinco grupos distintos, como mostra a Figura 13.

Esses plasmídios foram purificados e usados para transformar novamente a linhagem V17.3 de *A.nidulans*. A maior parte deles complementou a mutação v17 em baixa frequência, possivelmente devido à presença de somente parte do gene v17, nestes plasmídios. Quando um plasmídio carrega apenas parte de um gene que se deseja selecionar, a única possibilidade de complementação da mutação é se houver uma integração homóloga, diminuindo enormemente o número de transformantes obtidos. Foi selecionado então o plasmídio 3 que apresentou uma frequência de 80% dos transformantes com complementação da mutação v17, demonstrando que possivelmente o gene v17 estaria completo neste plasmídio.

O aparecimento de transformantes que mantém o fenótipo V17 após a transformação com um plasmídio que carrega este gene, pode ser explicada pelo tipo de integração ocorrida. Como a seleção dos transformantes é feita para arginina, o gene v17, pode ser inativado durante a integração,

como mostra a Figura 14. No caso, se a integração ocorreu por um simples crossing-over dentro do gene v17, este gene ficaria dividido em dois fragmentos separados pelo vetor. Outro tipo de integração que provocaria o mesmo resultado seria a ocorrência de troca gênica em relação ao gene arginina, como mostra a Figura 14. Neste caso o vetor, juntamente com o gene v17 e o gene argB mutante, seriam eliminados.

Figura 13 - Padrões de restrição dos plasmídios recuperados após a transformação da bactéria *E.coli* com o DNA total do transformante TV17.3 clivado parcialmente com a enzima *HindIII* e religado.
a) plasmídio pFB39; 1,2,3,4, e 5) plasmídios recuperados

Figura 14 - Tipos de integrações que podem provocar a manutenção do fenótipo V17 em linhagens transformada com o plasmídio que carrega este gene: a) permuta simples envolvendo o gene v17 que é dividido em duas partes; b) permuta dupla envolvendo o gene argB. Neste caso argB⁺ substitui argB⁻ no cromossomo.

4.3.5 - Análise dos transformantes obtidos com o plasmídio 3

Durante a análise e purificação dos transformantes obtidos com o plasmídio 3, foi observada a existência de dois tipos de transformantes. O primeiro tipo apresentava uma alta estabilidade para a marca v17, não tendo sido observado revertentes mesmo em meio não seletivo (Figura 15). O segundo tipo mostrou uma alta instabilidade em meio não seletivo, sendo possível a visualização de diversos setores que haviam perdido o plasmídio inserido, isto é, que apresentavam o fenótipo V17. Estes setores também eram deficientes para a síntese de arginina, o que demonstrava a perda do plasmídio. Um transformante de cada tipo foi escolhido para uma análise mais detalhada. Eles foram denominados TVE (transformante estável) e TVI (transformante instável) e são mostrados na Figura 15.

Para determinar a estabilidade mitótica destes transformantes, foram preparadas suspensões de conídios dos transformantes TVE e TVI e semeadas em meio seletivo e não seletivo, como mostrado na Tabela 6. Em meio não seletivo, o transformante TVI apresentou uma frequência de 6% de colônias v17, que haviam perdido o marcador arginina. No entanto, o transformante TVE, mesmo em meio não seletivo, jamais apresentou uma colônia v17, tendo-se mostrado extremamente estável para essa integração.

UPSHALL(1986) analisou a estabilidade mitótica de transformantes para o gene argB. Foram estudados trinta e três transformantes, dos quais trinta e um apresentaram uma frequência baixa ou a ausência de revertentes argB⁻. Os outros dois foram classificados como transformantes mitoticamente "instáveis". Esta instabilidade foi associada com uma possível heterocariose. BARNES & MACDONALD (1986) estudaram transformantes obtidos com o plasmídio pDJB1 (plasmídio pBR350 mais o gene pvr4 de *N.crassa*). Eles observaram que estes transformantes apresentavam uma alta instabilidade mitótica para a marca introduzida. Foi sugerida a possibilidade de autoduplicação do plasmídio para explicar a instabilidade obtida.

Os transformantes TVE e TVI antes de serem analisados, foram submetidos a vários ciclos de purificação por colônia monospórica,

impossibilitando assim a manutenção de um estado heterocariótico. Este é um procedimento indispensável, uma vez que os protoplastos usados na transformação são multinucleados, podendo ser produzidos heterocários.

Figura 15 - Transformantes TVE (a) e TVI (b) de *A.nidulans*.

Tabela 6 - Porcentagem de colônias v17 obtidas após a semeadura dos conídios dos transformantes TVE e TVI de *A.nidulans*.

Transformantes	MM + paba		MM + paba + arg	
	v17 ⁻	v17 ⁺	v17 ⁻	v17 ⁺
TVI	0	100	6	94
TVE	0	100	0	100

Os transformantes foram então cruzados com a linhagem argB; pvrG de *A.nidulans*, isto é, que era selvagem em relação ao gene v17 e analisado o fenótipo dos segregantes obtidos (Tabela 7). No caso da ocorrência de uma integração heteróloga, quando se cruza esse tipo de transformante com uma linhagem selvagem para o caráter analisado, é esperada a ocorrência de 25% de segregantes com fenótipo mutante. Isto porque este transformante vai possuir um gene selvagem e um gene mutante em locais distintos.

Tabela 7 - Porcentagem de segregantes v17 obtidos após o cruzamento dos transformantes TVE e TVI com uma linhagem argB; pvrG (A.U.) de *A.nidulans*

Cruzamentos	% de Segregantes	
	v17 ⁺	v17 ⁻
TVI x A.U.	62	38
TVE x A.U.	66	34

Como se pode observar na Tabela 7, mais de 25% dos segregantes do cruzamento dos transformantes TVI e TVE com uma linhagem selvagem para o gene v17, apresentaram a mutação v17, indicando que provavelmente

nestes dois transformantes houve integração heteróloga do plasmídio. Para confirmar estes resultados foi feita a análise molecular dos transformantes pelo Southern blot. Foram extraídos os DNAs destes transformantes, clivados com as enzimas *BamH1* e *EcoR1* e hibridados com o plasmídio 3 íntegro (Figura 16).

Figura 16 - DNA total de linhagens de *A.nidulans*: 1 e 7 plasmídio 3; 2 e 8 linhagem selvagem; 3 e 9 mutante V17.3; 4 e 10 transformante TVI; 5 e 11 setor V17 do transformante TVI; 6 e 12 transformante TVE. Clivados com as enzimas *BamH1* (1 a 6) e *EcoR1* (7 a 12) e hibridados com o plasmídio 3.

Devido à instabilidade mitótica apresentada pelo transformante TVI em meio não seletivo e o fato deste apresentar um padrão de restrição igual ao do plasmídio livre, quando clivado com as mesmas enzimas (Figura 16), foi testada a hipótese da existência deste plasmídio de uma maneira livre, isto é, não integrado, dentro do transformante TVI, uma vez que estas são características apresentadas por plasmídios que se autoduplicam.

No caso do plasmídio estar integrado no genoma do fungo, às bandas pertencentes ao plasmídio, no DNA dos transformantes, deveriam estar modificadas em relação às bandas do plasmídio livre, como observado no transformante TVE.

Como pode ser observado, o transformante TVI apresentou um padrão de restrição semelhante ao plasmídio 3 não integrado, o que poderia indicar a presença do plasmídio livre neste transformante. Isto poderia explicar o grande número de setores observados nesta linhagem, quando crescida em meio não seletivo. No entanto, o transformante estável TVE demonstrou integração heteróloga a v17 e argB, confirmando os dados obtidos pela genética clássica. Outro fator interessante é que se for comparado o padrão de restrição apresentado pela linhagem selvagem (2 e 8) com o padrão mostrado pela linhagem V17 (3 e 9), observa-se que não há qualquer diferença nestes dois tipos. Isto indica que se existe um elemento transponível provocando esta mutação, ou ele é muito pequeno, não podendo ser visualizado neste tipo de eletroforese, ou ele está integrado fora do gene v17, mas nas proximidades deste, provocando a sua inativação. Esta dúvida só será solucionada quando for feito o seqüenciamento do gene e análises relacionadas com a metilação.

Para demonstrar se o plasmídio 3 encontrava-se livre, duplicando-se autonomamente no transformante TVI, dois métodos foram usados. Primeiro, foi feita a transformação de *E.coli* com o DNA total íntegro deste transformante. No caso, se o plasmídio estivesse livre seria esperada a presença de um grande número de transformantes após seleção em meio com ampicilina. O segundo método foi correr o DNA íntegro deste transformante em gel de agarose, transferi-lo por Southern blot e hibridá-lo com o plasmídio. No caso, como o plasmídio apresenta peso molecular bastante inferior ao peso de

qualquer cromossomo de *A.nidulans*, ele deveria migrar, no caso de estar livre, separado do DNA genômico.

Para analisar esta possibilidade foi utilizado o aparelho de eletroforese em campo pulsado (CHEF), onde foram usados parâmetros que permitissem a separação de uma molécula de baixo peso molecular, mas que não separasse os cromossomos de *A.nidulans*. A Figura 17 mostra esta eletroforese, onde, pela presença do marcador de peso molecular (lambda clivado com *HindIII*) poderiam ser detectadas moléculas de DNA de 4 ->22 Kb e os cromossomos do fungo permaneceriam juntos em uma única banda. Após a hibridação com o plasmídio pUC8, foi observado que este plasmídio hibridou com as bandas cromossomais de *A.nidulans* e não foi detectado qualquer banda correspondente à presença de plasmídios livres, como demonstrado na Figura 17.

Foram preparadas cinco alíquotas de células competentes de *E.coli* e transformadas com 5µg de DNA íntegro do transformante TVI. A seleção dos transformantes foi feita em LB mais ampicilina. Nenhum transformante foi obtido. Neste caso, foi descartada a possibilidade da existência de plasmídios livres no transformante TVI.

Figura 17 - Eletroforese em campo pulsado : 1) plasmídio 3; 2) mutante V17.3; 3) transformante TVI; 4) transformante TVE (Foto a). Hibridação (Foto b) com o plasmídio pUC8.

4.3.6 - Análise do plasmídio 3 de *A.nidulans*.

Uma vez demonstrado que o plasmídio 3 possuía todo o gene v17, isto porque estava integrado de maneira heteróloga e mesmo assim complementava a mutação, o próximo passo seria a localização deste gene dentro do plasmídio, pois o plasmídio 3 apresenta 19 Kb e certamente o gene v17 possui um tamanho muito inferior a este. A estratégia utilizada foi retirar fragmentos ordenados do plasmídio até a obtenção do menor fragmento capaz de complementar a mutação. Para isso foi escolhida a enzima *EcoRI*, que cliva o plasmídio em três bandas, duas bandas em torno de 7,5-7,8 Kb e uma banda de aproximadamente 4,5 Kb.

Inicialmente foi retirada a banda de 4,5Kb, e assim um novo plasmídio foi obtido, denominado 3.1 (Figura 18). Este plasmídio foi usado para transformar novamente a linhagem original V17.3 e foi observada a complementação da mutação. Em seguida foi retirada a banda de 7,8 Kb, restando o plasmídio pFB39 mais um fragmento de 2Kb. Este plasmídio foi designado 3.2, mas ele não foi capaz de complementar a mutação v17, quando usado para transformar a linhagem V17.3. Isto demonstrou que o fragmento de 7,5 Kb possuía o gene v17. Foi feito então um mapa de restrição do plasmídio 3.1, como se pode observar na Figura 19.

Figura 18 - Plasmídio 3 e seus derivados (3.1 e 3.2), originados por meio de clivagens com a enzima *EcoRI* e ligação dos fragmentos.

Figura 19 - Mapa de restrição do plasmídio 3.1 que carrega o gene v17 de *A.nidulans* com as enzimas de restrição *BamHI* (B), *EcoRI* (E) e *HindIII* (H).

Para confirmar a localização do gene v17 no cromossomo VII de *A.nidulans*, foi feita a hibridação de parte do plasmídio 3.1 (o fragmento *HindIII* de cerca de 2Kb) com os cromossomos deste organismo separados por eletroforese em campo pulsado (CHEF). Foram incluídos também no gel os transformantes TVI e TVE. Como mostrado na Figura 20 a hibridação do fragmento ocorreu no cromossomo VII, confirmando os dados obtidos pela genética clássica e foi confirmada também a integração heteróloga ocorrida nos transformantes TVE e TVI. A integração do plasmídio nestes transformantes pode ter ocorrido no cromossomo III, que forma uma única banda com o cromossomo VI, não sendo, no entanto, homóloga ao gene argB.

Figura 20 - Separação de cromossomos de linhagens de *A.nidulans* (a). Canaletas: 1 - linhagem selvagem; 2-3 - linhagem "A"; 4 - linhagem melhorada; - 5 - deteriorado V17; 6 - deteriorado V17.3; 7 - transformante TVI; 8 - transformante TVE; 9 - linhagem selvagem. Hibridação com o fragmento *HindIII* do gene v17 (b).

Novos trabalhos podem ser sugeridos para complementação dos estudos aqui iniciados. Poderá ser feito, por exemplo, o seqüenciamento do gene v17 selvagem, como também da mutação e desta maneira poderão ser esclarecidas algumas perguntas relacionadas com o papel da duplicação cromossômica nesta mutação. Este trabalho representa a primeira tentativa de esclarecimento da instabilidade cromossômica gerada pela duplicação presente nas linhagens "A" e "B" de *A.nidulans* por técnicas de genética molecular. Muitas questões ainda necessitam ser respondidas, mas a primeira pedra, sem dúvida, está lançada e permitirá que a instabilidade genética em *A.nidulans*, associada com aberrações cromossômicas, possa ser melhor compreendida.

5- CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos no presente trabalho pôde-se concluir que:

- 1) A técnica de eletroforese em campo pulsado (pulsed-field) se constitui uma valiosa ferramenta para análise de linhagens com duplicações cromossômicas e localização de genes;
- 2) As linhagens duplicadas "A" e "B" de *A.nidulans* apresentam um segmento duplicado de cerca de 1Mb , que está ausente em linhagens melhoradas e presente na maioria dos deteriorados analisados neste trabalho;
- 3) A mutação v17 se localiza no cromossomo VII de *A.nidulans* e é responsável pela atenuação na cor do conídio;
- 4) A clonagem de genes pela transformação em *A.nidulans* é uma técnica bastante eficiente, sendo possível recuperar o plasmídio inserido mesmo se ele se encontra integrado no genoma do fungo;
- 5) As colônias transformadas ,mesmo contendo o DNA integrado em seu genoma, podem apresentar instabilidade mitótica em meio não seletivo, revelada pelo constante aparecimento de setores;

6) A mutação v17 não foi provocada pela translocação de todo segmento duplicado para o cromossomo VII.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, THOMAS H.; YAGER, LAWRENCE N. & LEE BEE N. A. Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. Molecular and Cellular Biology, Washington, 12: 3827-3833, 1992.
- AKINS R. R. & LAMBOWITZ, A. M. A general method for cloning *Neurospora crassa* nuclear genes by complementation of mutants. Molecular and Cellular Biology, Washington, 5: 2272-2278, 1985.
- ANAYA, N. & RONCERO, M. I. G. Transformation of a methionine auxotrophic mutant of *Mucor circinelloides* - Direct cloning of the corresponding gene. Molecular and General Genetics, New York 230: 449-455, 1991.
- APIRION, D. A general system for the automatic selection of auxotrophs and prototrophs and vice-versa in microorganisms. Nature, London, 195: 959-961, 1962.
- AZEVEDO, J. L. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. England, 1971. 240p. (PhD Thesis- University of Sheffield)
- AZEVEDO, J. L. & ROPER, J. A. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: successive and transposable genetic change. Genetical Research, London, 16: 79-93, 1970.

- AZEVEDO, J.L.; OLIVEIRA, A. & ROCHA CAMPOS, A.J. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 2: 237-41, 1976.
- AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. & DANTAS-DARCE, M.M.C. Survival of haploid, diploid and disomic conidia of *Aspergillus nidulans* to mutagenic agents. Revista de Biologia, São Paulo, 12: 271-278, 1983.
- 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.
- BALLANCE, O. J. & TURNER, G. Development of a high frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. Current Genetics, Berlin, 10: 767-775, 1985.
- BANCROFT, I. & WOLK, C. P. Pulsed homogeneous orthogonal field gel electrophoresis (PHOGE). Nucleic Acids Research, Oxford, 16: 7405-7418, 1988.
- BARNES, D. E. & McDONALD, D. W. Behaviour of recombinant plasmids in *Aspergillus nidulans*. Current Genetics, Berlin, 10: 767-775, 1986.
- BARROS, J.P. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, 1977, ESALQ/USP (Dissertação de Mestrado).
- BEGUERET, J.; RAZAMPARANY, V.; PERROT, M. & BARREAU, C. Cloning of geneura 5 for the orotidine acid pyrophosphorylase of the filamentous fungus *Podospora anserina*. Gene, Amsterdam, 32: 487-492, 1984.
- BENNINGER, D. M.; SKRYNIA, C.; PUKKILA, P. J. & CASSELTON, L. A.

- DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus* European Molecular Biology Organization, Oxford, 6: 835-840, 1987.
- BERGES, T. & BARREAU, C. Heat shock at an elevated temperature improves transformation efficiency of protoplasts from *Podospora anserina*. Journal of General Microbiology, London, 135: 601-604, 1989.
- BERI, B. K. & TURNER, G. Transformation of *Penicillium chrysogenum* using the *Aspergillus nidulans* *amdS* gene as a dominant selective marker. Currents Genetics, Berlin, 11: 639-641, 1987.
- BEJ, A. K. & PERLIN, M. H. A high efficiency transformation system for the basidiomycetes *Ustilago violacea* employing hygromycin resistance and lithium-acetate treatment. Gene, Amsterdam, 80: 171-176, 1989.
- BOS, C. J. & SLAKHORST, S. M. Isolation of protoplasts from *Aspergillus* conidiospores. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 27: 400-407, 1981.
- BRODY, H. & CARBON, J. Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. Proceedings of National Academy of Science U.S.A., Washington, 86: 6260-6263, 1989.
- BRODY, H.; GRIFFITH, J.; CUTICCHIA, A.J.; ARNOLD, J. & TIMBERLAKE, W.E. Chromosome-specific recombinant DNA libraries from the fungus *Aspergillus nidulans*. Nucleic Acids Research, Oxford, 19: 3105-08, 1991.
- BUXTON, F.P. & RADFORD, A. The transformation of mycelial spheroplasts of *Neurospora crassa* and the attempted isolation of an autonomous replicator. Molecular General Genetics, New York, 196: 337-44, 1984.
- BUXTON, F. P. ; GWYNNE, D. I. & DAVIES, R.W. Transformation of

- Aspergillus niger* using the argB gene of *Aspergillus nidulans*. Gene, Amsterdam, 37: 207-214, 1985.
- CALMELS, T.; PARRICHE, K.; DURNAD, H.& TIRABY, G. Transformation of *Tolypocla geodes* conidiospores phleomycin resistance. Current Genetics, Berlin 20: 309-314, 1991.
- CARLE, G .F. & OLSON, M. V. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. Nucleic Acid Research, Oxford, 12: 5674-5664, 1988.
- CARLE, G. F. ; FRANK, M.& OLSON, M. V. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. Science, Washington, 232: 65-68, 1986.
- CARRAMOLINA, L.; LOZANO, M.; PEREZ-ARANDA, R.; RUBIO, V.& SANCHEZ, F. Transformation of *Penicillium chrysogenum* to sulfamide resistance. Gene, Amsterdam, 77: 31-38, 1989.
- CASE, M. E.; SCHWEIZER, M.; KUSNER, S. R.& GILES, N H. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. Proceedings of the National Academy of Science USA, Washington, 76: 5259-5263, 1979.
- CASSELTON, L. A.& HERCE, A. L. F. Heterologous gene expression in the basidiomycetes fungus *Coprinus cinereus*. Current Genetics, Berlin, 16: 35-40, 1989.
- CHAKRABORTY, B. N.; PATTERSON, N. A.; KAPOOR, M. An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germina conidia of filamentous fungi. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 37: 858-863, 1991.

- CHU, G.; VOLLRATH, D.; DAVIS, R. W. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. Science, Washington, 234: 1582-1585, 1986.
- CLAVERIE-MARTIN, F. DIAZ-TORRES, M. R.; GEOGHEGAN, M. J. Chemical composition and ultrastructure of wild-type and white mutant *Aspergillus nidulans* conidial walls. Current Microbiology, New York, 16: 281-287, 1988.
- CLUTTERBUCK, A. J. New conidial colour mutants in *Aspergillus nidulans*. Aspergillus Newsletters, Sheffield 9: 63, 1968.
- CLUTTERBUCK, A. J. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, London, 70: 423-435, 1972.
- CLUTTERBUCK, A. J. *Aspergillus nidulans*. In: KING, R. C., Ed. HANDBOOK OF GENETICS. New York, Plenum Press, 1974, v.1, p. 447-510.
- CLUTTERBUCK, A. J. Genetics and Physiology of Aspergillus, In: SMITH, J. E. & PATEMAN, J. A., Eds., Londres, Academic Press, 1977, p. 305-317.
- COALEY, R. N.; SHAW, R. K.; FRANKLIN, F. C. H. & CATEN, C. E. Transformation of the phytopathogenic fungus *Septoria nodorum* to hygromycin resistance. Current Genetics, Berlin, 13: 383-389, 1988.
- CULLEN, D. C. Genomic organization of lignin peroxidase genes of *Phanaerochateae chrysosporium*. Submetido a análise. 1990.
- CULLEN, D. C.; LEONG, S. A.; WILSON, L. S. & HENNER, D. J. Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin resistance gene, hph. Gene, Amsterdam, 57: 21-26, 1987.

- DIALLINAS, G. J. & SCAZZOCCHIO, C. A gene coding for the uric acid-xantinapermease of *Aspergillus nidulans*: inactivation cloning, characterization, and sequence of a cis-acting mutation. Genetics, Princeton, 122: 342-350, 1989.
- DIEZ, B.; ALVAREZ, E.; CANTORAL, J. M.; BARREDO, J. L.; MARTIN, J. F. Selection of pyrG mutants of *Penicillium chrysogenum* lacking orotidine-5-phosphate decarboxylase and complementation by pyr4 gene of *Neurospora crassa*. Current Genetics, Berlin, 12: 277-282, 1987.
- DORN, G. L. A revised linkage map of the eight linkage groups of *Aspergillus nidulans*. Genetics, Princeton, 56: 619-631, 1967.
- DHAWALE, S.S.; PAIETTA, J.V.; MARZLUF, G.A. A new, rapid and efficient transformation procedure for *Neurospora*. Current Genetics, Berlin, 8: 77-79, 1984.
- DUNNE, P. W. & OAKLEY, B. R. Mitotic gene conversion, reciprocal recombination and gene replacement at the benA, beta-tubulin, locus of *Aspergillus nidulans*. Molecular General Genetics, New York, 213: 339-45, 1988.
- ELLIOTT, C.G. The cytology of *Aspergillus nidulans*. Genetics Research, London, 1: 462-76, 1960.
- FINCHAM, J.R.S. Transformation in fungi. Microbiology Reviews, Washington, 53: 148 - 70, 1989.
- GABRIELLI, A. & AZEVEDO, J.L. A strains of *Aspergillus nidulans* producing a high frequency of disomics. Transaction of the British Mycological Society, London, 75: 15-20, 1980.
- GARDINER, K. & PATTERSON, D. Transverse alternating electrophoresis. Nature, London, 331: 371-72, 1988.

- GARDINER, K.; LASS, W.& PATTERSON, D. Fractionation of large mammalian DNA restriction fragments using pulsed-field gradient gel electrophoresis. Somatic Cell Molecular Genetics, New York, 12: 185-95, 1986.
- GEISEN, R. & LEISTNER, L Transformation of *Penicillium nalgae* with the amdS gene of *Aspergillus nidulans*. Current Genetics, Berlin, 15: 307-09, 1989.
- GOLDMAN, G.H.; VAN MONTAGU, M.& HERRERA-ESTRELA, A. Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse. Current Genetics, New York, 17: 1167-74, 1990.
- HARTINGSVELDT, W.V.; MATTERN, I.E.; VAN ZEYS, C.M.Y.; POWERLS, P.H.& VAN DEN HOLDEN, A.M.J.Y. Development of a homologous transformation system of *Aspergillus niger* based on the pvrG gene. Molecular General Genetics, New York, 206: 71-75, 1987.
- HASTIE, A.C. Benlate induced instability of *Aspergillus nidulans* diploids Nature, London, 226: 271, 1970.
- HOWLETT, B. An electrophoretic karyoty for *Phytophthora megasperma*. Experimental Mycology, New York, 13: 199-202, 1989.
- ITO, H.; FUKUDA, Y.; MURATA, K.& KIMURA, A. transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. Journal of Bacteriology, Baltimore, 153: 163-168, 1983.
- JARGE, D. & PHILIPPSEN, P. Many yeast chromosomes lack the telomere-specific Y' sequence. Molecular and Cellular Biology, Washington, 9: 5754-5757, 1989.
- JOHNSTONE, I.L.; HUGHES, S.G.& CLUTTERBUCK, A.J. Cloning an *Aspergillus*

- nidulans* developmental gene by transformation. European Molecular Biology Organization, Oxford,, 4: 1307-1311, 1985.
- KAFFER, E. An 8-chromosomal map of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, New york,9: 105-45, 1958.
- KAFFER, E. True processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans* . Genetics, New York, 46: 1581-1609, 1961.
- KELLY, J.M. & HYNES, M.J. Transformation of *Aspergillus niger* by the amdS gene of *Aspergillus nidulans*. European Molecular Biology Organization, Oxford,, 4: 475-479, 1989.
- KINSCHERF, T.G. & LEONG, S.A. Molecular analysis of the karyotype of *Ustilago maydes* . Chromosoma, Berlin, 96: 427-433, 1988.
- KOLAR, M.; PUNT, P J.; VAN DEN HONDEL, A. M.L. J.& SCHWAB, H. Transformation of *Penicillium chrysogenum* using dominant selective markers and expression of an *Escherichia coli* lac Z fusion gene. Gene, Amsterdam, 62: 127-134, 1988.
- KUIPER, M. T. R. & DE VRIES, H. A recombinant plasmid carrying the mitochondrial plasmid sequence of *Neurospora intermedia* LaBelle yields new plasmid derivatives in *Neurospora crassa* transformants. Current Genetics, Berlin, 9: 471-477, 1985.
- KURTZ, M.B. & CHAMPE, S.P. Dominant spore color mutants of *Aspergillus nidulans* defective in germination and sexual development. Journal of Bacteriology, Baltimore, 148: 629-638, 1981.
- LAI, E.; BIRREN, B.W.; CLARK, S.M.; SIMON, M.I.& HOOD, L. Pulsed field gel electrophoresis. Biotechniques, Washington, 7: 34-42, 1989.

- LAW, D.J.& TIMBERLAKE, W.E. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. Journal of Bacteriology, Baltimore, 144: 509-517, 1980.
- LIEBER, M.M. The genetic instability and mutagenic interaction of chromosomal duplications present together in haploid strain of *Aspergillus nidulans*. Mutation Research, Amsterdam, 37: 33-66, 1976.
- MAGEE, B.B. & MAGEE, P.T. Electrophoretic karyotypes and chromosome numbers in *Candida* species. Journal of General Microbiology, London, 133: 425-430, 1987.
- MAGEE, B.B.; KOLTIN, Y.; GORMAN, J.A. & MAGEE, P.T. Assignment of cloned genes to the seven electrophoretically separated *Candida albicans* chromosomes. Molecular Cellular Biology, Washington, 8: 4721-4726, 1988.
- MALADIER, L.; DABOUSSI, M. J.; JULIEN, J.; SCAZZOCCHIO, C. & BRYGOO, Y. Cloning of the nitrate reductase gene (niaD) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. Gene, Amsterdam, 78: 147-156, 1989.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. & SAMBROOK, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- MANSEL, A.; BRAITHWAITE, K.; IRWIN, J. & MANNERS, J. Highly variable molecular karyotypes in *Colletotrichum gloeosporoides* pathogenic on *Stylosanthes* sp. Current Genetics, Berlin, 18: 81-86, 1990.
- MATTER, I. E. & PUNT, P. Y. A vector of *Aspergillus* transformation conferring phleomycin resistance. Fungal Genetics Newsletter, Kansas City, 35: 25, 1988.

- MAYORGAN, M. E. & TIMBERLAKE, W. E. Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* wA gene. Genetics, New York, 126: 73-79, 1990.
- McCLUSKEY, K. & MILLS, D. Identification and characterization of chromosome length polymorphisms among strains representing fourteen races of *Ustilago hordei*. Molecular Plant- Microbe Interaction, San Paul, 3: 366-373, 1990.
- MEINHARDT, F. & ESSER, K. The plasmid of the morels: characterization and prerequisites for vector development. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 27: 276-282, 1987.
- MELLON, F. M.; LITTLE, P. F. R. & CASELTON, L. A. Gene cloning and transformation in the basidiomycete fungus *Coprinus cinereus* : isolation and expression of the isocitrate lyase gene (acu-7). Molecular General Genetics, New York, 210: 352-357, 1987.
- MENEZES, E. Reversion in variants from a duplication strain of *Aspergillus nidulans*.. Molecular General Genetics, Berlin, 164: 255-58, 1978.
- MIAO, V.P.W. Genes for phytoalexin detoxification in *Nectria haematococca* Role in virulence on chickpea, and location on B chromosomes. PhD Dissertation. Department of Plant Pathology, Cornell University, Ithaca, New York, 1990.
- MIAO, V.P.W. & VAN ETTEN, H.D. Preparing chromosomes from protoplast of a filamentous fungus for pulsed-field gel electrophoresis. Biotechniques, Washington, 8: 393, 1990.
- MISHRA, N.C. Characterization of the new osmotic mutant (os) which originated during genetic transformation in *Neurospora crassa* . Genetical Research, London, 29: 9-19, 1977.

- MISHRA, N.C. DNA-mediated genetic changes in *Neurospora crassa*. Journal of General Microbiology, London, 113: 255-259, 1979.
- MISHRA, N.C. Gene transfer in fungal. Advances in Genetics, New York, 23: 173-198, 1985.
- MISHRA, N.C. & TATUM, E.L. Non-Mendelian inheritance of DNA induced inositol independence in *Neurospora*. Proceedings of the National Academy of Science USA, Washington, 70: 3875-3879, 1973.
- MISHRA, N.C.; SZABO, G. & TATUM, E.L. The role of nucleic acid inducing genetics changes in *Neurospora*. In: NIU, M.C. & SEGAL, S.J. Nucleic acids in reproduction and development. North Holland, p. 261-273, 1973.
- MOHR, G. Rapid detection of bacteria hygromycin B phosphotransferase in *Aspergillus niger* transformants; Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 30: 371-374, 1989.
- MOLINA, S.M.G. & AZEVEDO, J.L. Estudos de fenocópia em variantes deteriorados de *Aspergillus nidulans*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIENCIA, 41., Fortaleza, 1989. Resumos. São Paulo, 1989. p.729.
- MONTEIRO, C.B. & PIZZIRANI-KLEINER A. A. Avaliação da instabilidade mitótica de *Aspergillus nidulans* através de cruzamentos sexuais e parassexuais e fusão de protoplastos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DE CIENCIA, 43, Rio de Janeiro, 1991. Resumos. São Paulo, 1991. p.764-765.
- MULLANEY, E.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, A.M.J.J. DNA-mediated transformation of *Aspergillus ficum*. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 28: 451-454, 1988.

- NIWA, O. MATSUMOTO, T. & YANAGIDA, M. Construction of a mini-chromosome by deletion and its mitotic and meiotic behaviour in fission yeast. Molecular Genetics, New York, 203: 397-405, 1986.
- NGA, B.H. & ROPER, J.A. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitoses at *Aspergillus nidulans*. Genetics, New York, 58: 193-209, 1968.
- OAKLEY, C.E.; WEIL, C.F.; KRETZ, P.L. & OAKLEY, B.R. Cloning of the ribo B locus of *Aspergillus nidulans*. Gene, Amsterdam, 53: 293-298, 1987.
- O'HARA, E.B. & TIMBERLAKE, W.E. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* va locus. Genetics, New York, 129: 249-254, 1989.
- OLIVER, P.T.P. Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. Journal General of Microbiology, London, 73: 45-54, 1972.
- OLIVER, R. P.; ROBERTS, I. N.; HARLING, R.; KENYON, L.; PUNT, P. J; DINGEMANSE, M.A. & VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. Transformation of the *Fulvia fulvo*, a fungal pathogen of tomato, to hygromycin B resistance. Current Genetics, Berlin, 13: 321-323, 1987.
- ORBACH, M.J. Electrophoretic characterization of the *Magnaporthe grisea* genome. Fungal Genetics Newsletters, Kansas City, 36: 14, 1989.
- ORBACH, M.J.; PORRO, E.B. & YANOFSKY, C. Cloning and characterization of the of the gene for β -tubulin from a benomyl resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. Molecular and Cellular Biology, Washington, 6: 2452-2461, 1986.
- ORBACH, M.J.; VOLLRATH D.; DAVIS, R. W & YANOFSKY, C. An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. Molecular and Cellular Biology, Washington, 8: 1469-1473, 1988.

- PUNT, J.P. & VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. Transformation of filamentous fungi based on hygromycin and phleomycin resistance markers. Methods in Enzymology, New York, 216: 447-57, 1993.
- PARSONS, K.A.; CHUMLEY, F.G.; VALENT, B. Geneti transformation of the fungal pathogen resposable for rice blast disease. Proceedings of the National Academy of Science USA, Washington, 84: 4161-4165, 1987.
- PICARD, M.; DEBUCHY, R.; JULIEN, J.& BRYGOO, Y. Transformation by by integration in *Podospora anserina*. II. targeting of the resident locus with cosmids and instability of transformants. Molecular General Genetics, New York, 210: 129-134, 1987.
- PIZZIRANI-KLEINER, A. A. & AZEVEDO, J. L. Manual de Técnicas Eletroforéticas para Separação de Cromossomos de Microrganismos. Piracicaba, FEALQ, 1989. 31p. (Manual Técnico).
- PONTECORVO, G. & ROPER, J.A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, London, 6: vii, 1952.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; McDONALD, K. D.& BUFTOR, A.W..The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, New York, 5: 141-238, 1953.
- POWELL, W.A; & KISTLER, H.C. In vivo rearrangment of foreign DNA by *Fusarium oxysporum* produces linear self-replicating plasmids. Journal of Bacteriology, Baltimore, 172: 3163-3171, 1990.
- PUNT, P.J; & VAN DEN HONDEL, A.M.J.J. Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers. Methods in Enzymology, New York, 216: 447-457, 1993.
- PUNT, P.J.; OLIVER, R.D.; DIGERMANSE, M.A.; POWWELS, P. H.; CEES, A.M.; VAN

- DEN HONDEL, J.J. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. Gene, Amsterdam, 56: 117-124, 1987.
- RADFORD, A.; POPE, S.; SAZCI, A.; FRASER, M.J & PARISH, J. H. Liposome mediated genetic transformation of *Neurospora crassa*. Molecular General Genetics, New York, 184: 567-569, 1981.
- RAEDER, U. & BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology, Oxford, 1: 17-20, 1985.
- RAZAMAMPARANY, A. & BEGUERET, J. Non-homologous integration of transforming vectors in the fungus *Podospora anserina* sequences of junctions at integration sites. Gene, Amsterdam, 74: 399-409, 1988.
- ROBERTS, C.F.A. A replica plating technique for the isolation of nutritional 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.
- ROSSIER, C.; PUGIN, A. & TURIAN, G. Genetic analysis of transformation in a micro conidiating strain of *Neurospora crassa* . Current Genetics, Berlin, 10: 313-320, 1985.
- SAINSARD-CHANET, A. & BEGEL, O. Transformation of yeast and *Podospora* : innocuity of senescence specific DNAs. Molecular General Genetics, New York, 204: 443-451, 1986.
- SCHWARTZ, D. & CANTOR, C;R. Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell, Cambridge 37: 67-75, 1984.
- SERWER, P. Gel electrophoresis with discontinuous rotation of the gel : An

alternative to gel electrophoresis with changing direction of the electric field. Electrophoresis, New York, 8: 301-304, 1987.

SKATRUD, P.L. & QUEENER, S.W. An electrophoretic molecular karyotype for an industrial strain of *Cephalosporium acremonium*. Gene, Amsterdam, 78: 331-338, 1989.

SKINNER, D.Z.; LEUNG, H.L. & LEONG, S.A. Genetic map of the blast fungus *Magnoportha grisea* (n=6) . In "Genetic maps", S.J. O'BRIEN, Ed., New York, p.3.82-3.83; Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1990.

SKINNER, D.Z.; BUDDE, A.D. & LEONG, S.A. Molecular karyotype analysis of fungi. In: bBENNETT, J.W. & LASURE, L.L.; More Gene Manipulation in Fungi. New York, 1991, p.87-103.

SMITH, C.L.; MATSUMOTO, T.; NIWA, O.; KLCO, S. & FAN, J-B.; YANAGIDA, M.; CANTOR; C.R. An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis. Nucleic Acids Research, Oxford, 15: 4481-4489, 1987.

SOUTHERN, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology, London, 98: 503-517, 1975.

SOUTHERN, E.M.; ANAND, R.; BROWN, W.R.A. & FLETCHER, D.S. A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. Nucleic Acids Research, Oxford, 15: 5925-43, 1987.

SPECHT, C.A.; DIRUSSO, C.C.; NOVOTNY, C.P. & ULLRICH, R.C. A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. Analytical Biochemistry, 119: 158-163, 1982.

STEELE, P. E.; CARLE, G. F; KOBAYASHI, S. & MEDOFF, G. Electrophoretic

- analysis of *Histoplasma capsulatum* chromosomal DNA. Molecular and Cellular Biology, Washington, 9: 983-987, 1989.
- STEWART, G.; FURS, A.& AVDALOVIC, N. Transverse alternating field electrophoresis (TAFE). Biotechniques, Washington, 6: 68-73, 1988.
- STRINGER, M.A.; DEAN, R.A.; SEWALL, C.T.; TIMBERLAKE, W.E. *Rodletless*, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. Genes & Development, New York, 5: 1161-1171, 1991.
- STOHL, L.L. & LAMBOWITZ, A.M. Construction of a shuttle vector for the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Proceedings of the National Academy of Science USA, Washington, 80: 1058-62, 1983.
- TAUTZ, D.& RENZ, M. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. Analytical Biochemistry, 132: 14-19, 1983.
- TILBURN, J.; SCAZZOCCHIO, C; TAYLOR, G. G.; ZABICKY-ZISSMAN, J. H.; LOCKING, R.A.& DAVIES, R.W. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. Gene, Amsterdam, 26: 205-221, 1983.
- TILBURN, J.; ROUSSEL, F.& SCAZZOCCHIO, C. Insertional inactivation and cloning of the wA gene of *Aspergillus nidulans*. Genetics, New York, 126: 81-90, 1990.
- TIMBERLAKE, W. E. Molecular genetics of *Aspergillus* development. Annual Review of Genetics, Palo Alto, 24: 5-36, 1990.
- TURGEON, B.G.; GARBER, R.C.& YODER, O.C. Transformation of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* using the *Aspergillus nidulans* amdS gene. Molecular General Genetics, New York, 201: 450-455, 1985.

- UNKLESS, S.E.; CAMPBELL, E.I.; RUITER-JACOBS, Y.M.J.T.; BROEKHUYSEN, J.A.M.; CARREZ, D.; CONTRERAS, R.; VAN DEN HOLDEN, C.A.M.J.J. & KINGHORN, J.R. The development of a homologous transformation system for *Aspergillus oryzae* based on the nitrate assimilation pathway: a convenient and general selection system for filamentous fungal transformation. Molecular General Genetics, New York, 218: 99-104, 1989.
- UPSHALL, A. Genetic and molecular characterization of argB transformants of *Aspergillus nidulans*. Current Genetics, Berlin, 10: 593-599, 1986.
- VAN CORGON, R.F.M.; POWELS, P.H.; GOOSE, T.; VISSER, J.; VAN DEN BROECK, H.W.; HAMER, J.E.; TIMBERLAKE, W.E. & VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. Expression of an *Escherichia coli* B galactosidase fusion gene in *Aspergillus nidulans*. Gene, Amsterdam, 40: 99-106, 1985.
- WANG, J.; HOLDEN, D.W. & LEONG, S.A. Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Washington, 81: 1740-1774, 1984.
- WARD, M.; WILKINSON, T. & URNER, G. Transformation of *Aspergillus nidulans* with a cloned, oligomycin-resistant ATP-synthetase subunit 9 gene. Molecular General Genetics, New York, 202: 265-270, 1986.
- WERNARDS, K.; GOOSEN, T.; WENNEKES, L.M.J.; VISSER, J.; BOS, C.L.; VAN DEN BROEK, H.W.J.; VAN CORGON, R.F.M. & VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J.; POWELS, P.H. Gene amplification in *Aspergillus nidulans* by transformation with vectors containing the amdS gene. Current Genetics, Berlin, 9: 361-367, 1985.
- WERNARDS, K.; GOOSEN, T.; SWART, K. & VAN DEN BROEK, H. W. J. Genetic analysis of *Aspergillus nidulans*. Molecular General Genetics, New York, 205: 312-317, 1986.

- WHITEHEAD, M.P.; UNKLESS, S. E.; RAMSDEN, M.; CAMPBELL, E. I.; GURR, S. J.; SPENCE, D.; VAN DEN HONDEL, C.; CONTRERAS, R. & KINGHORN, J.R. Transformation of a nitrate reductase mutant of *Penicillium chrysogenum* with the corresponding *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans* *nia* D genes. Molecular General Genetics, New York, 216: 408-441, 1989.
- WRIGHT, P.J; & PATEMAN, J.A. Ultraviolet-sensitive mutants of *Aspergillus nidulans*. Mutation Research, Amsterdam, 9: 579-587, 1970.
- WRIGHT, M.C; & PHILIPPSEN, P. Replicative transformation of the filamentous fungus *Ashbya gossypii* with plasmids containing *Saccharomyces cerevisiae* "ARS" elements. Gene, Amsterdam, 109, 99-106, 1991.
- YELTON M.M.; TIMBERLAKE, W. E. & VAN DEN HONDEN, C. A. M. J. J. A cosmid for selection genes by complementation in *Aspergillus nidulans* : selection of the developmentally regulated *yA* locus. Proceeding of the National Academic of Sciences USA, Washington, 82, 834-838, 1985.