EFEITO DO GENE *binA1* NA FORMAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Aspergillus nidulans*

ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

Orientador: PROF. 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 - Brasil
Outubro - 1981

A

meus pais

meus irmãos

Ruizinho e

Rui Alexandre

AGRADECIMENTOS

Sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

- Prof. João Lúcio de Azevedo.
- Prof. José Theóphilo do Amaral Gurgel.
- Prof. Ernesto Paterniani.
- Prof. Flávio Cesar Almeida Tavares.
- Isaias Olivio Geraldi.
- Profs. do Departamento de Genética da ESALQ/USP.
- Funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP.
- Funcionários do Setor de Genética de Microorganismos do Departamento de Genética da ESALQ/USP.
- Colegas do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética da ESALQ/USP.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.	3
2.1. Citogenética da conidiação em <i>Aspergillus nidulans</i> . . .	3
2.2. Núcleos e divisão mitótica em <i>Aspergillus nidulans</i> . . .	11
2.3. Instabilidade genética e aberrações cromossômicas em <i>Aspergillus nidulans</i>	17
2.3.1. Heterocariose e Diploidia.	17
2.3.2. Aneuploidia.	22
2.3.3. Duplicação	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Linhagens	27
3.2. Meios de cultura e soluções	31
3.2.1. Meio mínimo (PONTECORVO e col., 1953).	31
3.2.2. Meio completo (PONTECORVO e col., 1953, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973).	31
3.2.3. Solução de vitaminas	32
3.2.4. Ácido nucléico de leveduras hidrolisado.	32
3.2.5. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo . .	32
3.2.6. Meio de acetato de amônio (APIRION, 1962).	33
3.2.7. Meio mínimo de galactose	33
3.2.8. Suplementos adicionados ao meio mínimo	33
3.2.9. Solução salina	34
3.2.10. Solução de tween	34
3.2.11. Solução de desoxicolato de sódio	34
3.2.12. Solução de cloroneb (1,4-dicloro-2,5-dimetoxil benzeno).	35
3.2.13. Solução de p-fluorfenilalanina (pFA)	35

	<u>Página</u>
3.2.14. Solução de albumina.	35
3.2.15. Solução fosfato pH 6,9	36
3.2.16. Solução Helly.	36
3.2.17. Solução de Giemsa.	36
3.2.18. Formol neutro.	37
3.2.19. Meios empregados na análise genética	37
3.3. Esterilização e incubação	37
3.4. Observação de núcleos em conídios, hifas, vesículas e esterígmias.	38
3.5. Análise genética.	40
3.5.1. Heterocários	40
3.5.2. Isolamento de diplóides.	41
3.5.3. Análise mitótica	41
3.5.4. Análise meiótica	42
3.6. Mapeamento do gene <i>binA1</i>	43
3.7. Determinação da origem dos núcleos nos conídios da li- nhagem MSEbin.	44
3.8. Efeito do gene <i>binA1</i> em heterocários.	45
3.9. Efeito do gene <i>binA1</i> na meiose	46
3.10. Efeito de diferentes temperaturas no gene <i>binA1</i>	47
3.11. Efeito da luz ultravioleta na linhagem MSEbin	47
3.12. Obtenção de linhagens dissômicas.	48
3.13. Transferência do gene <i>binA1</i> para outras linhagens	49
3.14. Efeito do gene <i>binA1</i> na instabilidade	50
3.14.1. Em dissômicos	50
3.14.2. Em linhagens com duplicação cromossômica.	50
3.14.3. Em diplóides.	51
3.15. Obtenção de linhagem com maior porcentagem de conídios bi e trinucleados	52

	<u>Página</u>
4. RESULTADOS	53
4.1. A linhagem MSEbin	53
4.2. Mapeamento do gene <i>binA1</i>	59
4.2.1. Análise mitótica	59
4.2.2. Análise meiótica	59
4.3. Determinação da origem dos núcleos nos conídios bi e trinucleados da linhagem MSEbin	63
4.4. Efeito do gene <i>binA1</i> em heterocários.	68
4.5. Efeito do gene <i>binA1</i> na meiose.	71
4.6. Efeito de diferentes temperaturas na expressão do gene <i>binA1</i>	71
4.7. Efeito da luz ultravioleta na linhagem MSEbin	76
4.8. Obtenção de linhagens dissômicas.	82
4.9. Transferência do gene <i>binA1</i> para outras linhagens	83
4.10. Efeito do gene <i>binA1</i> na instabilidade	86
4.10.1. Em dissômicos	86
4.10.2. Em linhagens com duplicação cromossômica.	88
4.10.3. Em diplóides.	92
4.11. Seleção de linhagem com maior porcentagem de conídios binucleados e trinucleados.	100
5. DISCUSSÃO	102
5.1. Análise fenotípica e genética da linhagem MSEbin	102
5.2. Origem dos núcleos.	106
5.3. Efeito do gene <i>binA1</i> em heterocários e na meiose.	109
5.4. Efeito da temperatura e da luz ultravioleta na linhagem MSEbin.	111
5.5. Transferência do gene <i>binA1</i> e estudo do seu efeito em diferentes linhagens.	113
5.6. Efeito do gene <i>binA1</i> na instabilidade	115
6. CONCLUSÕES	120
7. LITERATURA CITADA.	122

LISTA DAS TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Lista das linhagens de <i>A. nidulans</i> utilizadas neste trabalho com os seus respectivos marcadores genéticos e sua origem.	28
2 - Lista dos locos gênicos das linhagens de <i>A. nidulans</i> utilizadas neste trabalho com os seus respectivos símbolos, fenótipos e grupos de ligação.	29
3 - Análise citológica da linhagem MSEbin com determinação da porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados	55
4 - Medida do diâmetro (em μm) de conídios e respectivos núcleos da linhagem MSEbin com valores médios de 30 mensurações e os desvios padrão correspondentes	55
5 - Volume dos conídios da linhagem MSEbin e linhagem MSE obtido através da determinação citológica do diâmetro e através do "Coulter Channelizer".	56
6 - Análise mitótica considerando os requisitos nutricionais e o número de núcleos por conídios obtidos de setores haplóides do diplóide MSEbin// <i>proA1 pabaA6 yA2</i>	61
7 - Análise meiótica envolvendo os genes <i>methG1</i> , <i>binA1</i> e <i>pyrA4</i> do grupo de ligação IV, com os valores correspondentes aos segregantes do cruzamento MSEbin X <i>biA1; methG1</i>	62
8 - Estimativa da proporção nuclear em heterocários e o número e frequência de colônias heterocarióticas e diplóides formadas a partir de conídios originados dos heterocários MSEbin + <i>proA1 pabaA6 yA2</i> e MSE + <i>proA1 pabaA6 yA2</i> ..	65
9 - Estimativa da proporção nuclear em heterocários e o número e frequência de colônias heterocarióticas e diplóides formadas a partir de conídios originados dos heterocários MSEbin + <i>biA1; methG1</i> e MSE + <i>biA1; methG1</i>	66

TabelaPágina

10 - Porcentagens de conídios uni, bi e trinucleados das linhagens MSEbin e <i>proA1 pabaA6 yA2</i> e de heterocários delas obtidos.	69
11 - Porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados das linhagens MSEbin e <i>proA1 pabaA6 yA2</i> originadas de heterocários.	70
12 - Porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados da linhagem MSEbin após incubação em diferentes temperaturas . .	73
13 - Análise da variância para porcentagem de conídios, uni, bi e trinucleados da linhagem MSEbin em relação a diferentes temperaturas de incubação (28, 37 e 44°C). Dados transformados em $\arcsen \sqrt{\%}$	74
14 - Número de conídios e respectivas porcentagens de sobrevivência à luz ultravioleta para a linhagem MSEbin . . .	78
15 - Número de conídios e respectivas porcentagens de sobrevivência à luz ultravioleta para a linhagem MSE.	79
16 - Análise da variância para o número de conídios sobreviventes à luz ultravioleta em diferentes intervalos de tempo de irradiação, para as linhagens MSEbin e MSE. Dados transformados em logaritmo.	81
17 - Porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados das linhagens <i>biA1; methG1</i> bin, <i>proA1 pabaA6 yA2</i> bin, A bin e MSE bin, e respectivos valores de χ^2 para comparações entre tipos de conídios de cada linhagem e a linhagem MSEbin..	85
18 - Frequência de colônias haplóides provenientes de colônias dissômicas com conídios uninucleados (D1 e D2) e colônias dissômicas com conídios uni, bi e trinucleados (d1 e d2).	

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
19 - Número e frequência de setores obtidos da linhagem A bin em diferentes temperaturas.	89
20 - Número e frequência de setores obtidos da linhagem A em diferentes temperaturas.	90
21 - Número e frequência de setores obtidos do diplóide A bin// MSE em diferentes temperaturas.	94
22 - Número e frequência de setores obtidos do diplóide A// MSE em diferentes temperaturas.	95
23 - Número e frequência de setores obtidos do diplóide <i>biA1; methG1</i> bin// MSE em diferentes temperaturas	97
24 - Número e frequência de setores obtidos do diplóide <i>biA1; methG1</i> // MSE em diferentes temperaturas.	98
25 - Porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados de colônias selecionadas após irradiação ultravioleta de conídios da linhagem MSEbin.	101

LISTA DAS FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Mapa parcial de ligação de <i>A. nidulans</i> com os marcadores genéticos utilizados neste trabalho.	30
2 - Linhagem MSEbin e linhagem MSE, crescidas em meio completo à 37°C por sete dias.	57
3 - Conídios uni, bi e trinucleados da linhagem MSEbin após coloração com HCl-Giemsa.	57
4 - Representação gráfica das medições dos volumes dos conídios da linhagem MSEbin e linhagem MSE obtido através do "Coulter Chancelizer"	58
5 - Mapa genético do grupo de ligação IV para os genes <i>methG1</i> , <i>binA1</i> e <i>pyroA4</i>	62
6 - Análise citológica da estrutura conidial na linhagem MSEbin após incubação em diferentes intervalos de tempo	67
7 - Conídios uninucleados e binucleados do heterocário MSEbin + <i>proA1 pabaA6 yA2</i> , após coloração com HCl-Giemsa.	69
8 - Retas obtidas pelas equações de regressão para conídios uni, bi e trinucleados em função da temperatura de incubação. Dados transformados em $\arcsen \sqrt{\%}$	75
9 - Curva de sobrevivência a luz ultravioleta e retas obtidas pelas equações de regressão linear. Linhagem MSEbin e MSE.	80
10 - Frequência dos tipos de setores obtidos da linhagem Abin e linhagem A em diferentes temperaturas de incubação	91

Figura

Página

11 - Frequência dos tipos de setores obtidos dos diplóides A bin// MSE e A// MSE em diferentes temperaturas de incubação.	96
12 - Frequência dos tipos de setores obtidos dos diplóides <i>biA1; methG1</i> bin// MSE e <i>biA1; methG1</i>// MSE em diferentes temperaturas de incubação.	99

"CURRICULUM VITAE"

ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER, nascida em Rio Claro, Estado de São Paulo, a 10 de novembro de 1950. Licenciou-se em História Natural pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Rio Claro em 1972. Ingressou no Curso de Pós-Graduação de Genética e Melhoramento de Plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em agosto de 1973, obtendo o grau de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas em junho de 1977. Iniciou a carreira docente no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em maio de 1976 como Docente Voluntário e foi contratada na qualidade de Professor Assistente MS-2 em novembro de 1979. Atualmente desenvolve pesquisas na área de Genética de Microrganismos.

EFEITO DO GENE *binA1* NA FORMAÇÃO DE
CONÍDIOS DE *Aspergillus nidulans*

Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com a finalidade de estudar geneticamente o caráter produção de conídios uni, bi e trinucleados que ocorre em uma linhagem de *Aspergillus nidulans* designada MSEbin. Inicialmente foi feito o mapeamento do gene responsável por este caráter, a determinação da origem dos núcleos adicionais nos conídios, o efeito deste gene em heterocários, na meiose, na instabilidade genética e finalmente, o efeito de agentes como luz ultravioleta e temperatura na sua expressão.

Pela análise genética foi verificado que a formação de conídios com mais de um núcleo é determinada por um único gene, denominado *binA1*, o qual foi localizado no grupo de ligação IV à 22,7cM de *methG1*. Através da análise dos tipos de conídios formados em heterocários e de observações citológicas em diferentes estágios do desenvolvimento do conidióforo, foi possível concluir que os núcleos nos conídios bi e trinucleados podem ter origens diferentes, permitindo a formação de conídios

heterocarióticos em micélios com núcleos geneticamente diferentes. O gene *bínA1* em heterocários tem expressão não autônoma e não interfere com o processo meiótico normal do fungo. Em dissômicos, a presença do gene *bínA1* acarreta um aumento de cerca cinco vezes na instabilidade, enquanto que, em linhagens duplicadas e em diplóides, tal instabilidade é reduzida de 2,2 e 2,0 vezes, respectivamente. As possíveis causas dessa redução da instabilidade são discutidas, bem como, a sua possível utilização em linhagens industriais.

A linhagem que contém o gene *bínA1* apesar de possuir conídios com mais de um núcleo, não é mais resistente à luz ultravioleta do que a linhagem original com conídios uninucleados. Através de mutação induzida com luz ultravioleta, o caráter estudado pode ser modificado obtendo-se linhagens com maior ou menor porcentagem de conídios com mais de um núcleo. Por outro lado, o caráter é influenciado pela temperatura, que sendo alta, ocasiona uma diminuição no número de conídios bi e trinucleados, o que sugere a presença de um produto termo-sensível envolvido no processo de migração dos núcleos da vesícula para os esterígmas primários.

THE GENE *binA1* ON CONIDIA FORMATION
OF *Aspergillus nidulans*

Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

ADVISER: *Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo*

SUMMARY

The mutant strain MSEbin de *Aspergillus nidulans* has conidia with one, two and three nuclei in constant proportions. This character was considered in the present study which comprise genetic mapping, origin determination of the additional nuclei in conidia and genetic influence on heterokaryons, meiosis and instability. It was also determined the effect of temperature and ultraviolet light.

Genetic analysis have shown a single gene controlling the character, *binA1*, which is located in linkage group IV at 22,7 cM of *methG1*. Analysis of conidia type formation in heterokaryons and the cytological analysis of conidiophore in different stages of development permit to conclude that additional nuclei can have independent origin in conidia. Non-autonomous expression in heterokaryons was observed and meiosis in strains were not affected in the presence of *binA1*. In disomics the genes enhances instability about five times and on the contrary in duplicated and diploid strains instability is reduced about

two times. These effects are discussed as well as the possible reduction of instability in industrial strains.

Although with more than one nuclei strains with *binA1* are not more resistant to ultraviolet light than the original strain. Mutation induced by UV light permitted to select strains with higher and lower percentages of conidia with more than a single nuclei. The character however is temperature influenced and the results permit to suggest the presence of a temperature-sensitive component involved in the process of nuclear migration to primary sterigmata.

1. INTRODUÇÃO

O fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* apresenta uma fase vegetativa haplóide com formação de conídios uninucleados, o que permite a obtenção de colônias isoladas geneticamente puras. Este foi um dos motivos da sua escolha para pesquisas genéticas por PONTECORVO e col. (1953), além de ser um fungo que possui ciclos sexual e parassexual, cresce em meio de composição definida e tem ciclo vital rápido.

A descoberta de que existem linhagens de *A. nidulans* que formam conídios binucleados e trinucleados (PIZZIRANI, 1977), o que é uma exceção na espécie, abre perspectivas para estudos que antes não poderiam ser conduzidos de maneira conveniente, como os relativos à origem dos núcleos adicionais nos conídios ou estudos de interação de diferentes genes em células dicarióticas. Além disso, o *A. nidulans* por suas características é utilizado como modelo genético para outros fungos semelhantes e em muitos casos são feitas extrapolações, inclusive para fungos de importância econômica. A descoberta da linhagem que produz coní-

dios com mais de um núcleo, aumenta a homologia entre *A. nidulans* e os fungos que apresentam essa característica, permitindo deste modo uma comparação mais adequada.

Considerando estes fatos, o presente trabalho propõe como objetivos caracterizar a linhagem de *A. nidulans* que forma conídios uni, bi e trinucleados, principalmente quanto ao efeito de fatores ambientais na formação de conídios com mais de um núcleo, suas características citológicas e expressão em heterocários, a origem dos núcleos adicionais nos conídios e sua análise genética. Foi também considerado importante verificar a influência do caráter nos processos meiótico e mitótico, estudada através de alterações na segregação meiótica e na instabilidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A literatura sobre conidiogênese em *Aspergillus nidulans* abrange diversos aspectos, como aqueles relacionados à morfologia, bioquímica e genética (ZONNEVELD, 1977, CLUTTERBUCK, 1977; FINCHAM e col., 1979). A revisão vai se restringir à três importantes aspectos relacionados com os objetivos do presente trabalho, quais sejam: citogenética da conidiação, comportamento dos núcleos na divisão mitótica, especialmente na formação de conídios e instabilidade genética e aberrações cromossômicas.

2.1. Citogenética da conidiação em *Aspergillus nidulans*

A formação de esporos sexuais e assexuais é a principal manifestação de diferenciação em fungos filamentosos. O *A. nidulans*, pelo fato de possuir estrutura conidial bem definida e ser bem estudado geneticamente, e mais recentemente, bioquímica e morfologicamente, se constitui em um sistema dos mais apropriados para estudos do desenvolvimento e da diferenciação.

Um conídio uninucleado haplóide (YUILL, 1950), sob condições favoráveis, apresenta um aumento da quantidade de DNA, RNA, proteínas e peso seco (BAINBRIDGE, 1971) e após cerca de quatro horas começa a desenvolver um tubo germinal. Este, forma hifas septadas multinucleadas que se ramificam e em 24 horas, completa o seu ciclo assexual com a formação de conidióforos e conídios. Desde a formação do tubo germinal, tanto a divisão nuclear nas hifas como a síntese de DNA são sincrônicas (ROSENBERGER e KESSEL, 1967; KESSEL e ROSENBERGER, 1968), tornando-se entretanto assincrônica quando a região apical das hifas contém 8 ou 16 núcleos, depois de três ou quatro ciclos de divisão nuclear (FIDDY e TRINCI, 1976).

O crescimento das hifas é seguido pela formação de septos incompletos que dividem a região apical aproximadamente pela metade, quando esta contém 4 ou 8 núcleos (CLUTTERBUCK, 1970a; FIDDY e TRINCI, 1976). Baseando-se no comprimento do compartimento antes e após a septação, é possível estimar o tempo de geração no crescimento de células apicais (BAINBRIDGE, 1976). O novo compartimento apical formado continua a aumentar em comprimento e o volume citoplasmático aumenta até uma proporção crítica quando então os núcleos são induzidos à divisão sincrônica, parecendo indicar que é o volume de citoplasma por genoma que regula o início da mitose nas hifas (CLUTTERBUCK, 1969b). A precisão com que os compartimentos apicais são separados em dois pelo septo, sugere que o início da septação é um evento bem regulado (FIDDY e TRINCI, 1976). Os compartimentos apicais chegam a conter cerca de 50 núcleos e formam no máximo de 6 a 9 septos depois da mitose sincrônica, existindo portanto uma relação

temporal e não quantitativa ou espacial entre mitose e septação (*CLUTTERBUCK, 1970a*). Mutantes que não formam septos em temperaturas restritivas tem um crescimento limitado do micélio, mostrando que septação é um processo necessário para manter o desenvolvimento normal das colônias (*MORRIS, 1976; TRINCI e MORRIS, 1979*).

O crescimento das hifas ocorre pela síntese da parede (*KATZ e ROSENBERGER, 1971*) e, de um modo em geral, parece estar associado com a fusão de vesículas com a parede já existente, vesículas essas originadas do citoplasma do micélio (*COLLINGE e TRINCI, 1974*). Estudos da síntese da parede celular são feitos utilizando-se protoplastos (*PEBERDY, 1979*), através da análise da sua composição química (*BULL, 1970*) e da permeabilidade celular (*ELORZA e col., 1969*).

Com o crescimento das hifas, formam-se as ramificações que aumentam em taxa exponencial de acordo com o crescimento do micélio (*MACKINTOSH e PRITCHARD, 1963; KATZ e col., 1972; TRINCI, 1974*). Existe um alto coeficiente de correlação entre o número de septos e o número de ramificações produzido pelas hifas (*FIDDY e TRINCI, 1976*) embora ramificação possa ocorrer na ausência de septação (*MORRIS, 1976*).

O desenvolvimento das hifas com as ramificações resultam na formação de uma colônia em meio sólido, cujo diâmetro aumenta exponencialmente nas primeiras horas e depois linearmente (*TRINCI, 1969*). Por cerca de 24 horas a colônia cresce sem diferenciação, quando então surgem os conidióforos e logo após os conídios (*CLUTTERBUCK, 1969a*). A formação de conídios tem início quando alguns compartimentos das hifas deno-

minados de células podais, começam a formar um eixo longo multinucleado, o conidióforo, que termina em uma vesícula globosa multinucleada. A célula podal, o eixo e a vesícula tem uma cutícula espessa de coloração escura. Da vesícula desenvolvem-se sincronicamente brotos alongados, os esterígmas primários e, após mitoses sucessivas na vesícula, os núcleos originados migram para os esterígmas primários. Estes, dão origem a uma série de um, dois ou, raramente, mais esterígmas secundários contendo um núcleo originado de divisões mitóticas do núcleo do esterigma primário. O núcleo de cada esterigma secundário se divide repetidamente e, em cada divisão, um núcleo filho permanece na porção proximal do esterigma e o outro núcleo filho na porção distal, a qual sofre uma constrição originando um conídio. Esse processo ocorre sucessivamente formando uma cadeia de conídios, todos contendo um núcleo derivado do esterigma, sendo que, o mais jovem é aquele da base da cadeia (*PONTECORVO e col.*, 1953; *CLUTTERBUCK*, 1969a; *MARTINELLI*, 1976). As várias cadeias de conídios se dispõem paralelamente, e cada estrutura conidial pode conter até 100 cadeias (*ROPER*, 1971). Estudos da ultraestrutura do conidióforo e dos conídios mostram a presença de plasmalemassomos e lomassomos durante o desenvolvimento dessas estruturas (*OLIVER*, 1972).

O início do desenvolvimento da estrutura conidial está relacionado com os fatores que limitam o crescimento vegetativo do fungo (*COCHRANE*, 1958) e, de fato, a carência de fontes de carbono e nitrogênio em culturas submersas de *A. nidulans* geralmente induz a conidiação (*SAXENA e SINHA*, 1973; *MARTINELLI*, 1976). No entanto, é necessário a

atividade de um gene para a aquisição da competência para iniciar o desenvolvimento (AXELROD e col., 1973; GEALT e AXELROD, 1974) ou ainda, existe um controle genético endógeno que é o tempo de crescimento vegetativo anterior ao desenvolvimento conidial (PASTUSHOK e AXELROD, 1976). Após 20 horas de crescimento a 36°C o micélio já é competente para receber estímulo e iniciar a conidiação, tanto para crescimento em meio sólido como líquido (AXELROD, 1972; AXELROD e col., 1973).

Com a análise de mutantes que afetam determinados estágios do desenvolvimento conidial, foi possível estimar o número de locos envolvidos na conidiação e estudar problemas da diferenciação em *A. nidulans* (CLUTTERBUCK, 1969a; MARTINELLI e CLUTTERBUCK, 1971; ZONNEVELD, 1974). Mediante a comparação da frequência de mutantes para conidiação com a frequência de mutantes auxotróficos foi estimado de 300 a 800 genes envolvidos na conidiação e de 34 a 1.000 genes com base no número relativo de fenótipos (MARTINELLI e CLUTTERBUCK, 1971). Como a maioria das mutações são pleiotrópicas afetando conidiação e crescimento vegetativo, excluindo-se esses mutantes, o número de genes especificamente envolvidos na conidiação pode então ser estimado de 45 a 150 (CLUTTERBUCK, 1977). Aspectos da diferenciação da estrutura conidial pode ser avaliada pela análise desses mutantes que possuem bloqueios nos vários estágios do desenvolvimento como formação de vesículas, de esterígmas primários e secundários e de conídios. Existem genes que são requeridos para os processos básicos da conidiação (CLUTTERBUCK, 1969a), por exemplo, mutantes "bristle" (*brl*), os quais desenvolvem vesículas e nenhuma estrutura subsequente, apenas o eixo do conidióforo que cresce de 20 a 30 vezes mais do que o normal. Isso

mostra que um loco governa a mudança do crescimento tipo hifal multinu-
cleado encontrado no conidióforo, para o crescimento tipo conidial uninu-
cleado encontrado nos esterígmas, o que faz supor ainda que a vesícula é
resultado do bloqueio do eixo do conidióforo que tem o seu crescimento
desviado para formar um entumescimento. A ocorrência de outros genes re-
lacionados com o desenvolvimento conidial é também clara em outros dois
tipos de mutantes, o "*stunted*" (*stu*) e "*medusa*" (*med*) que aparentemente
produzem conídios normais em estrutura conidial anormal. Em ambos os ca-
sos, os mutantes são defectivos na formação de cleistotécios, mostrando que
a atividade normal desses genes, embora não requeridos para o crescimento
vegetativo, são envolvidos em duas situações diferentes da diferenciação.
Na série de mutantes "*bristle*", alguns desenvolvem estruturas intermediá-
rias entre o mutante total e o tipo selvagem, sugerindo que a formação de
vesícula e esterígmas são processos relacionados, ambos controlados por
esse gene (CLUTTERBUCK, 1969a). Para converter conidióforos em conídios,
além do loco *brl*⁺ é necessário também *aba*⁺ ("*abacus*"), um mutante acon-
idial que desenvolve nodulações no eixo do conidióforo em vez de cadeias
de conídios. Os genes *brl* e *aba* podem ser estruturais ou reguladores de
uma fase específica do desenvolvimento e são classificados como morfogené-
ticos (CLUTTERBUCK, 1977).

Um tipo de mutante frequentemente obtido em *A. nidulans* é
aquele que apresenta excesso de micélio aéreo e frequentemente com supres-
são completa da formação de conídios. Esses mutantes denominados "*fluffy*"
(*fl*) são fenotipicamente semelhantes aos "*miceliais*" (ROPER, 1958) e fre-
quentemente observados em culturas obtidas de conídios provenientes de

culturas estocadas por muito tempo (GROSE e CLUTTERBUCK, 1975). São considerados como resultado de mutações recessivas simples (BALL e AZEVEDO, 1964; AZEVEDO, 1965) ou dominantes (DORN e col., 1967; DORN, 1970) ou ainda da interação de genes citoplasmáticos e nucleares (ROPER, 1958; DORN e col., 1967; DORN, 1970).

Muitos dos mutantes que apresentam variação na estrutura conidial mostram também variação no tipo, formato, coloração e/ou ramificação de hifas (BIAGI, 1977). Esse efeito pleiotrópico é também verificado em *Neurospora* (MISHRA, 1977) onde uma mutação que afeta conidiação altera outras fases do ciclo celular.

Todo o processo da formação de conídios incluindo desde o desenvolvimento do conidióforo até a coloração dos conídios é alterado por mudanças nas condições ambientais de crescimento do fungo. Fatores como: temperatura (KILBEY, 1963; TRINCI, 1969; CLUTTERBUCK, 1969a, 1970b; AXELROD, 1972; MARTINELLI, 1972, 1976), pH (KILBEY, 1963; CLUTTERBUCK, 1972; MARTINELLI, 1972), fontes de carbono e nitrogênio (TRINCI, 1969; CLUTTERBUCK, 1970b; AXELROD, 1972; MARTINELLI, 1972, 1976; PASTUSHOK e AXELROD, 1976), elementos essenciais (KILBEY, 1963; SAXENA e SINHA, 1973), cloreto de potássio (CLUTTERBUCK, 1970b) e aminoácidos e vitaminas (MARTINELLI, 1972), influenciam o processo de conidiação.

No desenvolvimento e diferenciação da estrutura conidial, certas enzimas estão envolvidas e entre elas, a *p*-difênol oxidase, uma lacase, considerada como específica da conidiação ou esporo-específica (CLUTTERBUCK, 1969c, 1972; MARTINELLI, 1976) pois só é detectada durante

a esporulação, não é encontrada no micélio e nem em mutantes aconidiais e sua produção está relacionada com a formação de esterígmata. A *p*-difenoil oxidase não é detectada em linhagens de esporos amarelos sugerindo que o loco *ya* é um gene estrutural para um dos componentes da enzima. No entanto, o processo da sua indução é complexo e parece estar relacionado com o próprio substrato natural que atua como indutor, ou o indutor são os estágios anteriores do crescimento vegetativo. Uma outra enzima, relacionada com a melanização do conidióforo, enzima conidióforo-específica (CLUTTERBUCK, 1973b) foi estudada em mutantes "bristle" e "ivory". Alguns dos mutantes *brl* são melanizados e com estruturas intermediárias entre vesícula e esterígmata e alguns mutantes *ivo* tem conidióforos normais mas não melanizados. É então sugerido que o loco *ivo* é um gene estrutural para essa enzima e sua atividade é controlada pelo loco *brl* e outros locos *ivo* estão relacionados com a produção do substrato fenólico para a enzima. Essa enzima é também uma fenol oxidase e pela sua especificidade de substrato é chamada de cresolase (CLUTTERBUCK, 1977). O pigmento marron-pardo do conidióforo e esterígmata é depositado na parte externa das paredes dessas estruturas sendo precedido pela presença de grupos sulfidril (OLIVER, 1972). A constituição química do pigmento dos conídios e conidióforo é ainda incerta mas as duas fenol oxidases tem especificidade de substrato o que realmente distingue uma da outra e ambas da fenol oxidase encontrada no micélio (BULL e CARTER, 1973; MARTINELLI e BAINBRIDGE, 1974). Uma outra enzima também envolvida na conidiação é a isocitrato liase (McCULLOUGH e ROBERTS, 1976). Além dessas enzimas, relacionado também ao processo de conidiação está o 3',5'-monofosfato de adenosina (AMPc) que tem alto ní-

vel no início do crescimento e é reduzido com 20 horas de crescimento, tanto em culturas de superfície como submersas (CLUTTERBUCK, 1975).

A análise de mutantes que são defectivos na separação conidial, *csp-1* e *csp-2*, de *Neurospora crassa* mostra que o processo de conidiação nesse fungo está associado com a síntese de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD) (SELITRENNIKOFF e col., 1974). A presença dessa enzima é necessária para o desenvolvimento e nos mutantes que não possuem NADase, a conidiação é completamente normal (NELSON e col., 1975). Para a formação de conídios em *N. crassa* é evidente a necessidade do AMPc que é detectado em níveis muito baixos no mutante *crisp-1* e a enzima necessária para a sua síntese, a adenilato ciclase, é quase inexistente nesse mutante (TERENZI e col., 1976). O fenótipo *crisp* pode algumas vezes ser convertido para o tipo selvagem pela adição de AMPc no meio de cultura, sugerindo que a deficiência em adenilato ciclase é o efeito primário da mutação. No entanto, em *A. nidulans* a administração de inibidores da adenilato ciclase provoca somente início de conidiação (CLUTTERBUCK, 1977). Isso pode ser devido a falta de especificidade dos inibidores, que em *Neurospora*, alguns podem também inibir a fosfodiesterase que destrói AMPc (SCOTT e SOLOMON, 1975). Os aspectos bioquímicos da germinação conidial de *Neurospora* são revisados minuciosamente por SCHMIT e BRODY (1976).

2.2. Núcleos e divisão mitótica em *Aspergillus nidulans*

Estudos citológicos em fungos são geralmente dificultados

pelo reduzido tamanho dos núcleos e cromossomos. A estrutura e o comportamento dos núcleos de fungos são similares ao dos núcleos dos organismos superiores contendo um único nucléolo, fios de cromatina, cariolinfa, membrana nuclear e uma divisão mitótica também semelhante, apesar do fuso ter uma origem aparentemente intranuclear (OLIVE, 1953). A divisão nuclear vegetativa é evidente em *A. nidulans*. Os cromossomos se condensam na metáfase e são visualizados após coloração com orceína acética ou Giemsa e o fuso mitótico pode ser demonstrado após coloração com fucsina ácida, o qual sob microscópio eletrônico, tem estrutura microtubular. Alguns fenômenos da mitose de *A. nidulans*, entretanto, não são similares aos dos outros eucariotos: na metáfase, os cromossomos se orientam ao longo do fuso mais do que na placa metafásica, a membrana nuclear não desaparece durante a mitose e não há centríolos típicos (ROBINOW e CATEN, 1969). Um aspecto da complexidade da divisão nuclear mitótica (WEIJER e WEISBERG, 1966; WEISBERG e WEIJER, 1968) mostra que os núcleos vegetativos passam por dois ciclos: ciclo juvenil e ciclo de maturação.

O processo meiótico é mais convencional do que o mitótico em *A. nidulans*. O estudo do comportamento de núcleos em ascos mostra a presença de oito cromossomos (ELLIOTT, 1960) sendo três grandes (um deles com satélite), dois de tamanho médio, dois pequenos e um muito pequeno, os quais correspondem aos oito grupos de ligação (KÄFER, 1958). A ordem decrescente de tamanho desses cromossomos é I, VIII, II, III, VII, IV, VI e V, baseada na análise do número de quebras cromossômicas, na média de letais recessivos induzidos, nas unidades de recombinação e na frequência de aneuplóides (DANTAS D'ARCE, 1972). O desenvolvimento sexual de

Aspergillus sobre os aspectos bioquímicos e ultraestruturais são revisados por ZONNEVELD (1977).

Nos conídios uninucleados, o volume celular é proporcional a ploidia e ao conteúdo de DNA (HEAGY e ROPER, 1952; PONTECORVO e col., 1953). Há uma perfeita correlação entre as medidas do diâmetro de núcleos, determinadas citologicamente, com o material genético adicional presente no núcleo de diplóides (CLUTTERBUCK e ROPER, 1966), de linhagens com duplicação cromossômica (PAES DE BARROS, 1977; CASE e ROPER, 1978; NIFFINEGGER-SOUZA, 1979) e de dissômicos (PIZZIRANI, 1977; GABRIELLI, 1978). É sempre mantida a relação DNA/citoplasma tanto em haplóides como em diplóides e a regulação do tamanho dos conídios depende do tempo de cessação do crescimento desses (ISHITANI e col., 1956b). Por outro lado, nas hifas cenocíticas, o volume celular independe da ploidia e nesse caso, onde o crescimento é constante, o que regula o número de núcleos por unidade de volume é a frequência de divisões mitóticas (CLUTTERBUCK, 1969b). Nas estruturas intermediárias entre as hifas multinucleadas e os conídios uninucleados, as dimensões são independentes da ploidia, assim, no conidióforo que é cenocítico como as hifas e nos esterígmas que são uninucleados como os conídios, o volume celular depende significativamente da ploidia. No entanto, no esterígma primário a diferença no volume celular só é detectada quando os esterígmas secundários estão formados e os núcleos já divididos. O número de núcleos por unidade de volume depende da ploidia, assim, os diplóides possuem um número menor de núcleos nas hifas e no conidióforo do que haplóides, no entanto, em ambos diplóide e haplóide, ocorre o mesmo número de divisões mitóticas nas vesículas. Como o es-

terígia é originado por extensão da vesícula, isso pode explicar porque o esterígia independe da ploidia até o núcleo ter migrado para o seu interior e ter-se dividido (*CLUTTERBUCK, 1969b*).

Todo o processo de divisão nuclear (*ROSENBERGER e KESSEL, 1967*) e a síntese de DNA (*KESSEL e ROSENBERGER, 1968*) são sincronizados quando o fungo se desenvolve em um meio rico. A divisão nuclear é seguida pela formação de uma série de septos existindo uma perfeita correlação entre ambas (*CLUTTERBUCK, 1970a*). O tempo da divisão nuclear é de 270 minutos e da replicação do DNA é de 120 a 180 minutos. Para esses valores, as condições de incubação e as linhagens utilizadas são tão importantes como a alta densidade de esporos e certas mutações que reduzem a sincronia da germinação (*BAINBRIDGE, 1971*).

Vários agentes atuam na divisão nuclear, e entre eles, os que interferem com o fuso, como: colchicina, cânfora, acenafteno, substâncias de crescimento vegetal como: indol e ácido naftil acético; carcinogênicos como: benzopireno e metilclorantreno e em raros casos, luz ultravioleta (*ESSER e KUENEN, 1967; FINCHAM e col., 1979*). Além desses agentes, podem ser citados: o hidrato de cloral que impede a formação de fusos e destrói os já formados (*MERCER e MORRIS, 1975*), a griseofulvina (*CRACKOWER, 1972*), os benzimidazóis que inibem o fuso ao nível dos microtúbulos (*KUENKEL, 1979; OAKLEY e MORRIS, 1980*), a p-fluorfenilalanina (*MORRIS e OAKLEY, 1970*) e outros agentes que causam haploidização (*CLUTTERBUCK, 1974*).

Além dos agentes químicos que atuam no processo mitótico

existem genes relacionados com esse processo como os mutantes *aps* ("*anucleate primary sterigmata*") nos quais os núcleos filhos originados no conidióforo deixam de migrar para os esterígmata primários. Os esterígmata primários anucleados desenvolvem-se muito pouco em relação ao normal e formam esterígmata secundários que não se desenvolvem. Nesse caso, a ausência de núcleos não impede o brotamento mas sim o crescimento (CLUTTERBUCK, 1969b). Muitos dos mutantes defectivos na divisão nuclear, divisão celular ou distribuição nuclear são termo-sensíveis e são isolados para se estudar os eventos genético-bioquímicos da mitose (MORRIS, 1976; ORR e ROSENBERGER, 1976). Dentre esses, destacam-se os mutantes *bim* ("*blocked in mitosis*") que em temperatura restritiva apresentam uma descondensação dos cromossomos e desorganização do fuso mitótico, sugerindo que ambos os processos apresentam um controle genético comum. Outros mutantes, designados *nim* ("*never in mitosis*"), não apresentam núcleos em mitose quando colocados na temperatura restritiva sugerindo que os genes *nim* controlam vários processos essenciais para o início da mitose enquanto que os genes *bim* estão envolvidos na mitose em si. Outra classe de mutantes, também termo-sensíveis, são designados *nud* ("*nuclear distribution*"). Nestes, o processo mitótico é normal na temperatura restritiva, mas tem uma distribuição anormal dos seus núcleos de modo que eles ficam agrupados próximo aos septos hifais.

Os conídios de *A. nidulans* possuem um único núcleo (YUILL, 1950; PONTECORVO e col., 1953; CLUTTERBUCK, 1969a; MARTINELLI, 1976). No entanto, altas porcentagens de conídios binucleados e menos frequentemente, conídios tri e tetranucleados podem ocorrer em uma linhagem haplóide

(PIZZIRANI, 1977). Raramente, conídios binucleados são detectados também em linhagens haplóides (WEIJER e WEISBERG, 1966), em linhagens duplicadas (PAES DE BARROS, 1977; NIFFINEGGER-SOUZA, 1979) e em linhagens dissômicas (GABRIELLI e AZEVEDO, 1980). Outras espécies de *Aspergillus* formam altas e variáveis proporções de conídios binucleados ou multinucleados como em *A. oryzae* e *A. sojae* (IKEDA e col., 1957), *A. flavus* (PAPA, 1973; MESSIAS, 1977), *A. niger* (CHANG e col., 1974; BARACHO e COELHO, 1978b; BONATELLI JR., 1981), *Aspergillus* sp 321 (PEREIRA, 1978). Em *Neurospora crassa*, o número médio de núcleos nos conídios aumenta quando as culturas são crescidas em meio completo (HUEBSCHMAN, 1952). Essa variação, no entanto, não depende apenas das condições culturais mas também das linhagens utilizadas, sendo de um modo geral, maior em homocários do que em heterocários (PITTINGER, 1965, 1967). A proporção de conídios binucleados em *A. niger* é também variável de acordo com as condições ambientais e com a natureza genética das linhagens (BARACHO e COELHO, 1978a, 1978b).

A distribuição dos núcleos em linhagens haplóides e diplóides e em heterocários, tem sido estudada pela observação citológica dos núcleos nas hifas. Como os núcleos de diplóides e de haplóides são diferentes em tamanho, é possível determinar citologicamente a proporção nuclear em heterocários diplóide-haplóide (CLUTTERBUCK e ROPER, 1966). Em hifas diplóides, os espaçamentos internucleares são maiores do que nas haplóides embora não ocorra alterações nas dimensões das hifas (CLUTTERBUCK, 1969b). As distâncias internucleares variam durante o ciclo celular (ROBINOW e CATEN, 1969), são maiores antes da divisão nuclear e menores após

a divisão nuclear (MORRIS, 1976).

Em núcleos isolados, a proporção DNA:RNA:proteína é de 1,0:2,8:8,7 (GEALT e col., 1976), sendo confirmada a presença de histonas nos seus cromossomos (FELDEN e col., 1976). Todos os componentes químicos dos núcleos de *A. nidulans* são bem caracterizados e uma revisão completa sobre esse assunto pode ser encontrada em MORRIS e col. (1977).

2.3. Instabilidade genética e aberrações cromossômicas em *Aspergillus nidulans*

A instabilidade genética é um fenômeno geralmente associado a presença de material cromossômico adicional, elementos citoplasmáticos e mutação, entre outras causas. Em *A. nidulans*, grande parte dos estudos sobre instabilidade está relacionada a presença de material genético em excesso, associada a estudos de fatores que afetam tal instabilidade. De acordo com os objetivos propostos, a literatura foi revisada considerando instabilidade resultante da dissociação heterocariótica, haploidização de diplóides e formação de setores haplóides de aneuplóides, especialmente de dissômicos, e de linhagens portadoras de duplicação cromossômica.

2.3.1. Heterocariose e Diploidia

A diploidia, o primeiro tipo de aberração cromossômica de-

tectado em *A. nidulans* (ROPER, 1952) está muito bem caracterizada (PONTECORVO e col., 1953; PONTECORVO, 1956; ROPER, 1966; AZEVEDO, 1972, CLUTTERBUCK, 1974; BIRKETT e ROPER, 1977; FINCHAM e col., 1979). A formação do diplóide, em resumo, consiste na fusão de dois núcleos haplóides em hifas heterocarióticas originando um núcleo diplóide heterozigoto que pode ser selecionado.

Em condições de laboratório, o primeiro passo para a formação deliberada de um diplóide é o estabelecimento de um heterocário pela fusão de hifas com núcleos geneticamente diferentes. Em Ascomícetos, a heterocariose tem sido mais estudada em *A. nidulans* e *Neurospora crassa*, embora as duas espécies sejam diferentes no seu comportamento. A proporção nuclear em um heterocário de *N. crassa* é determinada pelas proporções de núcleos utilizadas no inóculo inicial e não é alterada por mudanças ambientais (PITTENGER e ATWOOD, 1956) enquanto que a proporção nuclear de heterocários em *A. nidulans* independe da proporção conidial das linhagens utilizadas, sendo provavelmente função dos requisitos nutricionais das duas linhagens empregadas, e é realmente alterada por condições ambientais (WARR e ROPER, 1964; CUNHA, 1970). Desde que os conídios de *A. nidulans* são uninucleados, uma amostra dos conídios de um heterocário é uma amostra indireta da proporção nuclear do micélio desse heterocário (PONTECORVO e col., 1953) e que também pode ser medida diretamente por análises citológicas de heterocários entre linhagens haplóides e diplóides (CLUTTERBUCK e ROPER, 1966). Fungos que formam conídios binucleados ou multinucleados produzem conídios heterocarióticos em heterocários, como *N. crassa* (PROUT e col., 1953; ATWOOD e MUKAI, 1955), *Aspergillus oryzae* e *A. so*

jae (ISHITANI e col., 1956a), *Trichometasphaeria turcica* (KNOX-DAVIES e DICKSON, 1960; MATSUMURA, 1981), *Aspergillus niger* (CHANG e col., 1974).

Nesses organismos, a condição heterocariótica é mantida durante o crescimento do micélio e também na sua reprodução assexual. Essa condição, assemelha-se algumas vezes aos diplóides e um aspecto importante está no fato de que podem também acumular uma reserva de variabilidade. A origem dos núcleos do conídio tem enorme significado no efeito dessa condição em relação a variação encontrada em muitos fungos produtores de alguma substância de interesse econômico bem como em fungos fitopatogênicos.

Em algumas espécies de fungos podem existir barreiras para a formação de heterocários. Essa incompatibilidade vegetativa é bem estabelecida em *N. crassa* e *Podospora anserina* e é também demonstrada em *A. nidulans* (FINCHAM e col., 1979). Em *A. nidulans* a capacidade de linhagens formarem heterocários é determinada pelo grau de similaridade dos seus genomas, sendo que a compatibilidade é mais frequente entre isolados da mesma localidade e a incompatibilidade parcial encontrada entre isolados é devida mais a genes nucleares do que citoplasmáticos (JINKS e GRINDLE, 1963) e pelo menos, cinco locos estão envolvidos (JINKS e col., 1966). Entre as linhagens de Glasgow é muito raro existir incompatibilidade na formação de heterocários (CUNHA, 1970).

Uma das causas da instabilidade genética encontrada nos organismos é a presença de elementos extracromossômicos, que geralmente, resulta em segregação irregular. Em *A. nidulans*, o exemplo mais típico de tal situação é o mutante "red", caracterizado por apresentar crescimento

lento e excreção de um pigmento vermelho no meio de cultura (ARLETT e col., 1962). Para evidenciar esses casos de segregação somática, devido a elementos extracromossômicos, é geralmente empregado um teste direto, o "teste de heterocário" (JINKS, 1954).

Na prática, um heterocário é geralmente construído entre duas linhagens com auxotrofias complementares e com a cor dos conídios diferente e é mantido em meio que não contenha os suplementos requeridos pelas linhagens. Dessa maneira, eles tem uma morfologia característica com crescimento não uniforme de setores heterocarióticos com cabeças conidiais das cores das linhagens que lhes deu origem (PONTECORVO e col., 1953). A cor dos conídios em *A. nidulans* tem ação autônoma e as cadeias conidiais são sempre uniformes na cor, refletindo a sua origem a partir de um único núcleo. Já em *A. niger*, as marcas genéticas da cor dos conídios não são autônomas, isto é, heterocários entre uma linhagem marrom e uma oliva, formam cabeças heterocarióticas que tem cadeias uniformes na cor, mas entre as cabeças conidiais ocorre uma variação de marrom a oliva até preta, possivelmente de acordo com as proporções nucleares (PONTECORVO e col., 1953). Os conídios produzidos por um heterocário são geralmente haplóides mas, ocasionalmente diplóides são formados pela fusão de dois núcleos haplóides. O diplóide heterozigoto formado é selecionado em meio que não contenha os requisitos nutricionais das linhagens haplóides e é caracterizado pelo seu crescimento nesse meio, pela cor e diâmetro dos seus conídios. A frequência de diplóides heterozigotos é variável em certos cruzamentos e condições, sendo aproximadamente um em 10 conídios (ROPER, 1952).

Os diplóides de *A. nidulans* não são completamente estáveis e durante o seu crescimento vegetativo estão sujeitos a dois processos pouco frequentes: a haploidização e permuta mitótica. A haploidização pode ser comparada ao processo meiótico sem permuta genética (PONTECORVO e col., 1954) envolvendo não disjunção originando núcleos trissômicos e monossômicos (PONTECORVO e KÄFER, 1958) e subsequentes perdas dos cromossomos até a fase haplóide estável ser atingida (KÄFER, 1961). A haploidização é usualmente a principal técnica empregada para localizar uma nova mutação ou detecção de uma translocação recíproca (KÄFER, 1962). A permuta mitótica ocorre no estágio de quatro fios (ROPER e PRITCHARD, 1955) e tem sido usada para mapeamento genético, para localizar o centrômero nos grupos de ligação e analisar translocações.

Uma série de agentes alteram a haploidização em diplóides de *A. nidulans*. A frequência de haploidização é aumentada com *p*-fluorfenilalanina (MORPURGO, 1961), arsenato (VAN ARKEL, 1963), benlate (HASTIE, 1970), fungicidas benzimidazóis e tiofanatos (KAPPAS e col., 1973, 1974); griseofulvina (KAPPAS e GEORGOPOULOS, 1974), várias drogas farmacêuticas (BIGNAMI e col., 1974) e cloroneb (AZEVEDO e SANTANA, 1975; AZEVEDO e col., 1977). Fungicidas com trifluorometil benzimidazol não interferem na haploidização (KAPPAS e col., 1973, 1974) mas ela pode ser reduzida pelo 1,4 oxathiin (AZEVEDO e col., 1977) ou pelo brometo de etídio (BONATELLI JR. e AZEVEDO, 1977).

O estudo dos agentes químicos em relação a instabilidade de diplóides de *A. nidulans* tem fornecido uma série de informações sobre

os fenômenos da haploidização e/ou permuta mitótica, além de permitir o emprego de outras substâncias em substituição a *p*-fluorfenilalanina com haploidizante ou ainda de substâncias que agem como parciais estabilizadoras de diplóides, como é o caso do fungicida 1,4 oxathiin (AZEVEDO e col., 1977) e do brometo de etídio, que é inclusive sugerido para reduzir a instabilidade de linhagens comerciais (BONATELLI JR. e AZEVEDO, 1977). Além dos compostos químicos, a recombinação mitótica é também alterada pela presença de determinados genes, assim, mutantes *rec* e *pop* conferem, respectivamente, baixa e alta frequência de recombinação mitótica em diplóides envolvendo linhagens com duplicação cromossômica, ambos tendo um profundo efeito sobre a permuta desses diplóides (PARAG, 1977).

2.3.2. Aneuploidia

Aneuplóides de *A. nidulans* podem ser originados de conídios haplóides e diplóides e de ascósporos. A aneuploidia já foi descrita logo após ter sido estudado o fenômeno da recombinação mitótica em diplóides onde por um processo de não disjunção é obtido o estado haplóide (KÄFER, 1961). Os aneuplóides mais estudados são os dissômicos ($n + 1$) cuja frequência de aparecimento a partir de conídios haplóides ou de ascósporos é de 0,1 a 0,3% (UPSHALL, 1966). Em cruzamentos entre linhagens contendo translocação heterozigota, a frequência de não disjunção aumenta, principalmente para os cromossomos envolvidos na translocação (KÄFER, 1965), resultando em uma maior frequência de dissômicos para esses cromossomos (POLLARD e col., 1968; UPSHALL, 1974; UPSHALL e KÄFER, 1974). Uma

alta frequência de não disjunção mitótica também ocorre para o grupo de ligação III em um isolado denominado V₈ originado de uma linhagem haplóide com duplicação cromossômica (AZEVEDO e ROPER, 1970). Nesse caso, a frequência de não disjunção não é alterada por variações de temperatura ou pH mas é aumentada com a idade do conídio (GABRIELLI e AZEVEDO, 1980). Tratamentos especiais podem também alterar a frequência de dissômicos, como é o caso da acriflavina, que dá 25% de dissômicos para o grupo de ligação IV a partir de conídios haplóides (BALL e ROPER, 1966).

Todos os possíveis dissômicos e trissômicos de *A. nidulans* foram isolados e bem caracterizados (KÄFER e UPSHALL, 1973). De um modo geral, eles são reconhecidos pelo seu crescimento lento, morfologia anormal no início do desenvolvimento, pouca conidiação e altamente instáveis produzindo setores haplóides vigorosos (UPSHALL, 1971, KÄFER e UPSHALL, 1973), no entanto, essa instabilidade pode ser reduzida pela indução de letais recessivos em um sistema balanceado no par de cromossomos homólogos (PIZZIRANI, 1977).

2.3.3. Duplicação

A duplicação cromossômica foi pela primeira vez detectada em *A. nidulans* em um revertente aparente para o gene *adE 20*, onde um segmento do cromossomo I, contendo esse gene, era translocado para o cromossomo II tornando tal linhagem instável (PRITCHARD, 1955). Várias outras linhagens duplicadas tem sido obtidas via translocações não recípro-

cas (BAINBRIDGE e ROPER, 1966; NGA e ROPER, 1969; ROPER e col., 1972; ALMEIDA, 1976; BIRKETT e ROPER, 1977). Todas as linhagens com diferentes duplicações obtidas, 7 ou 8 até agora, tem comportamento aparentemente similar com crescimento lento, uma morfologia "*crinkled*" característica de acordo com o segmento duplicado e são instáveis na mitose (BAINBRIDGE e ROPER, 1966; NGA e ROPER, 1968). Dessas linhagens, somente duas são definidas suficientemente para estudos detalhados, a linhagem A com duplicação I $\rightarrow$ II e a linhagem B com duplicação III $\rightarrow$ VIII (BIRKETT e ROPER, 1977).

A instabilidade observada nas linhagens com duplicação cromossômica é resultado do não balanceamento cromossômico encontrado em tais linhagens e causada pela perda do segmento em duplicata, originando setores melhorados (NGA e ROPER, 1968, 1969). É também relacionada ao aparecimento de inversões, novas duplicações em tandem e transposições do segmento duplicado, originando setores deteriorados (NGA e ROPER, 1968; AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971). A deleção do segmento duplicado pode atingir mais do que a duplicação, dando origem a setores heterocarióticos onde um dos componentes é letal (ROPER e NGA, 1969).

Uma série de fatores alteram o padrão normal da instabilidade de linhagens duplicadas e entre eles, certos agentes químicos e físicos ou mesmo a presença de fatores genéticos. Certas drogas presentes no meio de cultura como cafeína, atebrina, verde malaquita (PALMER e ROPER, 1970), azul de tripan (COOKE e col., 1970), etil metano sulfonato (ROSA-TO e AZEVEDO, 1978), DNA exógeno (MENEZES, 1974), cloroneb (AZEVEDO e

col., 1977) e cumarina (MAJERFELD e ROPER, 1978a) aumentam a instabilidade de linhagens e outras drogas como o 1,4-oxathiin (AZEVEDO e col., 1977) e brometo de etídio (BONATELLI JR. e AZEVEDO, 1977) reduzem tal instabilidade. Compostos como ciclohexamida, acriflavina, 6-aminonicotinamida, cristal violeta e metano não alteram o padrão de instabilidade (PALMER e ROPER, 1970). Agentes físicos como luz ultravioleta (MENEZES, 1974; AZEVEDO, 1975; PARAG e ROPER, 1975) e temperatura (LIEBER, 1976; NIFFI-NEGGER-SOUZA, 1979) também influenciam a instabilidade de linhagens como duplicação cromossômica. Em todos esses estudos, a ênfase principal é dada para a análise dos eventos principais da instabilidade procurando-se determinar a natureza dessa instabilidade. A expressão de genes em genomas não balanceados como é o caso das linhagens duplicadas, mostra que genes conferem sensibilidade à luz ultravioleta, aumentam a instabilidade (BURR e col., 1971). O alelo $uvrA^+$ no segmento duplicado, aumenta a resistência a ultravioleta e em diplóides não balanceados com três doses de $uvrA^+$ tem também sua resistência aumentada, refletindo uma interação do produto de $uvrA^+$ e outras funções determinadas pelo resto do genoma (MAJERFELD e ROPER, 1978b). A frequência de recombinação meiótica na duplicação é maior do que a frequência normal e esse fato é atribuído às mesmas lesões que são responsáveis pela ocorrência de deleções nas linhagens com duplicação cromossômica (VAN DE VATE e JANSEN, 1978).

Diplóides entre uma linhagem com duplicação cromossômica e linhagem haplóide livre de duplicação, são mais instáveis do que a linhagem duplicada. A maior instabilidade desses diplóides não balanceados está relacionada a permuta mitótica. Mesmo em diplóides homozigotos

para a duplicação, onde permuta mitótica não elimina o excesso de material genético, eles são extremamente instáveis e nesse caso, os setores surgem por deleções simultâneas em ambos os segmentos duplicados e são quantitativamente semelhantes ao diplóide com configuração de translocação homozigota (*CASE e ROPER, 1975*). A presença da duplicação associada a mutações, como *rec* e *pop*, afetam a recombinação mitótica em diplóides de *A. nidulans* (*PARAG, 1977*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens

As linhagens utilizadas, derivadas da linhagem selvagem de *Aspergillus nidulans* isolada por YUILL (1939), são originadas dos estoques do Departamento de Genética da Universidade de Glasgow, Escócia, mantidas no Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra. As linhagens dissômicas, diplóides e a MSEbin foram obtidas no Setor de Genética de Microrganismos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. Essas linhagens e suas características genéticas são mostradas na Tabela 1 e os símbolos dos genes mutantes e os respectivos fenótipos que eles determinam estão na Tabela 2. Na Figura 1 estão representados os grupos de ligação de *A. nidulans* com os marcadores genéticos utilizados neste trabalho, de acordo com CLUTTERBUCK (1974) com os símbolos propostos por CLUTTERBUCK (1973a).

Tabela 1 - Lista das linhagens de *A. nidulans* utilizadas nesse trabalho com os seus respectivos marcadores genéticos e sua origem.

LINHAGEM	G E N Ó T I P O	REFERÊNCIA
"Master Strain" E (MSE)	<i>yA2 suA1 adE20; wA3; galA1; pyroA4; facA303; sB3; nicB8; riboB2</i>	McCULLY e FORBES, 1965
"Master Strain" E (MSEbin)	<i>yA2 suA1 adE20; wA3; galA1; pyroA4 binA1; facA303; sB3; nicB8; riboB2</i>	PIZZIRANI, 1977
<i>proA1 pabaA6 yA2</i>	<i>proA1 pabaA6 yA2</i>	
<i>biA1; methG1</i>	<i>biA1; methG1</i>	
A	<i>proA1 pabaA6 T (I → II)</i>	NGA e ROPER, 1968

Tabela 2 - Lista dos locos gênicos das linhagens de *A. nidulans* utilizadas neste trabalho com os seus respectivos símbolos, fenótipos e grupos de ligação.

SÍMBOLO	F E N Ó T I P O	GRUPO DE LIGAÇÃO
<i>Nutricionais</i>		
<i>adE20</i>	requer adenina	I
<i>biA1</i>	requer biotina	I
<i>methG1</i>	requer metionina	IV
<i>nicB8</i>	requer ácido nicotínico	VII
<i>pabaA6</i>	requer ácido <i>p</i> -aminobenzóico	I
<i>proA1</i>	requer prolina	I
<i>pyroA4</i>	requer piridoxina	IV
<i>riboB2</i>	requer riboflavina	VIII
<i>sB3</i>	requer tiosulfato de sódio	VI
<i>facA303</i>	incapacidade para utilizar acetato	V
<i>galA1</i>	incapacidade para utilizar galactose	III
<i>Visíveis</i>		
<i>wA3</i>	conídios brancos, epistático a <i>y</i> e <i>y</i> ⁺	II
<i>yA2</i>	conídios amarelos	I
<i>Morfológicos</i>		
<i>binA1</i>	produz conídios uni, bi e trinucleados	IV
<i>Supressor</i>		
<i>suA1 adE20</i>	supressor de <i>adE20</i>	I

Figura 1 - Mapa parcial de ligação de *A. nidulans* com os marcadores genéticos utilizados neste trabalho. Os centrômeros estão representados por •. As distâncias no mapa não estão em escala.

3.2. Meios de cultura e soluções

3.2.1. Meio mínimo (*PONTECORVO e col., 1953*)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada.	1000 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

3.2.2. Meio completo (*PONTECORVO e col., 1953, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973*)

Adicionou-se ao meio mínimo:

Peptona	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Extrato de levedura	0,5 g
Solução de vitaminas.	1,0 ml
Ácido nucléico de leveduras hidrolisado	2,5 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

3.2.3. Solução de vitaminas

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

A solução foi guardada em frasco escuro no refrigerador à 4°C depois de ter sido aquecida em banho-maria por 15 minutos, sob cloro
fórmio.

3.2.4. Ácido nucléico de leveduras hidrolisado

Foram hidrolisados 2 g de ácido nucléico de leveduras em 15 ml de HCl 1N por 20 minutos a 100°C. O processo foi repetido com a mesma quantidade de ácido nucléico de leveduras em NaOH 1N. Os dois hidro
lisados foram misturados, o pH ajustado para 6,0 com NaOH 4% e então fil-
trados. O volume foi ajustado para 40 ml e a solução foi guardada em fras
co escuro com clorofórmio a 4°C.

3.2.5. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo

Ao meio mínimo líquido (item 3.2.1., sem o ágar) foi adi-

cionado 2% de meio completo líquido. A solução resultante foi distribuída 2,5 ml por tubo de ensaio.

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

$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	12,0 g
KH_2PO_4	3,0 g
NaCl	2,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
FeSO_4	traços
ZnSO_4	traços
Ágar.	15,0 g
Água destilada.	1000 ml
pH ajustado para 6,1 com NaOH	

3.2.7. Meio mínimo de galactose

Galactose	10,0 g
Meio mínimo líquido sem a glicose	1000 ml
Ágar.	15,0 g
pH ajustado para 6,8 com NaOH	

3.2.8. Suplementos adicionados ao meio mínimo

O estoque dos suplementos foi preparado adicionando-se cada um deles em água destilada esterilizada. As soluções foram aquecidas em banho-maria por 15 minutos e conservadas no refrigerador a 4°C.

S u b s t â n c i a	Concentração final ao meio de cultura (µg/ml)
Adenina	25,00
Ácido nicotínico.	0,50
Ácido p-aminobenzóico	0,25
Biotina	0,20
Metionina	50,00
Piridoxina.	0,25
Prolina	50,00
Riboflavina	0,50
Tiossulfato de sódio.	100,00

3.2.9. Solução salina

Solução de cloreto de sódio 0,89% em água destilada sendo a seguir distribuída em frascos (9 ml).

3.2.10. Solução de tween

Solução 0,1% de tween 80 em água destilada (v/v) e distribuída 2,5 ml por tubo.

3.2.11. Solução de desoxicolato de sódio

Solução de desoxicolato de sódio em água destilada em uma

concentração de 16%.

3.2.12. Solução de cloroneb (1,4-dicloro-2,5-dimetoxil benzeno)

Solução de cloroneb 2% (Du Pont, 65% de P.A.) em água destilada esterilizada a qual foi aquecida em banho-maria por 15 minutos e conservada no refrigerador.

3.2.13. Solução de *p*-fluorfenilalanina (*p*FA)

Solução de *p*-fluorfenilalanina 1% em água destilada esterilizada sendo a seguir aquecida por 15 minutos em banho-maria e conservada em refrigerador.

3.2.14. Solução de albumina

Solução de albumina 5% pela adição de clara de ovo em água destilada esterilizada e posterior conservação em frasco escuro no refrigerador.

3.2.15. Solução fosfato pH 6,9

Solução A

NaH_2PO_4	27,80 g
Água destilada	1000 ml

Solução B

Na_2HPO_4	53,65 g
Água destilada	1000 ml

Para pH 6,9 colocou-se 45 ml de A, 55 ml de B e 100 ml de água destilada.

3.2.16. Solução Helly

Bicromato de potássio	3,00 g
Cloreto de mercúrio.	5,00 g
Água destilada	100 ml

Conservou-se a solução em frasco escuro.

3.2.17. Solução de Giemsa

A solução de Giemsa foi preparada pela dissolução de 1 g de Giemsa (Merk) em 66 ml de glicerina à 60°C. Após resfriamento, foram acrescentados 66 ml de metanol e a solução resultante foi filtrada e con-

servada em frasco escuro.

3.2.18. Formol neutro

O formol neutro foi preparado pela adição de uma parte de carbonato de cálcio em três partes de formalina, com agitação esporádica por dez dias.

3.2.19. Meios empregados na análise genética

Para a análise genética das colônias, foram utilizadas placas de Petri com meio completo (MC), com meio mínimo (MM), com meio mínimo suplementado com todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento (M + T), meio mínimo de galactose com todos os requisitos (gal), meio mínimo de acetato com todos os requisitos (fac) e com meio mínimo suplementado com todos os requisitos, exceto aquele sob análise (por exemplo, M + T - pro). Para a transferência das colônias foi utilizado um replicador multifio de níquel-cromo com 26 pontos (AZEVEDO e col., 1976).

3.3. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e as soluções foram sempre esterilizados em autoclave por 15 minutos a uma atmosfera de pressão, com exceção

das soluções nas quais se utilizou água destilada esterilizada. Os meios e as soluções foram estocados em temperatura ambiente com exceção daqueles que estão assinalados e que foram estocados no refrigerador a 4°C.

A temperatura de incubação foi de 37°C, exceto nos experimentos onde se fez necessária sua variação para 28°C e 44°C. As estufas incubadoras foram uma B.O.D. (Fanem) com exceção dos experimentos para mapeamento genético (item 3.6.) e efeito do gene *bínA1* em heterocários (item 3.8) onde foi utilizada uma estufa Precision Thelco (modelo 4). Essa última estufa foi também empregada para os experimentos realizados a 44°C.

3.4. Observação de núcleos em conídios, hifas, vesículas e esterígmias

Para a coloração dos núcleos foi utilizada a técnica descrita por *ROBINOW e CATEN (1969)* com HCl-Giemsa, modificada por *PAES DE BARROS (1977)*. Na análise citológica, os conídios foram diretamente colocados sobre uma gota da solução de albumina na lamínula e com auxílio de outra lamínula, a suspensão foi homogeneizada, deixando-as secar separadamente. Para a observação de núcleos em hifas, vesículas esterígmias e formação do primeiro conídio, utilizou-se o processo de cultivo das colônias sobre a lamínula. Para isso, em placas contendo meio completo, colocaram-se quatro lamínulas (previamente esterilizadas em autoclave) sobre a superfície do meio e, conídios da linhagem em estudo, foram inoculados

ao redor das lamínulas. Após o período de incubação por diferentes intervalos de tempo, as lamínulas foram removidas e, com auxílio de um pincel, solução de albumina foi colocada sobre o material crescido.

O processo de coloração dos núcleos foi o mesmo, tanto para conídios colocados diretamente sobre a lamínula como para hifas, vesículas, esterígmias crescidas sobre a lamínula. Fez-se a fixação em 5 ml da solução Helly acrescida de 0,3 ml de formol neutro durante 15 minutos. Após esse período, as lamínulas foram transferidas para álcool etílico 70% e então submetidas a hidrólise em ácido clorídrico 1N a 63°C durante 20 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas duas vezes em água destilada e feita a coloração em 5 ml da solução fosfato pH 6,9 e 9 gotas de Giemsa. O tempo de coloração foi variável para cada linhagem, determinando-se assim que, para linhagens brancas 30 minutos e para linhagens verdes ou amarelas, 45 minutos. Decorrido esse tempo, as lamínulas foram lavadas em solução fosfato e colocadas em lâminas para a análise citológica.

Após a preparação das lâminas de cada linhagem, fizeram-se vários tipos de observações microscópicas dependendo da linhagem utilizada e do objetivo, quais sejam: contagem do número de conídios uni, bi, tri e tetranucleados da linhagem MSEbin incubada em diferentes temperaturas, de heterocários, de segregantes méióticos e mitóticos, medições do diâmetro de conídios e núcleos, observações da formação do primeiro conídio na linhagem MSEbin.

Uma amostra de pelo menos 500 conídios foi utilizada para as determinações de conídios uni, bi, tri e tetranucleados. Para todas as observações e medições, utilizou-se um microscópio Wild (Heerbrugg) M 20-34983 e uma ocular micrométrica Carl Zeiss 4892628 (8x).

Medições do volume de conídios da linhagem MSEbin e da linhagem MSE, foram também obtidas através de um "*Coulter Chancelizer*" no Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Grã Bretanha, gentilmente realizadas pelo Professor J.A. Roper. Para tal, conídios de cada uma das linhagens foram suspensos em tween 0,1% e a medida foi feita através do equipamento acima citado e os resultados registrados em gráfico.

3.5. Análise genética

3.5.1. Heterocários

Utilizando-se o método descrito por *PONTECORVO e col. (1953)*, foram feitos os cruzamentos entre pares de linhagens que diferiam sempre nos seus requisitos nutricionais e na cor dos conídios. Segundo o método, aproximadamente 10^6 conídios de cada uma das duas linhagens foram inoculadas em 2,5 ml de meio mínimo líquido enriquecido com 2% de meio completo, o que permite um crescimento inicial e,consequente anastomose das hifas com formação de película micelial após 3-4 dias de incubação. A película formada foi então removida e dividida em quatro partes,as quais foram colocadas equidistantes em placas contendo meio mínimo. Depois de 4-5 dias de incubação,os conídios dos setores heterocarióticos foram transferidos

para solução de tween 80 e a seguir semeados em placas com meio mínimo para seleção de diplóides. Para a análise citológica, os conídios do heterocário foram transferidos diretamente para uma lamínula com solução de albumina.

3.5.2. Isolamento de diplóides

Diplóides heterozigotos foram obtidos utilizando-se a técnica de *ROPER (1952)*, onde aproximadamente 10^7 conídios dos setores heterocarióticos são coletados e semeados em placas contendo meio mínimo. Após 72 horas de incubação, os diplóides heterozigotos foram isolados, sendo reconhecidos pela coloração uniforme e tamanho dos seus conídios. A medição dos conídios foi feita em microscópio com ocular micrométrica, tomando-se cadeias de cinco conídios em lâmina com lisol (1:10, lisoforme:água destilada). Os diplóides assim isolados foram purificados em placas contendo meio mínimo e estocados em tubos de ensaio com meio mínimo.

3.5.3. Análise mitótica

A análise mitótica baseia-se no ciclo parassexual, sendo utilizada para localizar uma mutação nos respectivos grupos de ligação de um fungo.

A indução da haploidização nos diplóides isolados foi feita com *p*-fluorfenilalanina em uma concentração de 750 µg/ml de meio com-

pleto (*LHOAS, 1961*) ou com cloroneb em uma concentração de 20 µg/ml de meio completo (*AZEVEDO e SANTANA, 1975*). Para isso, os diplóides foram inoculados em quatro pontos nas placas contendo o meio mais a substância haploidizante e, após 7-10 dias de incubação os setores originados foram purificados em meio completo e a seguir transferidos um a um em 26 pontos fixos em placas com meio completo. Após 72 horas de incubação, essa placa foi utilizada como placa mestra e portanto, replicada para os meios de análise através do replicador multifio. As leituras das placas foram feitas com 36 horas de incubação, anotando-se as colônias que cresceram e que não cresceram. Cada segregante mitótico, assim analisado quanto aos seus requisitos nutricionais, foi também submetido ao processo de coloração dos núcleos dos seus conídios pela técnica descrita no item 3.4., para localizar o gene *bínA1* no seu respectivo grupo de ligação.

3.5.4. Análise meiótica

A análise meiótica baseia-se no ciclo sexual do fungo através da análise de ascósporos produzidos em cleistotécios híbridos, segundo o método descrito por *PONTECORVO e col. (1953)*.

Para a obtenção de cleistotécios, as placas contendo a película micelial heterocariótica (3.5.1.) foram vedadas com fita celulósica por 8-10 dias. Após esse período de incubação, os cleistotécios foram retirados sob lupa e rolados em placas contendo meio mínimo para limpá-los de micélio, conídios e células de Hülle aderentes na parede cleistotecial.

Cada cleistotécio isolado foi transferido para tubos de ensaio contendo solução de tween onde foram esmagados contra a parede do tubo. Com a mesma pipeta utilizada para o esmagamento, a parede do tubo foi lavada para ressuspender os ascósporos na solução de tween e, 0,1 ml de cada suspensão foi semeado em placas com meio completo sendo a suspensão restante conservada no refrigerador. Após incubação por 72 horas, procedeu-se a verificação daqueles cleistotécios híbridos, uma vez que, nos cruzamentos sempre se utilizou-se linhagens com cor diferente dos conídios. Após seleção dos cleistotécios híbridos, 0,1 ml de diluições apropriadas de cada suspensão de ascósporos foi semeada em placas com meio completo ou meio mínimo adicionado dos requisitos de um segregante meiótico que se tinha interesse em isolá-lo. As placas foram incubadas por 72 horas e as colônias resultantes foram contadas para segregação de cor dos conídios, sendo a seguir transferidas para placas mestras (5x5+1) em meio completo. Os requisitos nutricionais foram testados mediante transferência das colônias, com replicador multifio, da placa mestra para os meios de análise. A resposta do crescimento ou não crescimento das colônias nas placas de análise, foi observada com 36 horas de incubação, após o que, cada uma delas foi submetida a análise citológica para determinação do número de núcleos nos seus conídios.

3.6. Mapeamento do gene *b1nA1*

A localização do gene *b1nA1* no seu respectivo grupo de li-

gação foi feita pela análise mitótica das linhagens MSEbin e *proA1 pabaA6 yA2*, seguindo-se os procedimentos descritos anteriormente (3.5.1., 3.5.2. e 3.5.3.). A haploidização foi induzida inicialmente com cloroneb, mas verificando-se que este atuava seletivamente permitindo de tectar somente setores haplóides *pyro*⁺, utilizou-se também o pFA, o qual permitiu também a obtenção de setores haplóides *pyro*. Com a análise mitótica foi possível localizar o gene *blnA1* no seu respectivo grupo de ligação e então, fez-se um teste de três pontos utilizando-se linhagens que possuíam marcadores genéticos nesse grupo de ligação. A análise meiótica (3.5.4.) foi efetuada, inicialmente, pelo cruzamento das linhagens MSEbin com *proA1 pabaA6 yA2* e posteriormente, MSEbin com *blnA1; methG1*.

3.7. Determinação da origem dos núcleos nos conídios da linhagem MSEbin

Em heterocários entre duas linhagens com conídios uninucleados, as vesículas das estruturas conidiais possuem núcleos de ambas as linhagens e somente um deles é incorporado no esterigma primário. Baseando-se nesse fato, procurou-se determinar a origem dos dois núcleos nos conídios da linhagem MSEbin através de heterocários entre essa linhagem e linhagens com conídios uninucleados e como controle, heterocários entre as mesmas linhagens e a linhagem MSE.

Os heterocários foram feitos pelo mesmo processo descrito no item 3.5.1., com exceção da película micelial ser transferida para

meio mínimo adicionado de ácido nicotínico (0,5 µg/ml) e riboflavina (0,5 µg/ml), ao invés de ser transferida só para meio mínimo e, os conídios dos setores heterocarióticos serem lavados suavemente com solução de tween em vez de serem retirados com alça de níquel cromo. A suspensão de conídios assim obtida foi diluída 1:10 em solução salina e semeada em placas com meio mínimo e, após diluições convenientes, semeada em placas com meio completo. Após 72 horas de incubação efetuou-se a contagem das colônias no meio completo, de ambas as linhagens envolvidas no heterocário, para estimar o número de conídios semeados no meio mínimo e, indiretamente, o número de núcleos de cada linhagem no heterocário. As placas com meio mínimo foram incubadas por 5 dias, após o que, se fez a contagem de colônias diplóides e heterocarióticas formadas.

A origem dos núcleos nos conídios da linhagem MSEbin foi também determinada pela análise citológica da estrutura conidial e mais especificamente, a análise do número de núcleos nos esterígmata primário e secundário e no primeiro conídio. As preparações citológicas foram feitas através do cultivo da linhagem MSEbin em lâmina, por diferentes intervalos de tempo, sendo a seguir efetuada a coloração dos núcleos (3.4.).

3.8. Efeito do gene *binA1* em heterocários

As linhagens utilizadas para formarem heterocários, MSEbin e *proA1 pabaA6 yA2*, foram previamente analisadas determinando-se o número de núcleos nos seus conídios (3.4.). Posteriormente foram obtidos hetero-

cários entre essas linhagens e, conídios dos setores heterocarióticos for mados tiveram seus núcleos corados e contados determinando-se o número de conídios uni, bi e trinucleados em cada uma das linhagens.

Para separar as duas linhagens componentes do heterocário, transferiram-se conídios dos setores heterocarióticos para solução de tween, os quais foram desagregados e semeados em placas contendo meio mínimo adicionado dos requisitos nutricionais da linhagem MSEbin (pyro+s+nic+ribo) e em placas com meio mínimo mais os requisitos nutri cionais da linhagem *proA1 pabaA6 yA2* (pro + paba). Após 72 horas de incu bação, os conídios de cada linhagem foram corados e contados determinan-do-se o número de conídios uni, bi e trinucleados.

3.9. Efeito do gene *bínA1* na meiose

Através de anormalidades na segregação para cor de coní-dios determinou-se o efeito do gene *bínA1* na meiose. Foram feitos cruza-mentos entre as linhagens MSEbin e *proA1 pabaA6 yA2* e entre MSE e *proA1 pabaA6 yA2* e de cada um deles, isolaram-se 30 cleistotécios de acor do com o processo descrito no item 3.5.4. As suspensões de ascósporos resultantes foram semeadas em placas contendo meio completo adicionado de 0,08% de desoxicolato de sódio (MACKINTOSH e PRITCHARD, 1963) para redu-zir o tamanho das colônias e permitir a análise de um grande número em poucas placas. A contagem de colônias brancas e amarelas foi efetuada após 72 horas de incubação.

3.10. Efeito de diferentes temperaturas no gene *binA1*

Para determinar o efeito da temperatura do gene *binA1* utilizou-se temperaturas diferentes de incubação para a linhagem MSEbin. Conídios dessa linhagem foram inoculados em placas com meio completo e incubados a 28°C, 37°C e 44°C por 5 dias. Após esse período, conídios das colônias resultantes foram submetidos as técnicas citológicas (3.4.) efetuando-se a contagem do número de conídios uni, bi e trinucleados das colônias desenvolvidas em cada uma das três temperaturas. Os resultados obtidos foram comparados pelo teste de χ^2 de contingência e foi efetuada uma análise da variância com os dados transformados em $\arcsin \sqrt{\frac{\%}{100}}$. A seguir, a expressão do gene *binA1* dentro de cada temperatura foi estudado seguindo um modelo de regressão linear (PIMENTEL GOMES, 1966).

3.11. Efeito da luz ultravioleta na linhagem MSEbin

O efeito da luz ultravioleta na linhagem MSEbin foi verificado através do estudo comparativo de curvas de sobrevivência dessa linhagem com a linhagem MSE. Separadamente, conídios das duas linhagens foram transferidos para solução de tween, desagregados por agitação e estimado o seu número na suspensão. Após diluição 1:10 em solução salina, retirou-se 1 ml da suspensão adicionando-se em 9 ml de solução salina (tempo zero) sendo o restante transferido para placas de Petri esterilizadas para ser submetido a irradiação ultravioleta. A fonte de U.V. foi uma lâm-

pada Mineralight (modelo nº R-52) a 2537 Å. Os tratamentos foram de 1, 2, 3, 4 e 5 minutos e após diluições convenientes, fez-se a semeadura em meio completo. Após 72 horas de incubação procedeu-se a contagem das colônias estimando-se o número de conídios viáveis por mililitro. A porcentagem de sobrevivência foi calculada para os diferentes intervalos de tempo em relação ao controle (tempo zero) considerado com o nível de 100% de sobrevivência. O estudo comparativo da sobrevivência das duas linhagens foi feita através da análise da variância utilizando os dados transformados em logarítmo. O efeito do tempo de irradiação na sobrevivência dos conídios foi estudado seguindo um modelo de regressão linear sendo a seguir feita uma comparação dos coeficientes de regressão linear das duas linhagens, utilizando para isso, o método dos quadrados mínimos.

3.12. Obtenção de linhagens dissômicas

Dissômicos foram obtidos espontaneamente mediante a semeadura de conídios da linhagem MSEbin (*PIZZIRANI, 1977*) e da linhagem MSE em meio completo adicionado de 0,08% de desoxicolato de sódio (*MACKINTOSH e PRITCHARD, 1963*) que reduz o tamanho das colônias e facilita a visualização de aneuplóides. Procedeu-se a contagem e a observação das colônias com 72 horas de incubação. Conídios das colônias com morfologia ou crescimento anormais foram transferidos para solução de tween desagregados e após diluição em salina, semeados em placas com meio completo. Microcolônias monospóricas (16 - 18 horas) foram transferidas para placas contendo meio completo e incubadas por 72 horas. Após a incubação, as colônias

identificadas como aneuplóides foram estocadas em tubos de ensaio com meio completo e conservados no refrigerador. Dentre os aneuplóides obtidos, procurou-se selecionar dissômicos para o mesmo grupo de ligação em ambas as linhagens.

3.13. Transferência do gene *binA1* para outras linhagens

A transferência do gene *binA1* da linhagem MSE bin foi feita para as linhagens A, *biA1*; *methG1* e *proA1 pabaA6 yA2* através do processo meiótico. Seguindo-se o método descrito no item 3.5.4., selecionaram-se os recombinantes pela semeadura dos ascósporos em meio mínimo adicionado dos requisitos nutricionais da linhagem em estudo. As colônias resultantes foram novamente testadas nos meios seletivos, inclusive para os marcadores *galA1* e *facA303*, e as que possuíam o mesmo genótipo da linhagem envolvida no cruzamento, foram submetidas às técnicas para coloração de núcleos para a seleção de segregantes portadores do gene *binA1*. Para se determinar a presença ou não da duplicação cromossômica nos segregantes obtidos de A x MSEbin, fez-se a inoculação do segregante selecionado em placas com meio completo e após o seu crescimento por 7 dias, a análise da presença ou não de setores típicos de uma linhagem com duplicação cromossômica.

3.14. Efeito do gene *bínA1* na instabilidade

O efeito do gene *bínA1* foi estudado na instabilidade de linhagens dissômicas, com duplicação cromossômica e de diplóides.

3.14.1. Em dissômicos

Linhagens dissômicas obtidas pelo processo descrito no item 3.12., para os grupos de ligação III e IV, com conídios uninucleados e com conídios uni, bi e trinucleados, foram analisadas quanto a sua instabilidade pela semeadura de seus conídios em placas com meio completo. Conídios do centro dissômico, de cada uma das linhagens, foram transferidos para solução de tween, desagregados sob agitação e estimado o seu número na suspensão com hemocitômetro. Diluições adequadas foram feitas em solução salina e 0,1 ml foi semeado em placas com meio completo. Após 72 horas de incubação, o número de colônias dissômicas e o número de colônias normais (haplóides) foi determinado para estimar a frequência de colônias haplóides para cada uma das linhagens dissômicas.

3.14.2. Em linhagens com duplicação cromossômica

Efetuada a seleção de uma linhagem com o mesmo genótipo da linhagem A mas com o gene *bínA1* da MSEbin (3.13.), foi possível verificar a influência do gene *bínA1* na instabilidade de linhagens duplicadas,

em comparação com a linhagem A utilizada como controle. Conídios destas linhagens foram inoculados em placas com meio completo e incubados em diferentes temperaturas. As placas colocadas a 28°C e 37°C foram mantidas por 7 dias e aquelas incubadas a 44°C foram mantidas por 10 dias na estufa. Para cada temperatura foram utilizadas 80 placas (40 + 40), para cada uma das linhagens, e após o período de incubação, procedeu-se a contagem dos setores amarelos, verdes, deteriorados e heterocarióticos em cada tratamento.

3.14.3. Em diplóides

Foi verificado o efeito do gene *binA1* na instabilidade de diplóides através da análise de setores produzidos por diplóides heterozigotos para o gene *binA1* e como controle, diplóides homozigotos para esse gene. Os diplóides utilizados foram: *Abin// MSE* e como controle *A// MSE* e *biA1; methG1 bin// MSE* e como controle *biA1; methG1// MSE*, todos obtidos segundo o método descrito no item 3.5.2.

Conídios dos diplóides foram inoculados em placas contendo meio completo e incubados a 28°C, 37°C e 44°C por 7 dias nas duas primeiras temperaturas e por 10 dias a 44°C. Fizeram-se 40 placas (20+20) para cada tratamento onde foi efetuada a contagem dos setores brancos, amarelos, verdes e deteriorados, para cada diplóide, nas três temperaturas.

3.15. Obtenção de linhagem com maior porcentagem de conídios bi e trinucleados

A obtenção de linhagens com maior porcentagem de conídios bi e trinucleados foi feita pela irradiação com luz ultravioleta da linhagem MSEbin, com o objetivo de se obter uma linhagem com 100% de conídios binucleados através da indução de letais balanceados nos núcleos dos seus conídios. O processo de irradiação utilizado foi o mesmo descrito anteriormente (ítem 3.11.) retirando-se apenas amostras com quatro minutos de irradiação (0,5% de sobrevivência). As colônias irradiadas resultantes foram inoculadas em placas com meio completo (quatro por placa) e após 72 horas de incubação, fizeram-se lâminas com os conídios dessas colônias com lisol (1:10, lisoforme:água destilada), sempre comparando com a linhagem MSE bin como controle. A linhagem MSEbin quando observada, mesmo sem coloração de seus núcleos, pode ser distinguida das linhagens que possuem só conídios uninucleados, pelo diâmetro maior e irregular dos conídios.

As colônias irradiadas que apresentaram qualquer alteração quanto ao tamanho dos conídios foram selecionadas e submetidas as técnicas para coloração de núcleos (ítem 3.4.).

4. RESULTADOS

4.1. A linhagem MSEbin

Para confirmação das características fenotípicas da linhagem MSEbin, obtida anteriormente (PIZZIRANI, 1977) e utilizada nesse trabalho, foram avaliados o número de núcleos nos conídios e o diâmetro de conídios e núcleos dessa linhagem. Na Tabela 3 estão mostradas as respectivas contagens de conídios uni, bi e trinucleados, com valores expressos em porcentagem em relação ao número total de conídios analisados, e na Tabela 4 estão mostrados os valores correspondentes do diâmetro de conídios e respectivos núcleos. Os dados das Tabelas 3 e 4 são considerados concordantes com aqueles de PIZZIRANI (1977). Na Tabela 5 estão mostrados os dados referentes ao volume dos conídios das linhagens MSEbin e MSE. Os dados desta Tabela estão apresentados de maneira comparativa entre os volumes obtidos através das medidas citológicas do diâmetro dos conídios (Tabela 4) e os volumes obtidos através do "Coulter Channelizer", considerando os dados correspondentes ao pico da curva obtida no registrador do equipamento. Na Figura 4 está mostrada a curva normal obtida no "Coulter

Channelizer" com os extremos correspondentes ao volume maior e menor dos conídios da linhagem MSEbin e linhagem MSE. A Figura 2 retrata a linhagem MSEbin e a linhagem MSE após crescimento em meio completo por sete dias a 37°C , mostrando que ambas são muito semelhantes fenotipicamente, com exceção da linhagem MSEbin ter coloração branca acinzentada. Os conídios uni, bi e trinucleados da linhagem MSEbin são mostrados na Figura 3, após coloração dos seus núcleos pela técnica HCl-Giemsa.

Tabela 3 - Análise citológica da linhagem MSEbin com determinação da porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados.

Repe- tição	Porcentagem de conídios			Nº total de conídios
	Uninucleados	Binucleados	Trinucleados	
1. ^a	75,69	24,17	0,14	720
2. ^a	78,57	21,13	0,30	672
3. ^a	80,38	19,35	0,27	744
Média	78,21	21,55	0,24	

Tabela 4 - Medida do diâmetro (em μm) de conídios e respectivos núcleos da linhagem MSEbin com valores médios de 30 mensurações e os desvios padrão correspondentes.

C o n í d i o s		$\hat{m} \pm \hat{s}$
Uninucleados	Conídio	$3,47 \pm 0,25$
	Núcleo	$1,36 \pm 0,13$
Binucleados	Conídio	$4,21 \pm 0,28$
	Núcleo	$1,31 \pm 0,13$
Trinucleados	Conídio	$5,05 \pm 0,25$
	Núcleo	$1,28 \pm 0,14$

Tabela 5 - Volume dos conídios da linhagem MSEbin e linhagem MSE obtido através da determinação citológica do diâmetro e através do "Coulter Chanelizer".

Linha- gem	Conídios	Determinação citológica do diâmetro dos conídios		Determinação pelo "Coulter Chanelizer"	
		Volume médio (μm^3)	Nº conídios analisados	Volume médio (μm^3)	Nº conídios analisados
MSEbin	uninucleados	21,87	30		
	binucleados	39,05	25,68*	23	19.088
	trinucleados	67,40	30		
MSE	uninucleados	18,30	30	16	17.909

*Volume médio corrigido para 78,21% de conídios uninucleados, 21,55% de conídios binucleados e 0,24% de conídios trinucleados.

Figura 2 - Linhagem MSEbin e linhagem MSE, crescidas em meio completo à 37°C por sete dias.

Figura 3 - Conídios uni, bi e trinucleados da linhagem MSEbin após coloração com HCl-Giemsa.

Figura 4 - Representação gráfica das medições dos volumes dos conídios da linhagem MSEbin e linhagem MSE obtido através do "Coulter Channelizer".

4.2. Mapeamento do gene *binA1*

4.2.1. Análise mitótica

Com o objetivo de localizar o gene *binA1* no seu respectivo grupo de ligação, foi selecionado o diplóide MSEbin // *proA1 pabaA6 yA2* e analisados os setores haplóides resultantes. A análise desses setores está mostrada na Tabela 6, considerando-se duas classes com relação ao número de núcleos nos conídios, ou seja, colônias com conídios uninucleados e colônias com conídios multinucleados. A primeira classe inclui colônias que apresentam pelo menos 99,8% de conídios uninucleados e a segunda classe inclui colônias que possuem também conídios binucleados, com porcentagens variando de 16,03 a 28,65%, e trinucleados até 0,76%. Conforme os resultados apresentados na Tabela 5, localizou-se o gene *binA1* no grupo de ligação IV.

4.2.2. Análise meiótica

Completando-se a análise genética, foi feita a análise meiótica considerando-se 203 segregantes do cruzamento da linhagem MSEbin com *biA1; methG1*. Nesta análise, classificou-se como colônias de conídios uninucleados (bin^+) aquelas com pelo menos 99% dos conídios com apenas um núcleo e como colônias de conídios multinucleados (bin) aquelas que também possuem conídios binucleados (de 13,14 a 31,16%), trinucleados (de 0,16 a 1,23%) e tetranucleados (0,13%). A Tabela 7 mostra os resultados

da análise meiótica dos segregantes analisados tendo em vista um teste de três pontos para os marcadores genéticos do grupo de ligação IV. Com os dados dessa Tabela, a segregação meiótica para conídios multinucleados: conídios uninucleados foi de 98:105 respectivamente, $\chi^2 = 0,241$, não significativo, considerando proporção 1:1. A Figura 5 representa o mapa genético para o grupo de ligação IV com os três marcadores: *methG1*, *binA1* e *pyroA4*.

A segregação meiótica para o carácter conídios uninucleados: multinucleados foi também determinada visualmente pela análise das colônias resultantes de ascósporos, uma vez que colônias que formam conídios uni, bi e trinucleados tem morfologia levemente alterada quando comparada com as que formam sô conídios uninucleados. Do cruzamento MSEbin com *biA1*; *methG1* determinou-se o número de segregantes meióticos com conídios uninucleados e com conídios multinucleados, sendo 139:142, respectivamente, $\chi^2 = 0,032$ não significativo, considerando proporção 1:1.

Tabela 6 - Análise mitótica considerando os requisitos nutricionais e o número de núcleos por conídios obtidos de setores haplóides do diplóide MSEbin// *proA1 pabaA6 yA2*.

Grupo de ligação	Marcador	C o n í d i o s		Total
		Uninucleados	Multinucleados	
I	<i>pro⁺ paba⁺</i>	21	10	31
	<i>pro paba</i>	5	3	8
II	<i>w⁺</i>	4	1	5
	<i>w</i>	22	12	34
III	<i>gal⁺</i>	15	10	25
	<i>gal</i>	11	3	14
IV	<i>pyro⁺</i>	26	1	27
	<i>pyro</i>	0	12	12
V	<i>fac⁺</i>	15	7	22
	<i>fac</i>	11	6	17
VI	<i>s⁺</i>	21	9	30
	<i>s</i>	5	4	9
VII	<i>nic⁺</i>	13	9	22
	<i>nic</i>	13	4	17
VIII	<i>ribo⁺</i>	16	11	27
	<i>ribo</i>	10	2	12

Tabela 7 - Análise meiótica envolvendo os genes *methG1*, *binA1* e *pyroA4* do grupo de ligação IV, com os valores correspondentes aos segregantes do cruzamento MSEbin X *binA1*; *methG1*.

C l a s s e s		Nº de segregantes	Total	Frequência das classes
Paternais	<i>meth bin⁺ pyro⁺</i>	51	91	0,448
	<i>meth⁺ bin pyro</i>	40		
Permuta simples	<i>meth bin pyro</i>	15	27	0,133
	<i>meth⁺ bin⁺ pyro⁺</i>	12		
Permuta simples	<i>meth bin⁺ pyro</i>	31	66	0,325
	<i>meth⁺ bin pyro⁺</i>	35		
Permuta dupla	<i>meth bin pyro⁺</i>	8	19	0,094
	<i>meth⁺ bin⁺ pyro</i>	11		

Distância entre os genes:

methG1 - *binA1* = 0,227

binA1 - *pyroA4* = 0,419

methG1 - *pyroA4* = 0,636

Valor da interferência = 1,06%

Valor da coincidência = 98,94%

Figura 5 - Mapa genético do grupo de ligação IV para os genes *methG1*, *binA1* e *pyroA4*.

4.3. Determinação da origem dos núcleos nos conídios bi e trinucleados da linhagem MSEbin

A origem dos núcleos nos conídios da linhagem MSEbin foi determinada através da análise de conídios formados em heterocários. Estudaram-se heterocários obtidos da linhagem MSEbin e linhagens com conídios uninucleados e concomitantemente, para fins de comparação, heterocários com essas mesmas linhagens uninucleadas e a linhagem MSE, portanto sem o gene *binA1*. Foi também efetuada a análise citológica da estrutura conidial da linhagem MSEbin, considerando-se vários estágios do seu desenvolvimento.

Os resultados correspondentes a análise dos heterocários são apresentados nas Tabelas 8 e 9, para os heterocários MSEbin + *proA1* *pabaA6* *yA2* e MSEbin + *biA1*; *methG1*, respectivamente. Nestas Tabelas estão mostrados os dados relacionados ao número de colônias heterocarióticas e diplóides formadas a partir de conídios provenientes de heterocários envolvendo a linhagem MSEbin, e comparativamente, heterocários envolvendo a linhagem MSE, evidenciando o efeito do gene *binA1* na formação de conídios heterocarióticos.

A análise citológica da estrutura conidial da linhagem MSEbin está mostrada na Figura 6, onde estão representadas algumas das observações feitas em diferentes períodos de incubação dessa linhagem. Nesta Figura, evidencia-se a existência de esterígmata primários com dois núcleos e estando um deles em fase final de divisão (a e b), esterígmata

primários com três núcleos (c), esterígmas primários e secundários binucleados (d), conídios binucleados formados em esterígmas secundários binucleados (e) e conídios binucleados formados em esterígmas secundários com dois núcleos em divisão (f).

Tabela 8 - Estimativa da proporção nuclear em heterocários e o número e frequência de colônias heterocarióticas e diplóides formadas a partir de conídios originados dos heterocários MSEbin + *proA1 pabaA6 yA2* e MSE + *proA1 pabaA6 yA2*.

Heterocário	Meio Completo			Meio Mínimo				
	Nº de co- lônias ama- relas	Nº de co- lônias bran- cas	Colônias amarelas: Colônias brancas	Nº total de conídios se- meados	Nº de co- lônias he- terocari- óticas	Frequência de colônias heterocari- óticas (em 10 ⁶ co- nídios)	Nº de co- lônias di- plóides	Frequência de colônias diplóides (em 10 ⁶ co- nídios)
MSEbin + <i>proA1 pabaA6 yA2</i>	468	131	3,6:1,0	1,20 x 10 ⁶	49	40,83	0	0
MSE + <i>proA1 pabaA6 yA2</i>	456	49	9,3:1,0	1,01 x 10 ⁶	0	0	0	0
MSEbin + <i>proA1 pabaA6 yA2</i>	216	23	9,4:1,0	2,87 x 10 ⁶	22	7,66	1	0,35
MSE + <i>proA1 pabaA6 yA2</i>	208	38	5,5:1,0	2,95 x 10 ⁶	0	0	0	0
MSEbin + <i>proA1 pabaA6 yA2</i>	216	40	5,4:1,0	5,12 x 10 ⁷	91	1,78	0	0
MSE + <i>proA1 pabaA6 yA2</i>	166	99	1,7:1,0	5,30 x 10 ⁷	2	0,03	1	0,02

Tabela 9 - Estimativa da proporção nuclear em heterocários e o número e frequência de colônias heterocarióticas e diplóides formadas a partir de conídios originados dos heterocários MSEbin + b₁A1; methG1 e MSE + b₁A1; methG1.

Heterocário	Meio Completo			Meio Mínimo		
	Nº de colônias verdes	Nº de colônias brancas	Colônias verdes: Colônias brancas	Nº total de conídios semeados	Nº de colônias heterocarióticas	Frequência de colônias diplóides (em 10 ⁶ conídios)
MSEbin + b ₁ A1; methG1	184	59	3,1:1,0	4,86 x 10 ⁶	51	1,44
MSE + b ₁ A1; methG1	72	29	2,5:1,0	2,02 x 10 ⁶	0	0
MSEbin + b ₁ A1; methG1	168	250	0,7:1,0	8,36 x 10 ⁶	30	0
MSE + b ₁ A1; methG1	73	209	0,4:1,0	5,64 x 10 ⁶	0	0

Figura 6 - Análise citológica da estrutura conidial na linhagem MSEbin após incubação em diferentes intervalos de tempo.

4.4. Efeito do gene *bínA1* em heterocários

A avaliação do efeito do gene *bínA1* em heterocários foi feita pela comparação do número de conídios uni, bi e trinucleados da linhagem MSEbin e linhagem *proA1 pabaA6 yA2* e do número de conídios uni, bi e trinucleados formados em heterocários entre essas duas linhagens. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 10 onde pode ser verificado a variação na porcentagem dos diferentes tipos de conídios. Assim, a linhagem MSEbin que forma 19,37% de conídios binucleados e 0,25 de trinucleados, no heterocário essas porcentagens são reduzidas enquanto que a linhagem *proA1 pabaA6 yA2* originalmente com 100% de conídios uninucleados, nos heterocários, forma conídios bi e trinucleados. É possível distinguir ambas as linhagens no heterocário pela coloração diferencial dos conídios, como mostra a Figura 7 onde pode ser verificado a presença de conídios uni e binucleados da linhagem MSEbin (conídios mais claros) e da linhagem *proA1 pabaA6 yA2* (conídios mais escuros). Os componentes dos heterocários foram também separados pela semeadura dos seus conídios em meio mínimo adicionado dos requisitos nutricionais de cada uma das linhagens, seguindo-se da coloração dos núcleos dos conídios e posterior exame microscópico. As porcentagens dos conídios uni, bi e trinucleados dos componentes dos heterocários, MSEbin e *proA1 pabaA6 yA2*, estão mostradas na Tabela 11, onde pode ser observado que o fenótico original foi parcialmente, pelo menos para MSEbin, recuperado nas linhagens assim selecionadas.

Tabela 10 - Porcentagens de conídios uni, bi e trinucleados das linhagens MSEbin e *proA1 pabaA6 yA2* e de heterocários delas obtidos.

Linhagem		Porcentagem de conídios			Nº total de conídios
		Uninucleados	Binucleados	Trinucleados	
	MSEbin	80,38	19,37	0,25	795
	<i>proA1 pabaA6 yA2</i>	100,00	0,00	0,00	750
Heterocário I	MSEbin	86,96	12,80	0,25	805
	<i>proA1 pabaA6 yA2</i>	96,14	3,86	0,00	596
Heterocário II	MSEbin	89,95	9,36	0,69	577
	<i>proA1 pabaA6 yA2</i>	92,32	7,29	0,39	508

Figura 7 - Conídios uninucleados e binucleados do heterocário MSEbin + *proA1 pabaA6 yA2*, após coloração com HCl-Giemsa.

Tabela 11 - Porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados das linhagens MSE bin e *proA1 pabaA6 yA2* originadas de heterocários.

Linhagem		Porcentagem de conídios			Nº total de coní- dios
		Uninuclea dos	Binuclea dos	Trinuclea dos	
Hetero cário I	MSE bin	86,02	13,42	0,56	708
	<i>proA1 pabaA6 yA2</i>	100,00	0,00	0,00	667
Hetero cário II	MSE bin	83,99	15,69	0,32	631
	<i>proA1 pabaA6 yA2</i>	100,00	0,00	0,00	603

4.5. Efeito do gene *bínA1* na meiose

Para se estudar o efeito do gene *bínA1* na meiose, procurou-se detectar possíveis alterações no padrão de segregação meiôtica para cor dos conídios. Assim, fizeram-se cruzamentos entre a linhagem MSEbin e linhagem *proA1 pabaA6 yA2* e também entre as linhagens MSE e *proA1 pabaA6 yA2*, para fins comparativos. De cada um dos cruzamentos isolaram-se 30 cleistotécios e de cada um deles, fez-se a contagem de pelo menos 400 colônias, cujos dados foram analisados pelo teste de X^2 , considerando a proporção 1:1 de colônias amarelas: colônias brancas. Verificou-se que em apenas um caso, cleistotécio de MSEbin X *proA1 pabaA6 yA2*, as diferenças foram significativas ao nível de 1% de probabilidade.

4.6. Efeito de diferentes temperaturas na expressão do gene *bínA1*

O efeito da temperatura na expressão do gene *bínA1* foi avaliado mediante contagem do número de núcleos nos conídios da linhagem MSEbin após o seu crescimento em estufas a diferentes temperaturas. Os dados obtidos, expressos em porcentagem, estão apresentados na Tabela 12, mostrando a grande variação encontrada na porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados em função da temperatura. Esses dados foram comparados pelo teste de contingência cujo valor de $x^2 = 436,1638^{**}$ (4 g.l.), mostra as diferenças altamente significativas dos valores obtidos. A Tabela 13 mostra a análise da variância para a porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados considerando as três temperaturas. Observa-se por esta

Tabela que para todos os tipos de núcleos, o quadrado médio de regressão linear foi estatisticamente significativo e o quadrado médio dos desvios não significativo. Tal fato indica que em todos os casos, a variação na porcentagem de conídios em relação a temperatura pode ser explicada somente pela regressão linear, isto é, o aumento ou diminuição de conídios uni, bi e trinucleados em função do aumento de temperatura ocorre de maneira linear. O coeficiente de variação do experimento foi de 8,77%. Na Figura 8 estão representadas as retas para conídios uni, bi e trinucleados obtidos pelas equações de regressão:

$$\hat{Y} = 19,1007 + 1,1631 X, \text{ para conídios uninucleados}$$

$$\hat{Y} = 68,1301 - 1,1045 X, \text{ para conídios binucleados}$$

$$\hat{Y} = 16,1364 - 0,2999 X, \text{ para conídios trinucleados,}$$

onde $\hat{Y}$ é a estimativa da porcentagem de conídios (em arc sen $\sqrt{\%$) e X a temperatura.

Tabela 12 - Porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados da linhagem MSE bin após incubação em diferentes temperaturas.

Temperatura de incubação	Repetição	Porcentagem de conídios			Nº total de conídios
		Uninucleados	Binucleados	Trinucleados	
28°C	1. ^a	68,28	31,14	0,58	867
	2. ^a	61,99	35,38	2,63	684
	3. ^a	59,01	38,58	2,40	832
	Média	63,09	35,03	1,87	
37°C	1. ^a	77,43	21,67	0,90	669
	2. ^a	74,07	24,40	1,53	918
	3. ^a	73,29	26,19	0,52	775
	Média	74,93	24,09	0,98	
44°C	1. ^a	94,07	5,66	0,28	725
	2. ^a	90,07	9,80	0,14	735
	3. ^a	84,56	15,20	0,24	842
	Média	89,57	10,22	0,22	

Tabela 13 - Análise da variância para porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados da linhagem MSE bin em relação a diferentes temperaturas de incubação (28, 37 e 44°C). Dados transformados em $\text{arc sen } \sqrt{\%}$.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	8	15.413,53	1.926,69	251,85**
Tipos de núcleos	2	14.343,09	7.171,55	937,45**
Temperatura/uninucleados	2	543,36		
R.L.	1	522,17	522,17	68,26**
Desvios	1	21,19	21,19	2,77 n.s.
Temperatura/binucleados	2	491,25		
R.L.	1	470,85	470,85	61,55**
Desvios	1	20,40	20,40	2,67 n.s.
Temperatura/trinucleados	2	35,83		
R.L.	1	34,71	34,71	4,54*
Desvios	1	1,12	1,12	<1
Resíduo médio	18	137,66	7,65

Figura 8 - Retas obtidas pelas equações de regressão para conídios uni, bi e trinucleados em função da temperatura de incubação. Dados transformados em arc sen $\sqrt{\%}$.

4.7. Efeito da luz ultravioleta na linhagem MSEbin

O efeito da luz ultravioleta na linhagem MSEbin foi estudado através de curvas de sobrevivência comparadas com curvas de sobrevivência da linhagem MSE. As duas linhagens foram submetidas a irradiação ultravioleta em diferentes intervalos de tempo e, após o período de incubação, contaram-se as colônias sobreviventes em relação ao tempo zero. As Tabelas 14 e 15 mostram o número de conídios, obtidos de duas repetições, e as respectivas porcentagens de sobrevivência nos diferentes intervalos de tempo de irradiação, para as linhagens MSEbin e MSE, respectivamente. Na Tabela 16 está apresentada a análise da variância considerando o número de conídios sobreviventes de ambas as linhagens, cujos dados foram transformados em logarítmo. Nesta Tabela, observa-se que o quadrado médio para regressão linear foi estatisticamente significativo enquanto que o quadrado médio para os desvios do modelo foi não significativo, indicando que a variação no número de conídios em relação aos diferentes tempos de irradiação pode ser explicada somente pela regressão linear. Além disso, verifica-se que os coeficientes de regressão linear de ambas as linhagens não diferem estatisticamente entre si, indicando que as duas linhagens apresentam uma tendência semelhante de diminuição no número de conídios sobreviventes com o aumento do tempo de irradiação à luz ultravioleta. O coeficiente de variação foi de 4,08%. Na Figura 9 estão representadas as curvas de sobrevivência baseadas nos valores médios das porcentagens relativas de conídios sobreviventes nos diferentes intervalos de tempo de irradiação, para as linhagens MSEbin e MSE, e as res-

pectivas retas baseadas nas equações de regressão linear:

$$\hat{Y} = 5,7888 - 0,5603 X, \text{ para a linhagem MSEbin}$$

$$\hat{Y} = 5,4483 - 0,6094 X, \text{ para a linhagem MSE,}$$

onde $\hat{Y}$ é a estimativa da porcentagem de conídios sobreviventes (em logarítmo) e X o tempo de irradiação a luz ultravioleta.

Tabela 14 - Número de conídios e respectivas porcentagens de sobrevivência à luz ultravioleta para a linhagem MSEbin.

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes	
	I	II	I	II
0	$7,00 \times 10^5$	$2,72 \times 10^5$	100,00	100,00
1	$2,89 \times 10^5$	$1,75 \times 10^5$	41,28	64,33
2	$6,36 \times 10^4$	$5,62 \times 10^4$	8,94	20,66
3	$1,31 \times 10^4$	$1,98 \times 10^4$	1,87	7,28
4	$2,08 \times 10^3$	$1,70 \times 10^3$	0,30	0,62
5	$1,01 \times 10^3$	$1,42 \times 10^3$	0,14	0,52

Tabela 15 - Número de conídios e respectivas porcentagens de sobrevivência à luz ultravioleta para a linhagem MSE.

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes	
	I	II	I	II
0	$2,32 \times 10^5$	$2,20 \times 10^5$	100,00	100,00
1	$9,00 \times 10^4$	$1,42 \times 10^5$	38,79	64,54
2	$1,72 \times 10^4$	$2,10 \times 10^4$	7,41	9,54
3	$3,98 \times 10^3$	$1,62 \times 10^3$	1,72	0,74
4	$5,84 \times 10^2$	$1,12 \times 10^3$	0,25	0,51
5	$5,36 \times 10^2$	$2,35 \times 10^2$	0,23	0,10

Figura 9 - Curva de sobrevivência a luz ultravioleta e retas obtidas pelas equações de regressão linear. Linhagens MSEbin e MSE.

Tabela 16 - Análise da variância para o número de conídios sobreviventes à luz ultravioleta em diferentes intervalos de tempo de irradiação, para as linhagens MSE bin e MSE. Dados transformados em logarítmo.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	11	25,8304	2,3482	
Parâmetros	3	25,2736	8,4245	293,54**
R.L./MSE bin	1	10,9878	10,9878	382,85**
R.L./MSE	1	12,9985	12,9985	452,91**
Linhagens	1	1,2873	1,2873	44,85**
Desvios do modelo	8	0,5568	0,0696	2,43 n.s.
Hipótese: $b_1 = b_2$	1	0,0424	0,0424	1,48 n.s.
Resíduo médio	12		0,0287	

4.8. Obtenção de linhagens dissômicas

Os dissômicos foram obtidos conforme o método descrito no ítem 3.12., utilizando-se conídios das linhagens MSEbin e MSE. Para a linhagem MSEbin foram obtidas 5.985 colônias normais e 7 colônias instáveis, supostamente aneuplóides. Dentre estas, 6 foram identificadas como dissômicas de acordo com a sua morfologia típica (*UPSHALL, 1971; KÄFER e UPSHALL, 1973*), sendo duas para o cromossomo IV, quatro para o cromossomo III e uma não pode ser identificada conforme seu padrão morfológico. O aparecimento de 7 aneuplóides, no total de 5.992 colônias, representa uma frequência de 0,117%. Com o objetivo de efetuar comparações quanto a instabilidade desses dissômicos com dissômicos originários da MSE, escolheram-se um para o grupo de ligação IV, denominado d1, e um para o grupo de ligação III, denominado d2. Esses dois dissômicos, assim como a MSEbin que lhes deu origem, possuem conídios uni, bi e trinucleados (*PIZZIRANI, 1977*).

Com a linhagem MSE, o mesmo procedimento foi seguido e em placas com meio completo mais desoxicolato de sódio, contaram-se 5.765 colônias normais e 8 supostamente aneuplóides. Destas, 5 puderam ser identificadas como dissômicas, cujo padrão morfológico permitiu identificar três para o grupo de ligação III, um para o grupo de ligação IV e um para o grupo de ligação VI. A frequência do aparecimento dos 8 aneuplóides representa no total de 5.773 colônias, 0,138% de aneuplóides. Como anteriormente, os dissômicos para os grupos de ligação IV e III foram selecionados para serem comparados com os obtidos da linhagem MSEbin e foram

denominados de D1 e D2, respectivamente.

4.9. Transferência do gene *binA1* para outras linhagens

O gene *binA1* da linhagem MSEbin foi transferido para a linhagem *biA1; methG1*, para a linhagem *proA1 pabaA6 yA2* e para a linhagem A, através do cruzamento sexual. Foram obtidos cleistotécios destes cruzamentos, e para selecionar colônias portadoras dos mesmos genes de cada uma das linhagens e mais o gene *binA1* da linhagem MSEbin, foram semeados ascósporos em meios seletivos, seguindo-se o método descrito no item 3.13.

Do cruzamento *biA1; methG1* X MSEbin, foram analisadas 25 colônias verdes das quais, quatro foram bi meth gal⁺ fac⁺ e destas, apenas uma apresentou conídios uni, bi e trinucleados, a qual foi denominada *biA1; methG1 bin*.

Do cruzamento *proA1 pabaA6 yA2* X MSEbin, analisaram-se 52 colônias amarelas e dessas, 13 possuíam o mesmo genótipo da linhagem original e após exame microscópico, uma delas apresentou conídios uni, bi e trinucleados, que foi denominada *proA1 pabaA6 yA2 bin*.

Do cruzamento A X MSEbin, analisaram-se 125 colônias verdes que cresceram em meio mínimo adicionado de prolina e ácido *p*-aminobenzóico e dessas, 26 foram pro paba gal⁺ fac⁺. Essas colônias quando inoculadas em meio completo (10 placas para cada colônia), 23 delas produ

ziram setores típicos de linhagem duplicada, semelhantes aos da linhagem A original. Após análise citológica das 23 colônias, selecionaram-se 5 com conídios uni, bi e trinucleados e dessas, uma foi utilizada para os próximos passos, denominada A bin.

Os números de conídios uni, bi e trinucleados das três linhagens, *biA1; methG1* bin, *proA1 pabaA6 yA2* bin e A bin, estão apresentados na Tabela 17, números esses expressos em porcentagens, bem como os valores de χ^2 obtidos pelo teste de independência, comparando-se cada uma das linhagens com a linhagem MSEbin. Pela análise desses valores, verifica-se que os tipos de conídios formados pelas linhagens *biA1; methG1* bin e *proA1 pabaA6 yA2* bin não diferem estatisticamente dos tipos de conídios da MSEbin, enquanto que para a linhagem A bin, as diferenças encontradas são significativas.

Tabela 17 - Porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados das linhagens *biA1; methG1* bin, *proA1 pabaA6 yA2* bin, A bin e MSE bin, e respectivos valores de X^2 para comparações entre tipos de conídios de cada linhagem e a linhagem MSE bin.

Linhagem	Porcentagem de conídios			Nº total de conídios	X^2
	Uninucleados	Binucleados	Trinucleados		
<i>biA1; methG1</i> bin	76,47	23,17	0,36	561	2,262 n.s.
<i>proA1 pabaA6 yA2</i> bin	74,95	24,48	0,57	523	0,752 n.s.
A bin	60,54	36,40	3,06	539	32,704**
MSE bin (média de 3 repetições à 37°C)	74,78	24,20	1,02	787	

4.10. Efeito do gene *binA1* na instabilidade

4.10.1. Em dissômicos

Nas linhagens dissômicas, para os grupos de ligação IV e III, obtidas das linhagens MSEbin e MSE, efetuou-se o estudo do efeito do gene *binA1* pela contagem do número de colônias dissômicas e haplóides originadas de conídios dissômicos. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 18 correspondendo aos dissômicos com conídios uninucleados, D1 e D2 para os grupos de ligação IV e III, respectivamente e aos dissômicos com conídios uni, bi e trinucleados, d1 e d2 para os grupos de ligação IV e III, respectivamente. Por esta Tabela, verifica-se que os dissômicos originados da linhagem MSEbin (d1 e d2), isto é, portadores do gene *binA1*, apresentam maior frequência de colônias haplóides, portanto mais instáveis do que os mesmos dissômicos originados da linhagem MSE (D1 e D2) sem o gene *binA1*.

Tabela 18 - Frequência de colônias haplóides provenientes de colônias dissômicas com conídios uninucleados (D1 e D2) e colônias dissômicas com conídios uni, bi e trinucleados (d1 e d2).

Dissômico	Grupo de ligação	Nº total de colônias	Frequência de colônias haplóides (%)
D1	IV	1.116	2,78
d1	IV	1.382	14,83
D2	III	1.106	3,89
d2	III	1.151	15,20

4.10.2. Em linhagens com duplicação cromossômica

O efeito do gene *bínA1* na instabilidade de linhagens com duplicação cromossômica foi verificado pela contagem do número de setores produzidos pela linhagem A bin, portanto portadora do gene *bínA1*, e pela linhagem A comparativamente. Os resultados obtidos para a linhagem A bin estão mostrados na Tabela 19 e para a linhagem A na Tabela 20. Em ambas as Tabelas estão incluídos os números e as frequências dos diferentes tipos de setores produzidos a 28°C, 37°C e 44°C para as duas linhagens e estão representados pelas abreviaturas: A (amarelos), V (verdes), D (deteriorados) e H (heterocarióticos). Comparando-se o número total de setores produzidos ou a média de setores por placa nas Tabelas 19 e 20, verifica-se que a linhagem A bin, tem sua instabilidade reduzida nas três temperaturas quando comparada com a instabilidade da linhagem A. As frequências dos tipos de setores observados estão apresentados comparativamente na Figura 10 para a linhagem A bin e linhagem A, mostrando a variação encontrada quanto aos diferentes tipos de setores em relação as temperaturas e as linhagens utilizadas.

Tabela 19 - Número e frequência de setores obtidos da linhagem A bin em diferentes temperaturas.

Setores	T e m p e r a t u r a			Total
	28°C	37°C	44°C	
A	68 (0,895)	87 (0,836)	122 (0,904)	277
V	1 (0,013)	3 (0,029)	6 (0,044)	10
D	4 (0,053)	8 (0,077)	6 (0,044)	18
H	3 (0,039)	6 (0,058)	1 (0,008)	10
Total	76	104	135	315
Nº de colonias analisadas	80	80	80	240
Média de setores / placa	0,95	1,30	1,69	1,31

Tabela 20 - Número e frequência de setores obtidos da linhagem A em diferentes temperaturas.

Setores	T e m p e r a t u r a			Total
	28°C	37°C	44°C	
A	106 (0,828)	180 (0,779)	434 (0,877)	720
V	19 (0,149)	37 (0,160)	41 (0,083)	97
D	3 (0,023)	6 (0,026)	17 (0,034)	26
H	0 (0,000)	8 (0,035)	3 (0,006)	11
Total	128	231	495	854
Nº de colônias analisadas	80	80	80	240
Média de setores / placa	1,60	2,89	6,19	3,56

Figura 10 - Frequência dos tipos de setores obtidos da linhagem A bin e linhagem A em diferentes temperaturas de in cubação.

4.10.3. Em diplóides

A instabilidade de diplóides foi verificada mediante contagem do número de setores produzidos por diplóides constituídos de linhagem portadora do gene *binA1* e linhagem MSE e para comparação, por diplóides constituídos pelas mesmas linhagens mas sem o gene *binA1*. Utilizaram-se diplóides envolvendo linhagens com duplicação cromossômica, A bin//MSE e A//MSE, e diplóides com linhagens haplóides normais, *binA1; methG1* bin//MSE e *binA1; methG1*//MSE.

Nas Tabelas 21 e 22 estão apresentados os resultados obtidos quanto ao número e frequência dos diferentes tipos de setores produzidos a 28°C, 37°C e 44°C para os diplóides A bin//MSE e A//MSE, respectivamente. Verifica-se que o número de setores observados nas três temperaturas é menor para o diplóide A bin//MSE que possui o gene *binA1* (Tabela 21) do que o diplóide A//MSE (Tabela 22). A comparação das frequências dos tipos de setores produzidos pelos dois diplóides está mostrada na Figura 11.

Para os diplóides, *binA1; methG1* bin//MSE e *binA1; methG1*//MSE, os resultados estão apresentados nas Tabelas 23 e 24, respectivamente. Pela comparação do número total de setores produzidos ou mesmo pelo número médio de setores por colônia, apresentados nestas Tabelas, verifica-se também que neste caso, a presença do gene *binA1* no diplóide (Tabela 23), reduz a instabilidade em relação aquela apresentada pelo diplóide sem o gene *binA1* (Tabela 24). As frequências dos tipos de setores produzidos,

nas três temperaturas, pelos diplóides *biA1; methG1* bin//MSE e *biA1; methG1*//MSE, estão representadas na Figura 12.

Nas Tabelas e Figuras, as abreviaturas A, B, V e D, significam setores amarelos, brancos, verdes e deteriorados.

Tabela 21 - Número e frequência de setores obtidos do diplóide A bin// MSE em diferentes temperaturas.

Setores	T e m p e r a t u r a			Total
	28°C	37°C	44°C	
A	382 (0,960)	433 (0,882)	197 (0,872)	1.012
B	14 (0,035)	58 (0,118)	24 (0,106)	96
V	0 (0,000)	0 (0,000)	5 (0,022)	5
D	2 (0,005)	0 (0,000)	0 (0,000)	2
Total	398	491	226	1.115
Nº de colônias analisadas	40	40	40	120
Média de setores / placa	9,95	12,28	5,65	9,29

Tabela 22 - Número e frequência de setores obtidos do diplóide A// MSE em diferentes temperaturas.

Setores	T e m p e r a t u r a			Total
	28°C	37°C	44°C	
A	494 (0,957)	689 (0,907)	556 (0,903)	1.739
B	22 (0,043)	70 (0,092)	60 (0,097)	152
V	0 (0,000)	0 (0,000)	0 (0,000)	00
D	0 (0,000)	1 (0,001)	0 (0,000)	1
Total	516	760	616	1.892
Nº de colonias analisadas	40	40	40	120
Média de setores / placa	12,90	19,00	15,40	15,77

Figura 11 - Frequência dos tipos de setores obtidos dos diplóides A bin// MSE e A// MSE em diferentes temperaturas de incubação.

Tabela 23 - Número e frequência de setores obtidos do diplóide *biA1; methG1 bin//* MSE em diferentes temperaturas.

Setores	T e m p e r a t u r a			Total
	28°C	37°C	44°C	
B	17 (0,650)	39 (0,661)	22 (0,449)	74
A	7 (0,350)	19 (0,322)	10 (0,204)	36
V	0 (0,000)	1 (0,017)	17 (0,347)	18
Total	20	59	49	128
Nº de colônias analisadas	40	40	40	120
Média de setores / placa	0,5	1,48	1,22	1,07

Tabela 24 - Número e frequência de setores obtidos do diplóide *biA1; methG1* // MSE em diferentes temperaturas.

Setores	T e m p e r a t u r a			Total
	28°C	37°C	44°C	
B	53 (0,654)	77 (0,520)	34 (0,472)	164
A	25 (0,309)	58 (0,392)	33 (0,458)	116
V	3 (0,037)	13 (0,088)	5 (0,070)	21
Total	81	148	72	301
Nº de colônias analisadas	40	40	40	120
Média de setores / placa	2,02	3,70	1,80	2,51

Figura 12 - Frequência dos tipos de setores obtidos dos diplóides *biA1;methG1* bin// MSE e *biA1;metG1* // MSE em diferentes temperaturas de incubação.

4.11. Seleção de linhagem com maior porcentagem de conídios binucleados e trinucleados

Após o tratamento dos conídios da linhagem MSEbin com luz ultravioleta para produção de cerca de 0,5% de sobreviventes (item 3.11.), 264 colônias foram analisadas citologicamente com lisol e dessas, 14 foram selecionadas por apresentarem variação no diâmetro ou forma dos conídios, quando comparadas com a linhagem MSEbin. As 14 colônias foram submetidas às técnicas para coloração de núcleos e três delas, apresentaram variação quanto ao número de núcleos nos conídios. Uma das colônias selecionadas, a MSEbin I, apresentou o dobro de conídios binucleados e trinucleados em relação aos da linhagem MSEbin e as outras com 100% de conídios uninucleados (MSEbin II e MSEbin III). Esses resultados estão mostrados na Tabela 25.

Tabela 25 - Porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados de colonias selecionadas após irradiação ultravioleta de conídios da linhagem MSE bin.

Linhagem		Porcentagem de conídios			Nº total de conídios
		Uninucleados	Binucleados	Trinucleados	
MSE bin I	1. ^a repet.	55,85	40,06	4,09	709
	2. ^a repet.	55,17	41,00	3,83	522
	Média	55,51	40,53	3,96	
MSE bin II	1. ^a repet.	100,00	0,00	0,00	701
	2. ^a repet.	100,00	0,00	0,00	655
	Média	100,00	0,00	0,00	
MSE bin III	1. ^a repet.	100,00	0,00	0,00	808
	2. ^a repet.	100,00	0,00	0,00	692
	Média	100,00	0,00	0,00	
MSE bin	1. ^a repet.	76,65	22,92	0,43	698
	2. ^a repet.	79,25	20,44	0,31	636
	Média	77,95	21,68	0,37	

5. DISCUSSÃO

5.1. Análise fenotípica e genética da linhagem MSEbin

A linhagem MSEbin é um mutante espontâneo derivado da linhagem MSE - "*Master Strain*" E (Mc CULLY e FORBES, 1965) e tem o mesmo genótipo dessa linhagem, exceto o gene *bínA1* que determina a formação de conídios com mais de um núcleo. O estudo do efeito do gene *bínA1* foi facilitado pelo fato dessa linhagem possuir marcadores em todos os grupos de ligação permitindo assim uma análise genética mais detalhada e, além disso, ter conídios brancos, facilitando por isso a utilização de técnicas citológicas. O fenótipo determinado por esse gene, se manifesta pela produção de conídios uninucleados, binucleados e trinucleados em porcentagens relativamente bem definidas, nas mesmas condições ambientais (Tabela 3).

A formação de conídios com mais de um núcleo foi detectada pela primeira vez em *A. nidulans*; entretanto, em outras espécies, inclusive do gênero *Aspergillus*, existe uma grande variação em relação ao número

de conídios uni, bi, tri e mesmo tetranucleados (YUILL, 1950). Essa mesma variação é encontrada também em espécies do mesmo gênero nas quais diplóides já foram obtidos e em algumas destas, a condição diplóide reduz o número de conídios com mais de um núcleo em comparação com as linhagens haplóides que o constituíram como em *A. flavus* (PAPA, 1973; LEAICH e PAPA, 1975; MESSIAS, 1977), *Aspergillus* sp 321 (PEREIRA, 1978) e *A. niger* (AZEVEDO e BONATELLI JR., 1981). Por outro lado, em um único caso parece ocorrer um aumento do número de núcleos em diplóides de *A. niger* (CHANG e col., 1974). Observações feitas em linhagens diplóides de *A. nidulans*, onde uma das linhagens que o constituem é portadora do gene *binA1*, mostram que também nesta espécie, os conídios diplóides analisados são uninucleados. Isso permite sugerir que existe um tamanho máximo para conídios do gênero *Aspergillus* onde conídios com $n+n+n+n$ e $2n+2n$ ou mais cromossomos são de ocorrência rara, provavelmente devido às dificuldades para sua formação.

Ocorre variação no diâmetro dos conídios da linhagem MSEbin, sendo que há um aumento gradativo de acordo com o aumento do número de núcleos (Tabela 4). Em *A. niger*, os conídios binucleados são também maiores do que os uninucleados (ROSIM e col., 1978). Dessa maneira, em *A. niger* (BONATELLI JR., 1981), em *A. flavus* (MESSIAS, 1977) e agora em *A. nidulans*, a ocorrência de conídios com mais de núcleo, dificulta a detecção de diplóides pela simples mensuração do diâmetro de conídios, quando linhagens que apresentam essa característica estão envolvidas.

O volume dos conídios determinado através de medidas do diâmetro após análise microscópica, mostra que existe uma correlação en

tre o mesmo e o número de núcleos presentes. Por outro lado, a determinação pelo contador automático de partículas ("*Coulter Chanelizer*") revela um volume médio ligeiramente inferior ao volume daquele determinado citologicamente, tanto para a linhagem MSEbin como para o controle MSE (Tabela 5, Figura 2). Considerando que a amostra de conídios, analisada pelo "*Coulter Chanelizer*" é muito superior aquela da análise citológica, os valores assim obtidos devem ser os que mais se aproximam do valor real, aliás, como anteriormente observado para *Metarrhizium anisopliae* (AZEVEDO e MESSIAS, 1981). Os valores para o volume dos conídios uninucleados da linhagem MSEbin são ligeiramente superiores ao dos conídios uninucleados da linhagem MSE, que afora causas ambientais pode indicar o efeito pleiotrópico do gene *bínA1*. Efeitos pleiotrópicos desse gene são verificados também quanto a morfologia da colônia (Figura 2). Nos laboratórios de Genética onde é utilizado *A. nidulans* sabe-se que existe uma variação no diâmetro de conídios de linhagens haplóides desse fungo. Esse fato pode indicar que existam linhagens com conídios que possuem mais de um núcleo, o que pode ser confirmado por uma análise citológica mais detalhada dessas linhagens.

O mapeamento genético do marcador *bínA1* foi realizado inicialmente pela análise mitótica com o isolamento de diplóide heterozigoto da linhagem MSEbin e *proA1 pabaA6 yA2* e posterior análise dos requisitos nutricionais e análise citológica dos haplóides (Tabela 6). Com os dados foi possível localizar *bínA1* no grupo de ligação IV, uma vez que todos os haplóides portadores do gene *pyroA4* formaram conídios uni, bi e trinucleados e nenhum deles apresentou 100% de conídios uninucleados. Por

outro lado, somente um dos haplóides com o gene *pyroA4*⁺ apresentou conídios com mais de um núcleo, provavelmente como resultado de permuta mitótica, contudo a maioria deles (ou seja, 26) são portadores de conídios uninucleados. A análise meiótica de MSEbin X *proA1 pabaA6 yA2* mostrou não ligação de *binA1* com *pyroA4* (PIZZIRANI e AZEVEDO, 1976), por essa razão, foi efetuada a análise meiótica da linhagem MSEbin com *binA1; methG1*. Esse cruzamento permitiu demonstrar que o caráter número de núcleos nos conídios segrega como um gene simples e, por um teste de três pontos envolvendo os genes *binA1*, *methG1* e *pyroA4* (Tabela 7), foi possível mapear o gene *binA1* a 22,7 cM de *methG1* (Figura 5).

No mapa genético de *A. nidulans* (CLUTTERBUCK, 1974), o centrômero do grupo de ligação IV localiza-se a 22 unidades de recombinação do gene *methG1* que é o único marcador no braço esquerdo desse grupo de ligação. O gene *binA1* está localizado também a cerca de 22 unidades de recombinação de *methG1* e entre *methG1* e *pyroA4* (Figura 5), portanto, bem próximo ao centrômero, no mesmo braço que *methG1* ou no mesmo braço que *pyroA4*. Para se decidir entre essas duas alternativas, pode ser construído um diplóide com as marcas *methG1*, *binA1* e *pyroA4* em associação e, os setores diplóides homozigotos *binA1//binA1*, poderão ser homozigotos ou para *methG1* ou para *pyroA4*, conforme o gene *binA1* seja proximal a *methG1* ou a *pyroA4*, respectivamente.

5.2. Origem dos núcleos

A reprodução assexuada de *A. nidulans* envolve uma série de eventos que levam a formação de estruturas diferenciadas constituídas por conidióforo, esterígmata e conídios. Após mitoses sucessivas ocorre migração dos núcleos da vesícula do conidióforo para os esterígmata primários, esterígmata secundários e finalmente para os conídios, de modo que todos os conídios de uma cadeia tem um único núcleo de mesma constituição genética (PONTECORVO e col., 1953). A presença de conídios com mais de um núcleo na linhagem MSEbin implica nas possibilidades de ocorrência de divisão nuclear posterior à entrada de um núcleo no conídio, ou então da incorporação de mais de um núcleo pelos esterígmata primários e consequente formação de conídios com mais de um núcleo. Outra alternativa seria a ocorrência conjunta destas possibilidades, de modo que algumas cadeias de conídios seriam formados por um ou pelo outro processo. Estas possibilidades podem ser convenientemente avaliadas através da análise do tipo de conídio formado em heterocários constituídos por linhagens de auxotrofias complementares. Assim, conídios com núcleos de cada uma das linhagens ou conídios com núcleos de mesma origem, não poderão crescer em meio mínimo. Aqueles com origem diferente, consequentemente portadores de marcas genéticas complementares, crescerão neste meio, sejam heterocários ou diplóides heterozigotos. Conforme se observa nas Tabelas 8 e 9, foi constatado que são formados conídios heterocarióticos, o que permite concluir que a presença de mais de um núcleo é devida a migração de mais de um núcleo da vesícula do conidióforo para o esterígma. Procurando-se ava-

liar a eficiência deste método de análise, foi utilizado como controle heterocários da linhagem MSE com as mesmas linhagens de conídios uninucleados, transferindo-se conídios por lavagem com solução de tween ao invés de transferi-los com alça de níquel-cromo, evitando-se assim a semeadura de pedaços de hifas heterocarióticas. O método mostrou-se apropriado para essa finalidade e poderá ser usado em casos semelhantes.

As suspensões provenientes dos heterocários foram também semeadas em meio completo para permitir quantificar o número de conídios semeados no meio mínimo, o qual foi utilizado para estimar a frequência de heterocários e diplóides formados. Em heterocários formados com a linhagem MSEbin, a frequência de conídios heterocarióticos foi muito superior aquela encontrada nos controles. Apenas duas colônias heterocarióticas foram detectadas em comparação com 243 colônias heterocarióticas originadas de heterocários com a linhagem MSEbin, ou seja, com a frequência de um em 10^5 conídios. Estes dados comparados com os obtidos para *A. níger* (CHANG e col., 1974) mostram que em *A. nidulans* os conídios heterocarióticos são menos frequentes, pois em *A. níger* a frequência é da ordem de 10^4 . Essa frequência menor de conídios heterocarióticos em *A. nidulans* pode estar relacionada à própria porcentagem de conídios binucleados da linhagem MSEbin que é aproximadamente 20%, enquanto que as linhagens de *A. níger* utilizadas por CHANG e col. (1974) possuíam aproximadamente 60% de conídios binucleados.

Com a finalidade de verificar uma possível relação entre o número de conídios heterocarióticos formados e a proporção de conídios

binucleados da linhagem MSEbin, determinou-se a proporção nuclear das linhagens envolvidas pela contagem do número de colônias desenvolvidas no meio completo. No entanto, em nenhum heterocário a proporção nuclear foi de 1:1, como verificado por outros autores (*NIFFINEGGER - SOUZA, 1979*), não sendo possível, portanto, estabelecer tal relação. Em heterocários com a mesma proporção nuclear onde uma das linhagens possui 20% de conídios binucleados, teoricamente, é de se esperar 6,6% de conídios heterocarióticos e 13,2% de homocarióticos, sendo estes últimos, não detectados no meio mínimo.

As observações citológicas acompanhando-se o desenvolvimento da estrutura conidial da linhagem MSEbin, permitiram confirmar que os núcleos nos conídios binucleados são originados pela incorporação de dois núcleos da vesícula pelo esterígio primário. A Figura 6 mostra algumas dessas observações feitas em diferentes períodos de incubação. Durante a formação da estrutura conidial pode ser verificado no início do desenvolvimento a presença de esterígios primários contendo dois núcleos, sendo um deles em fase final de divisão (a e b), eliminando desse modo a possibilidade de um deles ter origem na divisão de apenas um núcleo incorporado pelo esterígio. Nas fases posteriores ao desenvolvimento pode ser observado esterígios primários com três núcleos (c), esterígios primários e secundários já formados e cada um deles contendo dois núcleos (d), conídios binucleados em esterígios secundários trinucleados (e) e também conídios binucleados em esterígios secundários com dois núcleos em divisão, provavelmente para dar origem ao segundo conídio também binucleado (f). A observação de fases posteriores do desenvolvimento não foi possível pelo acúmulo

lo de cadeias conidiais o que dificultou a identificação individual de cadeias de conídios uni, bi ou trinucleados. No entanto, as observações citológicas apresentadas e a análise do tipo de conídios em heterocários com a linhagem MSEbin, fornecem evidências que os núcleos nos conídios bi e trinucleados tem origem diferente, contudo, é possível ocorrer a migração de núcleos com mitoses posteriores durante a formação destes conídios heterocarióticos. Para avaliar esta possibilidade seria necessário compor heterocários com igual número de núcleos das linhagens, o que não foi possível obter neste trabalho.

É interessante salientar que o gene *bínA1* aqui estudado, parece ter expressão contrária a dos genes *aps* estudados por CLUTTERBUCK (1969b). Nesses mutantes, os núcleos da vesícula não migram para os esterígmias primários, tornando-os anucleados e impedindo o crescimento dos esterígmias secundários e, no presente trabalho, ocorre migração de dois núcleos para os esterígmias primários, originando esterígmias e conídios binucleados. Dois mutantes *aps* foram descritos, e um deles, o *apsA* foi mapeado no grupo de ligação IV (CLUTTERBUCK, 1974), à semelhança da localização do gene *bínA1*.

5.3. Efeito do gene *bínA1* em heterocários e na meiose

Heterocários entre a linhagem MSEbin e linhagens com conídios uninucleados formam conídios binucleados e trinucleados em porcentagens menores que a linhagem MSEbin, sendo que a linhagem originalmente

uninucleada produz também conídios bi e trinucleados (Tabela 10, Figura 7). Este efeito pode ser comparado àquele dos genes para cor de conídios em *A. niger*, onde heterocários tem uma variação de cor entre as estruturas conidiais (PONTECORVO e col., 1953), efeito este considerado como devido à expressão não autônoma dos genes envolvidos. É interessante observar que nos heterocários analisados, as porcentagens de conídios uni, bi e trinucleados são diferentes, mas as somas dos valores encontrados nas duas linhagens, principalmente para conídios binucleados, são muito próximas (heterocário I: $12,80 + 3,86 = 16,66\%$, heterocário II: $9,36 + 7,29 = 16,65\%$). Estes dados indicam que o gene *bínA1* determina um limite da porcentagem de conídios uninucleados, binucleados e trinucleados. Efetuando-se o crescimento das colônias obtidas de conídios dos heterocários, verifica-se que as porcentagens de núcleos presentes nos conídios voltam a apresentar os valores originais, como mostrado na Tabela 11. Estes resultados evidenciam que o gene *bínA1* deve codificar um produto que no heterocário determina a presença de conídios bi e trinucleados na linhagem não portadora do gene. Durante a germinação dos conídios desta linhagem o produto gênico é diluído, de modo que, a característica original é recuperada.

Verificado o efeito do gene *bínA1* em heterocários, procurou-se também determinar sua possível influência na meiose e para tanto, cruzamentos envolvendo a linhagem MSEbin foram analisados considerando-se segregação para cor de conídios. Na amostra analisada não foi possível detectar anormalidades no padrão de segregação, pois apenas um entre 60 cleistotécios mostrou segregação anormal, provavelmente um cleistotécio

gêmeo. Esta frequência é considerada dentro dos limites normalmente encontrados em *A. nidulans* (PONTECORVO e col., 1953). Uma outra possibilidade de estudar o efeito do gene *binA1* na meiose seria através da análise do número de núcleos dos ascósporos, que são normalmente binucleados em *A. nidulans* (PONTECORVO e col., 1953). Esse tipo de estudo, envolvendo cruzamentos de linhagens com conídios uni, bi e trinucleados, permitiria determinar se o gene *binA1* está especificamente relacionado ao processo da conidiação ou se trata de um gene também relacionado ao processo sexual. Em *A. nidulans*, genes envolvidos no desenvolvimento da estrutura conidial podem também estar relacionados a formação de cleistotécios, como o são os mutantes "*stu*" e "*med*" que tem estrutura conidial anormal e são defectivos na formação de cleistotécios (CLUTTERBUCK, 1969a).

5.4. Efeito da temperatura e da luz ultravioleta na linhagem MSEbin

Com o objetivo de determinar o efeito de fatores ambientais na expressão do gene *binA1*, foram escolhidos a temperatura e a irradiação ultravioleta dentro os vários fatores possíveis de serem estudados.

Comparando-se o número de núcleos nos conídios em diferentes temperaturas, verifica-se que ocorre uma grande variação (Tabelas 12 e 13). A porcentagem de conídios uninucleados aumenta gradativamente de acordo com o aumento da temperatura de incubação da linhagem e, ao mesmo tempo, as porcentagens de conídios bi e trinucleados diminuem, como pode

ser constatado através da regressão linear (Figura 8). A diminuição das porcentagens de conídios com mais de um núcleo em função do aumento da temperatura, sugere a existência de algum produto termo-sensível envolvido na distribuição nuclear da vesícula para os esterígmas. Mutantes termo-sensíveis para distribuição anormal de núcleos nas hifas (mutantes "nud") já foram descritos por MORRIS (1976), nos quais os núcleos ficam agrupados próximo aos eixos das hifas quando na temperatura restritiva. Uma comparação mais efetiva entre os genes *binA1* e *nud* poderia ser feita através do estudo do comportamento e da quantidade de núcleos presentes nas vesículas e hifas da linhagem MSEbin em diferentes temperaturas. Além dessa comparação, pode também ser feita a determinação de enzimas envolvidas no processo de desenvolvimento e diferenciação da estrutura conidial da linhagem MSEbin e MSE, como a *p*-difenol oxidase (CLUTTERBUCK, 1969c, 1972; MARTINELLI, 1976) e cresolase (CLUTTERBUCK, 1977).

O efeito da luz ultravioleta foi avaliado efetuando-se a comparação das curvas de sobrevivência das linhagens MSEbin e MSE, considerando-se vários tempos de exposição. Os dados apresentados nas Tabelas 14 e 15 e Figura 9 revelam que a presença de conídios bi e trinucleados parecem tornar a linhagem MSEbin mais resistente do que a linhagem que produz somente conídios uninucleados. Esta observação, contudo, está limitada a certos tempos de exposição e revelam a tendência dos dados, pois não foi encontrada diferença significativa ao serem comparadas as duas retas de regressão (Tabela 16). Em linhagens com porcentagens maiores de conídios com mais de um núcleo ou então, em tempos maiores de exposição, provavelmente, os efeitos observados seriam mais expres

sivos. A presença de mais de um núcleo ou a condição diplóide, são fatores que conferem maior resistência devido a possibilidade de compensação de efeitos letais recessivos produzidos.

Com luz ultravioleta foi possível obter colônias que produzem maior e menor porcentagem de conídios com mais de um núcleo (Tabela 25). Das várias colônias analisadas, uma delas apresentou a porcentagem de conídios bi e trinucleados dobrada em relação a linhagem MSEbin. Esse isolado é, provavelmente, resultado de mutação no próprio gene *binA1*, ou mutação em um segundo gene, também relacionado ao processo da migração de núcleos da vesícula para os esterígmas primários, ou, ao processo de divisão mitótica. Duas outras colônias selecionadas mostraram ter somente conídios uninucleados, o que no caso, pode ser sugerido tratar de uma reversão ou supressão do gene *binA1*. Futuros estudos genéticos nestes isolados permitirão decidir qual o tipo de fenômeno que ocasiona o aumento e a redução do número de conídios com mais de um núcleo.

5.5. Transferência do gene *binA1* e estudo do seu efeito em diferentes linhagens

Considerando que dissômicos originados da linhagem MSEbin possuem conídios uni, bi e trinucleados nas mesmas proporções que a MSEbin (PIZZIRANI, 1977), procurou-se obter os mesmos dissômicos a partir da linhagem MSE, com o objetivo de efetuar comparações quanto a instabilidade (Ítem 5.6.).

Na obtenção destes dissômicos foi feita, conjuntamente, uma contagem de todos os tipos de aneuplóides, para estudar o efeito do gene *binA1* na frequência de não disjunção mitótica responsável pelo aparecimento destes aneuplóides. Considerando as frequências totais de aneuplóides para as duas linhagens estudadas, pode ser verificado que são muito semelhantes, ou seja, 0,117% para a linhagem MSEbin e 0,138% para a linhagem MSE, mostrando que o gene *binA1* não interfere com a não disjunção mitótica que origina aneuplóides. Estes dados comparados com os obtidos por outros autores revelam que, também, a presença de aberrações cromossômicas não alteram a não disjunção mitótica de diplóides (POLLARD e col., 1968), mas que em linhagens haplóides, a não disjunção é aumentada pela presença de duplicações cromossômicas (DANTAS D'ARCE, 1972; PIZZIRANI, 1977).

Com a finalidade de verificar a expressão do gene *binA1* em outras linhagens de *A. nidulans*, foi feita sua transferência para linhagens comumente utilizadas através do cruzamento sexual da linhagem MSEbin com linhagens haplóides normais e com linhagem haplóide duplicada (Tabela 17). Das três linhagens analisadas, somente a linhagem portadora de duplicação cromossômica apresentou porcentagens superiores de conídios bi e trinucleados em relação a linhagem MSEbin, enquanto que nas linhagens haplóides normais, o gene *binA1* teve expressão semelhante aquela apresentada pela linhagem MSEbin. Possivelmente, a presença de duplicação cromossômica combinada com o efeito do gene *binA1* contribui para aumentar o número de conídios com mais de um núcleo. Estes efeitos poderiam ser explicados tendo em vista que a duplicação cromossômica ocasiona

um aumento no volume dos conídios bem maior do que seria de se esperar devido ao tamanho da duplicação (PAES DE BARROS, 1977; CASE e ROPER, 1978). Isto indica que a duplicação influencia o tamanho dos conídios que associado ao gene *bínA1*, acarretaria um aumento do número de conídios bi e trinucleados, além do que, já foi observado nesta linhagem um pequeno aumento de conídios binucleados (PAES DE BARROS, 1977).

5.6. Efeito do gene *bínA1* na instabilidade

A instabilidade mitótica em fungos filamentosos pode ser devida à várias causas (BALL e AZEVEDO, 1976), dentre as quais as aberrações cromossômicas é uma das mais importantes. Muitos fatores alteram o padrão normal da instabilidade de linhagens com aberrações cromossômicas e entre eles, certos agentes químicos e físicos e também fatores genéticos (Ítem 2.3.). Considerando estes aspectos, foi estudado o efeito do gene *bínA1* na instabilidade de linhagens dissômicas, linhagens com duplicação cromossômica e em linhagens diplóides, utilizando-se em todos os casos, as mesmas linhagens portadoras e não portadoras deste gene.

Em dissômicos, a alteração de instabilidade foi verificada através da frequência de colônias haplóides formadas a partir de conídios dissômicos. A frequência de colônias haplóides reflete o número de conídios já haplóides, o que indica a perda do cromossomo adicional nos núcleos do micélio ou na germinação dos conídios. Os valores encontrados para os dissômicos analisados que possuem conídios uni, bi e trinucleados

(Tabela 18) são aproximadamente cinco vezes mais instáveis (14,83% e 15,20% de colônias haplóides) do que os mesmos dissômicos com conídios uninucleados (2,78% e 3,89% de colônias haplóides). Essa maior instabilidade pode estar relacionada à presença de núcleos adicionais em alguns conídios, sendo necessário portanto um número maior de divisões mitóticas no início do desenvolvimento, aumentando assim, a chance de perda do cromossomo extra e resultando em maior frequência de colônias haplóides.

Em linhagens portadoras de duplicação cromossômica e em linhagens diplóides a alteração da instabilidade foi verificada através da contagem do número e tipo de setores produzidos em cada uma das linhagens. Tanto para linhagens duplicadas como para diplóides ocorreu uma marcante influência do gene *binA1*, com redução da instabilidade quando este gene estava presente (Tabelas 19 a 24 e Figuras 9 a 12). Essa redução ocorreu em todas as temperaturas ensaiadas, praticamente para todos os tipos de setores produzidos e inclusive, em diplóides com ou sem duplicação cromossômica. Redução de instabilidade em fungos filamentosos já foram constatados, tanto em *A. niger* (SILVA e AZEVEDO, 1978; AZEVEDO e BONATELLI JR., 1981), como em *A. nidulans*, onde essa maior estabilidade foi conseguida por agentes químicos e por recursos genéticos. No caso de *A. nidulans*, linhagens diplóides e linhagens com duplicação cromossômica foram estabilizadas parcialmente com o 1,4-oxathiin (AZEVEDO e col., 1977) e com o brometo de etídio (BONATELLI JR. e AZEVEDO, 1977). Também foram descritos casos onde uma redução da instabilidade em linhagens duplicadas foi conseguida por aberrações cromossômicas (LEE e NGA, 1973) e por um gene simples (AZEVEDO, 1975; BALL e AZEVEDO, 1976). A redução de instabi

lidade observada para linhagens portadoras do gene *bínA1* pode ser compara da com os dados obtidos por estes autores, como segue:

A g e n t e	Redução de instabilidade (em nº de vezes)		R e f e r ê n c i a
	Linhagens duplicadas	Diplóides	
1,4-oxathiin	6,8	10,4	AZEVEDO e col., 1977
Brometo de etídio	6,7	6,9	BONATELLI JR. e AZEVEDO, 1977
<i>stf-1</i>	3,6	-	AZEVEDO, 1975
<i>bínA1</i>	2,2	2,0	PIZZIRANI, 1981

Comparativamente, pode ser verificado que os agentes quími cos causam maior redução de instabilidade do que os genes e entre estes, o gene *stf-1* é mais efetivo do que *bínA1*. Estes dados podem ser indicativos de que o gene *bínA1* contribui para estabilizar as linha gens, como já descrito anteriormente por AZEVEDO (1975), onde também a presença de um gene simples, o *stf-1*, atua como estabilizador parcial do sistema. Duas das hipóteses levantadas por AZEVEDO (1975) podem também aqui estar envolvidas na estabilização: 1. alteração na quantidade de pro duto do gene mutado, produto este que seria importante para a ocorrência de permuta mitótica; 2. interferência do gene mutado no processo mitótico, dificultando um pareamento entre homólogos, que é raro na mitose mas es sencial para que ocorra permuta somática, uma das responsáveis pela insta bilidade do sistema. É importante salientar que o gene *bínA1* ocasiona re

dução de instabilidade em linhagens com duplicação cromossômica e em diplóides, assim como, observado pelos autores citados anteriormente, sugerindo que as mesmas causas sejam responsáveis pelo processo de estabilização em ambas as linhagens. A estabilização que pode ser conseguida utilizando-se genes estabilizadores é recurso de grande interesse pois pode permitir uma melhor compreensão das verdadeiras causas da instabilidade genética e também como meio para reduzir a instabilidade por métodos genéticos em linhagens utilizadas em indústria. A manipulação genética de linhagens em programas de melhoramento permite obter linhagens com características favoráveis, porém em alguns casos instáveis. Não só linhagens obtidas por processos convencionais, como principalmente, pelas novas tecnologias como a fusão de protoplastos e DNA recombinante, podem apresentar alta instabilidade, o que dificulta a sua utilização em processos industriais.

O *A. nidulans* sempre foi considerado um excelente modelo onde estudos genéticos são realizados de maneira conveniente e extrapolados a fungos de importância aplicada. No entanto, uma crítica ao seu uso nesse sentido era a de que, apresentando tipicamente conídios uninucleados, ele seria diferente dos fungos industriais tipo *Penicillium* e outros *Aspergillus*, onde conídios binucleados são frequentes. A descoberta de um *A. nidulans* contendo conídios com mais de um núcleo permite ampliar a utilização deste fungo como modelo, além de poder explicar como fungos filamentosos que tem conídios binucleados mantêm-se, pelo menos em parte, estáveis. Atualmente, as barreiras entre espécies já foram vencidas e por fusão de protoplastos seria interessante transferir o gene *bánA1* de

A. nidulans para espécies de valor econômico como certas linhagens industriais instáveis de *A. niger* (AZEVEDO e BONATELLI JR., 1981) e verificar qual seu efeito na estabilização da linhagem. Outras possibilidades para futuros estudos do efeito do gene *binA1* seriam a verificação da sua influência na permuta meiótica e em mecanismos de reparo.

Ainda as Tabelas 19 a 24 revelam que, independentemente do gene *binA1*, a instabilidade da linhagem com duplicação cromossômica é influenciada por diferentes temperaturas, sendo que a 44°C, maior instabilidade é verificada, confirmando os dados anteriormente obtidos por NIFFE-NEGGER-SOUZA (1979). Entretanto, verifica-se que em relação aos diplóides, maior instabilidade ocorre a 37°C, que é praticamente a temperatura ótima de crescimento de *A. nidulans*. A 28°C e 44°C o número de setores é menor, de modo que a alteração da temperatura pode ser utilizada na estabilização parcial de diplóides no laboratório ou mesmo em condições de indústria.

6. CONCLUSÕES

A linhagem MSEbin de *A. nidulans* possui conídios uni, bi e trinucleados em proporções definidas. O seu estudo genético e citológico permite concluir que:

a) O caráter é governado por um gene denominado *binA1*, que foi localizado no grupo de ligação IV à 22,7 cM do gene *methG1*.

b) Os núcleos adicionais nos conídios preferencialmente são de origem diferente, sendo que dois ou três núcleos da vesícula são incorporados pelos esterígmas primários, o que resulta nos conídios bi ou trinucleados.

c) A semelhança do efeito de genes para cor de conídios em *A. niger* (PONTECORVO e col., 1953), o gene *binA1* tem expressão não autônoma em heterocários.

d) A expressão do gene *binA1* é influenciada pela temperatura, o que parece ser devido ao envolvimento de algum componente termo-sensível na formação de conídios com mais de um núcleo.

e) Após tratamento com luz ultravioleta, foi verificado ocorrer variação na expressão do gene *bínA1* causando aumento e também diminuição nas porcentagens de conídios bi e trinucleados, efeito possivelmente causado por mutação do gene *bínA1* ou de outros genes envolvidos na expressão do caráter.

f) O aumento da porcentagem de conídios com mais de um único núcleo em linhagem com duplicação cromossômica e portadora do gene *bínA1*, é interpretado como devido ao maior volume dos conídios desta linhagem possibilitando a entrada de mais de um núcleo, ou devido ao efeito combinado do gene *bínA1* ao efeito da linhagem, que normalmente apresenta uma pequena quantidade de conídios binucleados.

g) A presença do gene *bínA1* altera a instabilidade de dissômicos, de diplóides e de linhagens com duplicação cromossômica. Os dissômicos são cerca de cinco vezes mais instáveis, provavelmente devido ao maior número de divisões mitóticas necessárias para o desenvolvimento de colônias dissômicas portadoras do gene *bínA1*. Em linhagens duplicadas e diplóides, o gene *bínA1* reduz a instabilidade em 2,2 e 2,0 vezes, respectivamente. Neste caso, o gene *bínA1* atua como um estabilizador parcial, possivelmente interferindo na permuta somática ou no pareamento entre homólogos, impedindo permuta mitótica, uma das responsáveis pela instabilidade destas linhagens.

7. LITERATURA CITADA

- ALMEIDA, L.M., 1976. Obtenção de linhagens com duplicações cromossômicas em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter e sua instabilidade. Piracicaba, ESALQ/USP, 122p. (Dissertação de Mestrado).
- APIRION, D., 1962. A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice versa in micro-organisms. *Nature*, London, 195:959-961.
- ARLETT, C.F., M. GRINDLE e J.L. JINKS, 1962. The red cytoplasmatic variant of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 17:197-209.
- ATWOOD, K.C. e F. MUKAI, 1955. Nuclear distribution in conidia of *Neurospora heterokaryons*. *Genetics*, 40:438-443.
- AXELROD, D.E., 1972. Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 73:181-184.
- AXELROD, D.E., M. GEALT e M. PASTUSHOK, 1973. Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Developmental Biology*, 34:9-15.

- AZEVEDO, J.L., 1965. The centromere of chromosome VII of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 6:7.
- AZEVEDO, J.L., 1971. Mitotic non conformity in *Aspergillus nidulans*. England, University of Sheffield. 240p. (Ph.D. Thesis).
- AZEVEDO, J.L., 1972. O ciclo parassexual em fungos. *Revista de Microbiologia*, 3:157-168.
- AZEVEDO, J.L., 1975. Altered instability due to genetic changes in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 26:55-61.
- AZEVEDO, J.L. e C.L. MESSIAS, 1981. Tamanho de conídios em diferentes isolados de *Metarrhizium anisopliae*. In: Azevedo, J.L., C.L. Messias e M.A. Naves (ed.). *Controle Biológico de Cigarrinhas por Fungos*. Brasília, EMBRAPA, 2, p.5-8.
- AZEVEDO, J.L. e E.P. SANTANA, 1975. The use of chloroneb to obtain haploid segregants from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 13:6.
- AZEVEDO, J.L. e J.A. ROPER, 1970. Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: successive and transposable genetic changes. *Genetical Research*, 16:79-93.
- AZEVEDO, J.L. e R. BONATELLI JR., 1981. Genetics of the overproduction of organic acids. In: *International Symposium on Overproduction of Microbial Products*. Hradec-Kralové, Federation European Microbiological Societies, 24p. (no prelo).
- AZEVEDO, J.L. e S.O.P. COSTA, 1973. *Exercícios práticos de genética*. São Paulo, Companhia Editora Nacional. 288p.

- AZEVEDO, J.L., A. OLIVEIRA e A.J. ROCHA CAMPOS, 1976. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. *Summa Phytopathologica*, 2:237-241.
- AZEVEDO, J.L., E.P. SANTANA e R. BONATELLI JR., 1977. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 48:163-172.
- BAINBRIDGE, B.W., 1971. Macromolecular composition and nuclear division during spore germination in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 66:319-325.
- BAINBRIDGE, B.W., 1976. Estimation of the generation time and peripheral growth zone of *Aspergillus nidulans* and *Alternaria solani* hiphae from radial growth rates and range in apical cell lenght. *Journal of General Microbiology*, 97:125-127.
- BAINBRIDGE, B.W. e J.A. ROPER, 1966. Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 42:417-424.
- BALL, C. e J.A. ROPER, 1966. Studies on the inhibition and mutation of *Aspergillus nidulans* by acridines. *Genetical Research*, 7:207-221.
- BALL, C. e J.L. AZEVEDO, 1964. A "fluffy" mutant in *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 5:9.
- BALL, C. e J.L. AZEVEDO, 1976. The applied significance of genetic instability in parasexual fungi. In: 2nd *International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms*. New York, Academic Press, p.243-251.

- BARACHO, I.R. e W.R. COELHO, 1978a. Influência da idade e origem da colônia na proporção de conídios binucleados em *Aspergillus niger*. *Revista de Microbiologia*, 9:1-3.
- BARACHO, I.R. e W.R. COELHO, 1978b. Proporção de conídios binucleados em *Aspergillus niger*. *Ciência e Cultura*, 30:605-608.
- BIAGI, C.M.R., 1977. Mutantes morfológicos induzidos por 8-metoxipsoralina e luz ultra-violeta em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 150p. (Dissertação de Mestrado).
- BIGNAMI, M., G. MORPURGO, G. PAGLIANI, A. CARERE, G. CONTI e D. DIGIUSEPPE, 1974. Non-disjunction and crossing-over induced by pharmaceutical drugs in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 26:159-170.
- BIRKETT, J.A. e J.A. ROPER, 1977. Chromosome aberrations in *Aspergillus nidulans*. In: Smith, J.E. e J.A. Pateman (ed.). *Genetics and Physiology of Aspergillus*. London, Academic Press, p.293-303.
- BONATELLI JR., R., 1981. Parassexualidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, ESALQ/USP, 81p. (Tese de Doutorado)
- BONATELLI JR., R. e J.L. AZEVEDO, 1977. Effects of ethidium bromide in diploid and duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Experientia*, 33:311-312.
- BULL, A.T., 1970. Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. *Journal of General Microbiology*, 63:75-94.
- BULL, A.T. e B.L.A. CARTER, 1973. The isolation of tyrosinase from *Aspergillus nidulans* cell walls, its kinetics and molecular properties and some consideration of its activity in vivo. *Journal of General Microbiology*, 75:61-63.

- BURR, K.W., H.M. PALMER e J.A. ROPER, 1971. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the effect of reduced DNA repair. *Heredity*, 27:487.
- CASE, B.L. e J.A. ROPER, 1975. Genetic imbalance and mitotic nonconformity in *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 13:8-11.
- CASE, B.L. e J.A. ROPER, 1978. Conidiospore size in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 14:20-24.
- CHANG, L.T., C. TERRY e R.W. TUVESON, 1974. The influence of heterokaryotic conidia on the selective recovery of somatic diploids in *Aspergillus niger*. *Mycologia*, 66:67-72.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1969a. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 63:317-327.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1969b. Cell volume per nucleus in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 55:291-299.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1969c. The effect of morphological and spore colour mutants on a spore specific enzyme of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 24:515.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1970a. Synchronous nuclear division and septation in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 60:133-135.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1970b. A variagated position effect in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 16:303-316.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 70:423-435.

- CLUTTERBUCK, A.J., 1973a. Gene symbols in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 21:291-296.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1973b. Interrelations between development and pigmentation during conidiation of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 74:s50.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1974. *Aspergillus nidulans*. In: King, R.C. (ed.). *Handbook of Genetics I*. New York, Plenum Press, p.447-510.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1975. Cyclic AMP levels during growth and conidiation. *Aspergillus News Letter*, 12:13-15.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1977. The genetics of conidiation in *Aspergillus nidulans*. In: Smith, J.E. e J.A. Pateman (ed.). *Genetics and Physiology of Aspergillus*. London, Academic Press, p.305-317.
- CLUTTERBUCK, A.J. e J.A. ROPER, 1966. A direct determination of nuclear distribution in heterokaryons of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 7:185-194.
- COCHRANE, V.W., 1958. *Physiology of Fungi*. New York, John Wiley e Sons. Inc. 524p.
- COLLINGE, A.J. e TRINCI, A.P.J., 1974. Hyphal tips of wild-type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa*. *Archives of Microbiology*, 99:353-368.
- COOKE, P., J.A. ROPER e W. WATMOUGH, 1970. Trypan blue induced deletions in duplications strains of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London, 226:276-277.

- CRACKOWER, S.H.B., 1972. The effect of griseofulvin on mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 18:683-687.
- CUNHA, P.R., 1970. A study of aspects of heterokaryosis in *Aspergillus nidulans*. Reimpresso das memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 167p.
- DANTAS D'ARCE, M.M.C., 1972. Contribuição ao estudo de aberrações cromossômicas numéricas em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 50p. (Dissertação de Mestrado).
- DORN, G.L., 1970. Genetic and morphological properties of undifferentiated and invasive variants of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 66:267-279.
- DORN, G.L., G.M. MARTIN e D.M. PURNELL, 1967. Genetic and cytoplasmic control of undifferentiated growth in *Aspergillus nidulans*. *Life Science*, 6:629-633.
- ELLIOTT, C.G., 1960. The cytology of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 1:462-476.
- ELOIZA, M.V., H.N. ARST, D.J. COVE e C. SCAZZOCCHIO, 1969. Permeability properties of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *Journal of Bacteriology*, 99:113-115.
- ESSER, K. e R. KUENEN, 1967. *Genetics of Fungi*. Berlin, Springer-Verlag. 500p.
- FELDEN, R.A., M.M. SANDERS e N.R. MORRIS, 1976. Presence of histones in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Biology*, 68:430-439.
- FIDDY, C. e A.P.J. TRINCI, 1976. Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 97:169-184.

- FINCHAM, J.R.S., P.R. DAY e A. RADFORD, 1979. *Fungal Genetics*. Oxford, Blackwell Scientific Publications. 636p.
- GABRIELLI, A.C., 1978. Estudos citogenéticos em uma linhagem deteriorada (V₈) de *Aspergillus nidulans* e seus derivados. Piracicaba, ESALQ/USP, 101p. (Dissertação de Mestrado).
- GABRIELLI, A.C. e J.L. AZEVEDO, 1980. A strain of *Aspergillus nidulans* producing a high frequency of disomics. *Transactions of the British Mycological Society*, 75:15-20.
- GEALT, M.A. e D.E. AXELROD, 1974. Coordinate regulation of enzyme inducibility and developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Developmental Biology*, 41:224-232.
- GEALT, M.A., G. SHEIR-NEISS e N.R. MORRIS, 1976. The isolation of nuclei from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 94:204-210.
- GROSE, S. e A.J. CLUTTERBUCK, 1975. "Fluffy" colonies obtained from *Aspergillus* conidia after ageing and other treatments. *Aspergillus News Letter*, 13:17-18.
- HASTIE, A.C., 1970. Benlate induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, London, 226:771.
- HEAGY, F.C. e J.A. ROPER, 1952. Deoxyribonucleic acid content of haploids and diploid *Aspergillus* conidia. *Nature*, London, 170:713-714.
- HUEBSCHMAN, C., 1952. A method for varying the average number of nuclei in the conidia of *Neurospora crassa*. *Mycologia*, 44:599-604.

- IKEDA, Y., K. NAKAMURA, K. UCHIDA e G. ISHITANI, 1957. Two attempts upon improving an industrial strain of *Aspergillus oryzae* through somatic recombination and polyploidization. *Journal of General and Applied Microbiology*, 3:93-101.
- ISHITANI, G., Y. IKEDA e K. SAKAGUCHI, 1956a. Hereditary variation and genetic recombination in koji - molds (*Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*). VI. Genetic recombination in heterozygous diploids. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2:401-430.
- ISHITANI, G., K. UCHIDA e K. IKEDA, 1956b. The relation of DNA content to cell size in *Aspergillus*. *Experimental Cell Research*, 10:737-740.
- JINKS, J.L., 1954. Somatic selection in fungi. *Nature*, London, 174:209.
- JINKS, J.L. e M. GRINDLE, 1963. The genetical basis of heterokaryon incompatibility in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 18:407-413.
- JINKS, J.L., C.E. CATEN, G. SIMCHEN e J.H. CROFT, 1966. Heterokaryon incompatibility and variation in wild populations of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 21:227-239.
- KÄFER, E., 1958. An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 9:105-145.
- KÄFER, E., 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46:1581-1609.
- KÄFER, E., 1962. Translocations in stock strains of *Aspergillus nidulans*. *Genetica*, 33:59-68.
- KÄFER, E., 1965. Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 52:217-232.

- KÄFER, E. e A. UPSHALL, 1973. The phenotypes of the eight disomics and trisomics of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Heredity*, 64:35-38.
- KAPPAS, A. e S.G. GEORGOPOULOS, 1974. Interference of griseofulvin with the segregation of chromosomes at mitosis in diploid *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 119:334-335.
- KAPPAS, A., S.G. GEORGOPOULOS e A.C. HASTIE, 1973. Genetic instability of *Aspergillus nidulans* diploid induced by benzimidazole and thiophanate fungicides. *Mutation Research*, 21:190-191.
- KAPPAS, A., S.G. GEORGOPOULOS e A.C. HASTIE, 1974. On the genetic activity of benzimidazole and thiophanate fungicides on diploid *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 26:17-27.
- KATZ, D. e R.F. ROSENBERGER, 1971. Hyphal wall synthesis in *Aspergillus nidulans*: effect of protein synthesis inhibition and osmotic shock on chitin insertion and morphogenesis. *Journal of Bacteriology*, 108:184-190.
- KATZ, D., D. GOLDSTEIN e R.F. ROSENBERGER, 1972. Model for branch initiation in *Aspergillus nidulans* based on measurements of growth parameters. *Journal of Bacteriology*, 109:1097-1100.
- KESSEL, M. e R.F. ROSENBERGER, 1968. Regulation and timing of deoxyribonucleic acid synthesis in hyphae of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 95:2275-2281.
- KILBEY, B.J., 1963. Yellow conidial mutants of *Aspergillus nidulans* strain 16643. *Aspergillus News Letter*, 4:16-17.
- KNOX-DAVIES, P.S. e J.G. DICKSON, 1960. Cytology of *Helminthosporium turcicum* and its ascigerous stage *Trichometasphaeria turcica*. *American Journal of Botany*, 47:328-339.

- KUENKEL, W., 1979. Antimitotic activity of methylbenzimidazol-2-ylcarbamate:2. Electron microscopic investigations on duplication of the nucleus - associated organelle in *Aspergillus nidulans*. *Protoplasma*, 101:317-330.
- LEAICH, L.L. e K.E. PAPA, 1975. Identification of diploids of *Aspergillus flavus* by the nuclear condition of conidia. *Mycologia*, 67:674-678.
- LEE, Y.T. e B.H. NGA, 1973. Meiotic segregation behavior of translocation haploids in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* (supplement), 74:153-154.
- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidisation by treatment of *Aspergillus niger* diploids with p-fluorphenilalanine. *Nature*, London, 190:744.
- LIEBER, M.M., 1976. The effects of temperature on genetic instability in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 34:93-122.
- MACKINTOSH, M.E. e R.H. PRITCHARD, 1963. The production and replica plating of micro-colonies of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 4:320-322.
- MAJERFELD, I.H. e J.A. ROPER, 1978a. The effect of coumarin on the frequency of deletions in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 159:203-206.
- MAJERFELD, I.H. e J.A. ROPER, 1978b. Dose effects of the uvs^+ gene product in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 49:19-26.
- MARTINELLI, S.D., 1972. Some characteristics of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 29:130.

- MARTINELLI, S.D., 1976. Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged culture. *Transactions of the British Mycological Society*, 67:121-128.
- MARTINELLI, S.D. e A.J. CLUTTERBUCK, 1971. A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 69:261-268.
- MARTINELLI, S.D. e B.W. BAINBRIDGE, 1974. Phenoloxidase of *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, 63:361-370.
- MATSUMURA, A.T.S., 1981. Aspectos da citologia e patogenicidade em uma população natural de *Trichometasphaeria turcica* Dutt. Porto Alegre, UFRGS, 80p. (Dissertação de Mestrado).
- McCULLOUGH, W. e C.F. ROBERTS, 1976. Isocitrato lyase constitutive mutants in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 36:291.
- McCULLY, K.S. and E. FORBES, 1965. The use of p-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research*, 6:352-359.
- MENEZES, E.M., 1974. Análise genética de variantes deteriorados e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP, 114p. (Dissertação de Mestrado).
- MERCER, B. e N.R. MORRIS, 1975. The effect of chloral hydrate upon mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 88:197-199.
- MESSIAS, C.L., 1977. Parassexualidade e produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus*, Link. Piracicaba, ESALQ/USP, 75p. (Dissertação de Mestrado).

- MISHRA, N.C., 1977. Genetics and biochemistry of morphogenesis in *Neurospora*. *Advances in Genetics*, 19:341-405.
- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregation induced by p-fluorophenylalanine. *Aspergillus News Letter*, 2:10.
- MORRIS, N.R., 1976. Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 26:237-254.
- MORRIS, N.R. e C.E. OAKLEY, 1979. Evidence that p-fluorophenylalanine has a direct effect on tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 114:449-454.
- MORRIS, N.R., R.A. FELDEN, M.A. GEALT, R.V. NARDI, G. SHEIR-NEISS e M.M. SANDERS, 1977. The *Aspergillus* nucleus: histones, chromatin and tubulin. In: Smith, J.E. e J.A. Pateman (ed.). *Genetics and Physiology of Aspergillus*. London, Academic Press, p.267-279.
- NELSON, R.E., C.P. SELITRENNIKOFF e R.W. SIEGEL, 1975. Mutants of *Neurospora* deficient in nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) glycohydrolase. *Journal of Bacteriology*, 122:695-709.
- NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1968. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 58:193-209.
- NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1969. A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 14:63-70.
- NIFFINEGGER-SOUZA, D.R. 1979. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 244p. (Dissertação de Mestrado).

- OAKLEY, B.R. e N.R. MORRIS, 1980. Nuclear movement is β -tubulin-dependent in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 19:255-262.
- OLIVE, L.S., 1953. The structure and behavior of fungus nuclei. *Botanical Review*, 19:439-555.
- OLIVER, P.T.D., 1972. Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 73:45-54.
- ORR, E. e R.F. ROSENBERGER, 1976. Initial characterization of *Aspergillus nidulans* mutants blocked in the nuclear replication cycle. *Journal of Bacteriology*, 126:895-902.
- PAES DE BARROS, J., 1977. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP, 81p. (Dissertação de Mestrado).
- PALMER, H.M. e J.A. ROPER, 1970. Induced deletions in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 11:20.
- PAPA, K.E., 1973. The parasexual cycle in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 65:1201-1205.
- PARAG, Y., 1977. Genetic analysis of mutations for low (*rec*) and very high (*pop*) mitotic recombination frequency in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 155:319-328.
- PARAG, Y. and J.A. ROPER, 1975. Genetic control of chromosome instability in *Aspergillus nidulans* as a mean for gene amplification in eukariotic microorganisms. *Molecular General Genetics*, 140:275-287.

- PASTUSHOK, M. e D.E. AXELROD, 1976. Effect of glucose, ammonium and media maintenance initiation by surface colonies of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 94:221-224.
- PEBERDY, J.F., 1979. Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. *Annual Review of Microbiology*, 33:21-39.
- PEREIRA, J.O., 1978. Ocorrência do ciclo parassexual em uma espécie do gênero *Aspergillus*. Piracicaba, ESALQ/USP, 108p. (Dissertação de Mestrado).
- PIMENTEL GOMES, F.P., 1966. *Curso de Estatística Experimental*. São Paulo, Gráfica Benetti Ltda. 430p.
- PITTENGER, T.H., 1965. The distribution of nuclei in conidia of cultures having different average numbers of nuclei. *Neurospora News Letter*, 7:4-5.
- PITTENGER, T.H., 1967. Distribution of nuclei in conidia. *Neurospora News Letter*, 11:10-12.
- PITTENGER, T.H. e K.C. ATWOOD, 1956. Stability of nuclear proportions during growth of *Neurospora* heterokaryons. *Genetics*, 41:227-241.
- PIZZIRANI, A.A., 1977. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 111p. (Dissertação de Mestrado).
- PIZZIRANI, A.A. e J.L. AZEVEDO, 1976. Análise genética de linhagem com conídios binucleados em *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Cultura*, 28(7):255.

- POLLARD, R., E. KÄFER e M.T. JOHNSTON, 1968. Influence of chromosomal aberrations on meiotic and mitotic nondisjunction in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 60:743-757.
- PONTECORVO, G., 1956. The parasexual cycle. *Annual Review of Microbiology*, 10:393-400.
- PONTECORVO, G. e E. KÄFER, 1958. Genetic analysis based on mitotic recombination. *Advances in Genetics*, 9:71-104.
- PONTECORVO, G., E. TARR-GLOOR e E. FORBES, 1954. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Genetics*, 52:226-237.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONS, K.D. McDONALD e A.W.J. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.
- PRITCHARD, R.H., 1955. The linear arrangement of a series of alleles of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 9:343-371.
- PROUT, T., C. HUEBSCHMAN, H. LEVENE e F.J. RYAN, 1953. The proportions of nuclear types in *Neurospora* heterokaryons as determined by plating conidia. *Genetics*, 38:518-529.
- ROBINOW, C.F. e C.E. CATEN, 1969. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science*, 5:403-431.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8:14-15.
- ROPER, J.A., 1958. Nucleo-cytoplasmatic interactions in *Aspergillus nidulans*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 23:141-154.

- ROPER, J.A., 1966. The parasexual cycle. In: Ainsworth, G.C. e A.S. Sussman (ed.). *The Fungi* vol. 2, London, Academic Press, p.589-617.
- ROPER, J.A., 1971. *Aspergillus*. In: Hollander, A. (ed.). *Chemical Mutagens*. New York, Plenum Press, p.343-363.
- ROPER, J.A. e B.H. NGA, 1969. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the production of hypodiploid and hypohaploid nuclei. *Genetical Research*, 14:127-136.
- ROPER, J.A. e R.H. PRITCHARD, 1955. The recovery of the complementary products of mitotic crossing over. *Nature*, London, 175:639.
- ROPER, J.A., H.M. PALMER e W.A. WATMOUGH, 1972. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the effects of caffeine. *Molecular General Genetics*, 118:125-133.
- ROSATO, Y.B. e J.L. AZEVEDO, 1978. Acriflavine and ethyl methanesulfonate-induced mutants of *Aspergillus nidulans* strains with chromosome duplication. *Revista Brasileira de Genética*, 1:247-262.
- ROSENBERGER, R.F. e M. KESSEL, 1967. Synchrony of nuclear replication in individual hyphae of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 94:1464-1469.
- ROSTIM, R.T., O. GARCIA JR. e I.R. BARACHO, 1978. Tamanho de conídios e núcleos em linhagens haplóides e diplóides de *Aspergillus niger*. *Ciência e Cultura*, 30:487-492.
- SAXENA, R.K. e U. SINHA, 1973. Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged liquid culture. *Journal of General and Applied Microbiology*, 19:141-146.

- SCHMIT, J.C. e S. BRODY, 1976. Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriological Reviews*, 40:1-41.
- SCOTT, W.A. e B. SOLOMON, 1975. Adenosine 3', 5' - cyclic monophosphate and morphology in *Neurospora crassa*: drug-induced alterations. *Journal of Bacteriology*, 122:454-463.
- SELITRENNIKOFF, C.P., R.E. NELSON e R.W. SIEGEL, 1974. Phase-specific genes for macroconidiation in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 78:679-690.
- SILVA, J.A. e J.L. AZEVEDO, 1978. Radiação gama e instabilidade em *Aspergillus niger*. *Revista de Microbiologia*, 9:156-158.
- TERENZI, H.F., M.M. FLAWIA, M.T. TELLEZ-INO e H.N. TORRES, 1976. Control of *Neurospora crassa* morphology by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Journal of Bacteriology*, 126:91-99.
- TRINCI, A.P.J., 1969. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *Journal of General Microbiology*, 57:11-24.
- TRINCI, A.P.J., 1974. A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *Journal of General Microbiology*, 81:225-236.
- TRINCI, A.P.J. e N.R. MORRIS, 1979. Morphology and growth of a temperature-sensitive mutant of *Aspergillus nidulans* which forms aseptate mycelia at nonpermissive temperatures. *Journal of General Microbiology*, 114:53-60.
- UPSHALL, A., 1966. Somatically unstable mutants of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London, 209:1113-1115.

- UPSHALL, A., 1971. Phenotypic specificity of aneuploid states in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 18:167-171.
- UPSHALL, A., 1974. Genetic factors affecting nondisjunction in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 33:445.
- UPSHALL, A. e E. KÄFER, 1974. Detection and identification of translocations by increased specific nondisjunction in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 76:19-31.
- VAN ARKEL, G.A., 1963. Sodium arsenate as an inducer of somatic reduction. *Aspergillus News Letter*, 4:9.
- VAN DE VATE, C. e G.J.O. JANSEN, 1978. Meiotic recombination in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 31:29-52.
- WARR, J.R. e J.A. ROPER, 1964. Resistance mutants of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 19:167.
- WEIJER, J. e S.H. WEISBERG, 1966. Karyokinesis of the somatic nucleus of *Aspergillus nidulans*. I. The juvenile chromosome cycle (Feulgen staining). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 8:361-374.
- WEISBERG, S.H. e J. WEIJER, 1968. Karyokinesis of the somatic nucleus of *Aspergillus nidulans*. II- Nuclear events during hyphal differentiation. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 10:699-722.
- YUILL, E., 1939. Two new *Aspergillus* mutants. *Journal of Botany*, 77:174-175.

YUILL, E., 1950. The numbers of nuclei in conidia of *Aspergilli*.
Transactions of the British Mycological Society, 33:324-331.

ZONNEVELD, B.M.S., 1974. α -1,3 glucan synthesis correlated with α -1,3
glucanase synthesis, conidiation and fructification in morphogenetic
mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*,
81:445-451.

ZONNEVELD, B.J.M., 1977. Biochemistry and ultrastructure of sexual
development in *Aspergillus*. In: Smith, J.E. e J.A. Pateman (ed.).
Genetics and Physiology of Aspergillus. London, Academic Press,
p.59-80.