ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM UMA LINHAGEM DETERIORADA (V8) DE
ASPERGILLUS NIDULANS E SEUS DERIVADOS

ANTONIO CARLOS GABRIELLI

Orientador: PROF.DR.JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Genética e Melhoramentos de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo -Brasil
abril, 1978

BIOGRAFIA SUMÁRIA DO AUTOR

Antonio Carlos Gabrielli, filho de Terêncio Gabrielli e de Anésia Maria Elias Gabrielli, nasceu aos 04 de abril de 1941 em Descalvado (SP).

Licenciado em 1963 em História Natural pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, em Rio Claro (SP).

Contratado em agosto de 1964 pela Universidade de Brasília, junto ao Centro Integrado de Ensino Médio, até janeiro de 1971. Desenvolveu atividades didáticas e de orientação da equipe de professores de Biologia. Colaborou com o Instituto de Genética, ministrando cursos básicos de Genética, e com a Faculdade de Educação, nos cursos de Biologia Educacional. A partir de 1970, foi responsável pelo curso de Didática Especial de Biologia e Prática de Ensino, da referida Faculdade.

Contratado em março de 1972 pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) como Instrutor junto à cadeira de Anatomia do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais, desenvolvendo atividades didáticas e de pesquisa.

Aceito no segundo semestre de 1974 como aluno regular no curso de Pós-Graduação de Genética e Melhoramentos de Plantas, na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, em Piracicaba (SP).

Aos meus pais,

Terêncio e

Anésia Maria

minha gratidão pelo apoio
e estímulos constantes.

Para

Maria Helena

Rodrigo e

Ronaldo

AGRADECIMENTOS

Apresentamos nossos sinceros agradecimentos a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, ressaltando a dedicação e atenção dos que, a seguir, nominalmente estão citados:

Ao Professor Doutor João Lúcio de Azevedo, amigo e orientador, pela clareza e entusiasmo com que me conduziu;

À minha esposa, Sra. Maria Helena Pedroso Gabrielli, pela compreensão, apôio e colaboração prestada.

Ao Professor Roberto Fernando Martins, do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela colaboração amiga e constante na elaboração desta dissertação;

Ao Professor Doutor Ivanhoé Rodrigues Baracho, do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelas facilidades concedidas junto ao laboratório de microorganismos daquele Departamento e pelas sugestões apresentadas;

Ao Professor Doutor George John Shepherd, do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela colaboração prestada;

Ao Professor Doutor Marconi Freire Montezuma, da Faculdade de Educação da UNICAMP, pelas sugestões e auxílio na correção do manuscrito;

Ao Professor Francisco Alcilone Aragão, Assistente Técnico de Direção da Faculdade de Educação da UNICAMP, pelas facilidades oferecidas para a confecção desta dissertação.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais da UNICAMP, Sra. Maria Odete Fontana Pedrossanti, Srta. Esmeralda Zanchetta e Senhor José Luiz Moreira, pela constante colaboração e serviços prestados.

Aos colegas, Professores Reinaldo Monteiro e Jorge Yoshio Tamashiro, pela colaboração prestada;

E, finalmente, aos colegas do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais do Instituto de Biologia da UNICAMP e aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pela amizade e apoio oferecidos.

Í N D I C E

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Aspectos genéticos	04
2.1.1. Os ciclos vegetativos e sexual de <i>Aspergillus nidulans</i>	04
2.1.2. O ciclo parassexual em <i>A. nidulans</i>	05
2.1.2. Aberrações estruturais e numéricas e o fenômeno da instabilidade em fungos	06
2.2. Aspectos citológicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Material	24
3.1.1. Linhagens utilizadas	24
3.1.2. Meios de cultura	25
3.1.3. Solução de Tween 80	29
3.1.4. Solução salina	29
3.1.5. Solução de vitaminas	29
3.1.6. Solução de desoxicolato de sódio	30
3.1.7. Tampão fosfato, pH 7,0	30
3.1.8. Formalina neutra	31
3.1.9. Albumina 5%	31
3.1.10. Fixadores	31
3.1.11. Corantes	32
3.1.12. Placas de cultura e de análise	33
3.1.13. Equipamento para microscopia e fotografias	33

3.2. Métodos	34
3.2.1. Esterilização e incubação	34
3.2.2. Frequência de dissômicos	34
3.2.3. Estabilidade dos dissômicos	35
3.2.4. Análise genética	36
3.2.5. Análise citológica	38
3.2.5.1. Técnicas de coloração	38
3.2.5.2. Medidas dos diâmetros celulares e nucleares dos conídios	43
4. RESULTADOS	44
4.1. Frequência de dissômicos	44
4.2. Possíveis modificadores da frequência de dissô micos	45
4.2.1. Efeito da temperatura	45
4.2.1.1. Efeito da temperatura na não-dis junção mitótica na germinação do conídio	45
4.2.1.2. Efeito da temperatura na não-dis junção mitótica na formação do conídio	45
4.2.2. Efeito do pH na não-disjunção mitótica me dida através da frequência de dissômicos.	46
4.2.3. Efeito da idade do conídio na não- disjun ção mitótica	47

4.3. Estabilidade dos dissômicos	47
4.4. Análise Genética	48
4.5. Diâmetros dos conídios e de seus núcleos	48
4.6. Coloração de hifas ascógenas	49
5. DISCUSSÃO	67
5.1. Obtenção de dissômicos com desoxicolato de <u>sô</u> dio	67
5.2. Frequência e estabilidade dos dissômicos	68
5.3. Possíveis fatores modificadores da frequência de dissômicos	71
5.3.1. Temperatura	71
5.3.2. pH do meio de cultura	73
5.3.3. Idade do conídio	74
5.4. Diâmetros dos conídios e de seus núcleos	75
5.4.1. Material e métodos utilizados	75
5.4.2. Comparação dos diâmetros celulares e nucleares das linhagens estudadas	78
5.4.2.1. O volume modal	80
5.4.3. Coloração de hifas ascógenas	83
5.5. Análise Genética	85
6. RESUMO E CONCLUSÕES	87
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		PÁGINA
01	- Frequências de dissômicos em meio completo(MC)e em meio completo com desoxicolato de sódio (MC+DS)	50
02	- Obtenção espontânea de dissômicos em meio com pleto	51
03	- Efeito da temperatura na não-disjunção mitótica na germinação do conídio	53
04	- Efeito da temperatura na não-disjunção mitótica na formação do conídio	54
05	- Efeito do pH na não-disjunção mitótica	55
06	- Efeito da idade do conídio na não-disjunção mi tótica	56
07	- Frequência de perda do cromossomo adicional....	57
08	- Análise meiótica do cruzamento MSE X dissômico.	58
09	- Valores médios (em micrômetros) obtidos de 100 medições dos diâmetros dos conídios e de seus núcleos e sua comparação pelo teste de Tukey (*)	60
10	- Análise de variância das médias dos diâmetros dos núcleos dos conídios	61

PÁGINA

11	- Análise de variância das médias dos diâmetros dos conídios das 3 linhagens utilizadas	62
12	- Volumes modais (em micrômetros) dos núcleos e das células das diferentes linhagens	63
13	- Variabilidade do diâmetro celular nas diversas linhagens	64
14	- Relação entre os volumes modais das três <u>li</u> nhagens	81
15	- Diâmetros dos conídios e de seus núcleos <u>obti</u> dos através de fotografias (PAES DE BARROS , 1977) através de câmara clara	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		PÁGINA
01	- Marcadores genéticos da linhagem V8.....	26
02	- Marcadores genéticos da linhagem MSE	27
03	- Linhagem dissômica (dl).....	52
04	- Conídios da linhagem V8, corados segundo a técnica HCl-Giemsa (aum. 100x10x1,25)	59
05	- Conídios da linhagem dissômica (dl), corados segundo a técnica HCl-Giemsa(aum.100x10x1,25)..	59
06	- Histogramas e polígonos de frequências representativos das frequências dos diâmetros dos núcleos das três linhagens	65
07	- Núcleos em hifas ascógenas, corados segundo a técnica HCl-Giemsa (aum. 100x10x1,25).....	66
08	- Cromossomos em hifas ascógenas, corados segundo a técnica HCl-Giemsa (aum.100x10x1,25)....	66

1. INTRODUÇÃO

Aspergillus nidulans (Eidam) Winter é um organismo que apresenta uma série de vantagens para os estudos genéticos, como assinalaram PONTECORVO et alii (1953). Em relação aos aspectos citológicos, este fungo filamentoso apresenta um número haplóide de 8 cromossomos ($n=8$), de difícil observação citológica (ELLIOT, 1960). As aberrações cromossômicas numéricas, em consequência, tornam-se difíceis de serem estudadas citologicamente. A dissomia ($n+1$ cromossomos) e a trissomia ($2n+1$ cromossomos) foram bem estudadas em suas manifestações morfológicas, sendo possível a identificação fenotípica dos aneuplóides. UPSHALL (1971) e KAUFER & UPSHALL (1973) mostraram que todos os aneuplóides produziam colônias de tamanho reduzido, apresentavam pequena conidiação e eram instáveis, e que o fenótipo exibido dependia do cromossomo adicional que transportavam. As

sim, os oito tipos dissômicos e os trissômicos puderam ser distinguidos com base na sua morfologia típica. Entretanto, os poucos estudos citológicos de aneuplóides de *A. nidulans* encontrados na literatura enfocaram apenas os tamanhos celulares e nucleares, talvez devido às dificuldades apontadas por ELLIOT (1960). Além disso, os aneuplóides obtidos por não-disjunção mitótica são bastante instáveis, perdendo com frequência o cromossomo adicional o que dificulta enormemente a análise citológica.

Estudos citológicos recentes fazem supor que o fenômeno da instabilidade está associado ao material genético adicional, pois linhagens instáveis, com duplicação cromossômica, apresentaram núcleos com diâmetros maiores que os da linhagem haplóide balanceada (PAES DE BARROS, 1977). As linhagens duplicadas, por outro lado, apresentam maior frequência de aneuplóides do que as linhagens haplóides balanceadas (DANTAS D'ARCE, 1972). Sabe-se, entretanto, que uma linhagem com duplicação cromossômica, a linhagem deteriorada V8 de *A. nidulans*, apresenta, em virtude de sua constituição genética, maior frequência de aneuplóides em relação às linhagens haplóides comumente utilizadas (AZEVEDO & ROPER, 1970). O uso desta linhagem dispensa técnicas especiais para o isolamento de aneuplóides, facilitando o estudo da frequência da não-disjunção mitótica e permitindo a obtenção de maior número de colônias aneuplóides que podem fornecer material para a análise citológica, para a obtenção de heterocários e para o estudo de sua instabilidade. Além disso, não se encontrou na literatura nenhuma referência sobre os efeitos de fatores ambientais na instabilidade de linha

gens normais ou com aberrações cromossômicas de *A.nidulans*. Estudos desta natureza podem ser bastante facilitados pela utilização de uma linhagem como a V8.

Em vista disso, o presente trabalho foi conduzido no sentido de estudar citogeneticamente a linhagem V8 de *A.nidulans* nos seguintes aspectos :

a - frequência de aneuplóides através de amostragem de conídios, semeados em meios completos com e sem desoxicolato de sódio;

b - influência da temperatura, do pH do meio de cultura e da idade do conídio;

c - instabilidade dos aneuplóides;

d - tamanhos nucleares e celulares dos aneuplóides, da linhagem V8 e da linhagem haplóide balanceada;

e - comportamento meiótico do cromossomo aneuplóide;

f - adequação de técnicas citológicas aos objetivos propostos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Considerados os aspectos diversos dos objetivos propostos, a revisão de literatura foi dividida em duas partes: a primeira enfoca os aspectos genéticos de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter, em especial dos fenômenos da instabilidade e das aberrações cromossômicas estruturais e numéricas; a segunda, os aspectos citológicos, englobando, inclusive, as técnicas utilizadas para o preparo e a coloração do material.

2.1. Aspectos genéticos

2.1.1. Os ciclos vegetativo e sexual de *Aspergillus nidulans*

O breve resumo aqui apresentado está baseado no trabalho clássico de PONTECORVO et alii (1953).

No ciclo vegetativo deste fungo, um conídio, em geral uninucleado, germina, produzindo hifas septadas com células multinucleadas. Algumas dessas células (podais) formam conidióforos. Estes terminam em vesículas globosas multinucleadas, de cuja superfície emergem corpos alongados, os esterígm^{as} primários, cada um produzindo dois ou mais esterígm^{as} secundários. O núcleo de cada esterígm^a secundário divide-se repetidamente. A cada divisão, um núcleo filho permanece na parte proximal do esterígm^a. A parte distal, com o outro núcleo-filho, so

fre uma constrição e diferencia-se em um conídio. A continuação do processo forma cadeias lineares de conídios, estando sempre os mais jovens na base destas cadeias. Os esterígmas secundários e primários são uninucleados e, como todos os conídios de uma cadeia derivam de um mesmo esterígma, apresentam o mesmo tipo de núcleo.

Um aspecto importante do ciclo vegetativo é a fusão de hifas, que pode ocorrer entre ramificações de uma mesma hifa, entre hifas diferentes de um mesmo micélio e entre hifas de dois micélios da mesma ou de diferentes linhagens. Regra geral, os heterocários são produzidos por fusão de hifas de linhagens diferentes.

O ciclo sexual ocorre em órgãos especializados, os corpos de frutificação, denominados cleistotécios, embora, na maioria dos trabalhos, se utilize a denominação de peritécios. São corpos esféricos, de coloração escura, contendo no seu interior cerca de 10^5 ascos, cada um com oito ascósporos. Surgem por um processo de cariogamia nas hifas ascógenas, formando o zigoto. Este sofre, imediatamente, divisão meiótica, produzindo quatro células haplóides, que, por sua vez, sofrem uma divisão mitótica resultando, então, oito ascósporos dentro de cada asco. Os ascósporos têm coloração avermelhada e são binucleados devido a uma nova divisão mitótica antes da maturação do esporo.

2.1.2. O ciclo parassexual em *A. nidulans*

O ciclo parassexual, assim denominado por PONTECORVO (1956), foi observado inicialmente por ROPER (1952) . Este ciclo envolve o aparecimento de diplóides a partir de linhagens normalmente haplóides, recombinação mitótica e haploidização.

Este ciclo inicia-se com a formação de heterocários. Nestas hifas ocorrem fusões raras, porém regulares, de núcleos haplóides, originando núcleos diplóides. Se o heterocário for produzido entre linhagens com deficiências nutricionais, porém complementares, o diplóide heterozigoto será prototrófico, podendo crescer em meio mínimo. Assim, os diplóide podem ser selecionados. Estes diplóides, quando isolados, mostram-se bastante estáveis, mas produzem tipos recombinantes através da recombinação mitótica.

2.1.3. Aberrações estruturais e numéricas e o fenômeno da instabilidade em fungos

* *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter apresenta o número haplóide de 8 cromossomos ($n=8$). Na diacinese e metáfase I são observados oito bivalentes (ELLIOT, 1960). Entretanto, as aberrações estruturais e numéricas são comuns neste fungo. PONTECORVO & KAFER (1958) em estudos sobre a recombinação mitótica em *A. nidulans* verificaram que alguns segregantes haplóides apresentavam crescimento deficiente e emitiam, com frequência, setores vigorosos. Reisolamentos a partir dos centros

destas colônicas repetiam o mesmo comportamento. A análise genética mostrou que tais segregantes eram aneuplóides, ou mais precisamente, dissômicos para o grupo de ligação IV, e que produziam setores haplóides por perda de qualquer dos cromossomos do par.

KAFER (1960) descreveu o fenômeno da recombinação mitótica em linhagens diplóides de *A. nidulans*, onde o estado haplóide é conseguido através de perdas sucessivas de cromossomos. Posteriormente, KAFER (1961) verificou que segregantes mitóticos podem ser produzidos por permuta mitótica e por não-disjunção mitótica. O estado aneuplóide, frequente neste fungo, pode ser produzido por este último processo.

POLLARD et alii (1968) estudaram a influência das aberrações cromossômicas na não-disjunção mitótica e meiótica em *A. nidulans*. A frequência de dissômicos, que se presumiu refletir a frequência da não-disjunção meiótica, foi estudada em cruzamentos de linhagens normais e de linhagens com aberrações cromossômicas. Verificaram que a frequência destes aneuplóides em cruzamentos de linhagens normais foi extremamente baixa, indicando ser muito rara a incidência da não-disjunção meiótica. Por outro lado, a frequência de aneuplóides aumentou em cruzamentos heterozigotos para aberrações cromossômicas. É possível a detecção de translocações neste fungo através da análise genética, baseada na segregação de marcadores em haplóides, produzidos por recombinação mitótica, a partir de heterozigotos diplóides (KAFER, 1965). Assim, aqueles autores sugeriu

ram que, como em organismos superiores (STURTEVANT, 1926; ANDERSON, 1929; DOBZHANSKY, 1930, 1933; DOBZHANSKY & STURTEVANT, 1931; BEADLE, 1932; GLASS, 1933, 1935), os cromossomos homólogos estruturalmente não idênticos aumentam a frequência de não-disjunção meiótica. Por outro lado, a frequência de dissômicos não foi influenciada pela presença de translocações. Os autores concluíram que o processo que origina aneuplóides meióticos não é o mesmo que origina os mitóticos.

Cruzamentos de *A. nidulans* contendo translocações heterozigotas aumentam a frequência de não-disjunção mitótica e meiótica, especificamente para os cromossomos envolvidos nas translocações. Em linhagens sem translocações a incidência normal da não-disjunção mitótica e meiótica, medida através da progênie dissômica obtida por amostragem de conídios, é aproximadamente 0,2% (UPSHALL, 1974).

DANTAS D'ARCE (1972), através do estudo de aberrações cromossômicas numéricas em *A. nidulans*, comparou as frequências de aneuplóides, obtidos a partir de linhagens normais e de linhagens com duplicação cromossômica. Concluiu que dissômicos obtidos de linhagens haplóides e por mitose ocorrem somente em linhagens com aberrações cromossômicas. Procurou também correlacionar os grupos de ligação e os cromossomos através de curvas de sobrevivência à luz ultra-violeta. Esta mostrou não ser o agente mais indicado no caso, em virtude de problemas com a coloração de conídios. PIZZIRANI (1977) mostrou que linhagens com aberrações cromossômicas produzem, por não

-disjunção mitótica, maior frequência de aneuplóides do que linhagens isentas de aberrações. Mostrou que os dissômicos possuem diâmetros de conídios e núcleos maiores do que os das linhagens haplóides originais e que o tamanho, por ordem decrêscente, dos cromossomos envolvidos nos dissômicos estudados é III, IV e VI.

Alguns agentes podem interferir na frequência de dissômicos. SHANFIELD & KAUFER (1971) estudaram os efeitos de agentes químicos na indução de recombinação mitótica em *A. nidulans*. Verificaram que o NG (N-metil-N-nitrosoguanidina) não apenas aumenta a frequência de colônias anormais através de mutações semi-dominantes, mas, aparentemente, também produz aneuplóides. Tendo verificado que a maioria dos aneuplóides era do tipo $2n+1$, sugeriram que o NG pode aumentar a frequência de não-disjunção mitótica. Verificaram também que o PFA (para - fluorofenilalanina) aumenta a frequência de aneuplóides, reforçando a hipótese de que este agente interfere na distribuição normal dos cromossomos na mitose. Neste particular, McCULLY & FORBES (1965) sugeriram a possibilidade de o PFA produzir haploidização através de perdas sucessivas de cromossomos . PIZZIRANI & AZEVEDO (1975) estimaram a frequência de aneuplóides mitóticos, obtidos de linhagens normais e de linhagens com duplicação cromossômica de *A. nidulans*, através de amostragem de conídios em meio completo mais desoxicolato de sódio. Mostraram que a frequência de aneuplóides é maior em linhagens com duplicação cromossômica, sugerindo que estas aberrações podem au

mentar a não-disjunção mitótica em haplóides. Mostraram também que o desoxicolato de sódio diminui o tamanho das colônias, facilitando, deste modo, a visualização dos aneuplóides.

Em relação à instabilidade, BAINBRIDGE & ROPER (1966), estudando o efeito de fatores genéticos na morfologia de *A. nidulans* verificaram a ocorrência de colônias com morfologia típica, denominada "crinkled", derivadas de cruzamentos de linhagens morfológicamente normais. As colônias "crinkled" apresentavam taxa de crescimento retardado e instabilidade vegetativa. Foi suposta pelos autores a presença de uma duplicação cromossômica desigual em um dos tipos parentais, que teria um segmento do grupo de ligação III translocado para o grupo de ligação VIII. As colônicas "crinkled" teriam este segmento em duplicata. A perda de parte do segmento cromossômico, carregado em duplicata seria a causa do aparecimento de setores. NGA & ROPER (1968) utilizaram uma linhagem "crinkled" de crescimento lento, que apresentava um segmento adicional do grupo de ligação I translocado para o grupo de ligação II. A presença de marcadores genéticos neste segmento translocado permitiu que aqueles autores chegassem a uma série de conclusões, baseadas na análise genética, sobre a localização, arranjo e extensão da duplicação. Permitiu também que estabelecessem uma correlação entre a duplicação e a morfologia "crinkled". As análises genéticas mostraram também ser correta a hipótese da deleção, que explica o aparecimento de setores através da perda de partes variáveis do segmento duplicado. AZEVEDO & ROPER

(1970) estudaram linhagens deste fungo com segmentos cromossômicos duplicados. Verificaram que estas linhagens são mitoticamente instáveis, originando variantes deteriorados, alguns dos quais com estabilidade aumentada. Um dos deteriorados obtidos (V8) apresentou boa estabilidade e produziu alta frequência de dissômicos para o grupo de ligação III.

Alguns aspectos do fenótipo exibido pelos aneuplóides foram descritos por PONTECORVO & KAUFER (1958). POLLARD et alii (1968) mostraram que colônias dissômicas ou trissômicas são fenotipicamente anormais, somaticamente instáveis e apresentam um fenótipo específico de acordo com o cromossomo adicional que transportam. UPSHALL (1971) mostrou que colônias hiper-haplóides e hiper-diplóides de *A. nidulans*, dissômicas ou trissômicas, são fenotipicamente anormais e somaticamente instáveis. Constatou também, que, para as linhagens de Birmingham, que têm bases genéticas diferentes das de Glasgow utilizadas por POLLARD et alii (1958), há uma correlação entre o fenótipo específico e o tipo de cromossomo adicional do aneuplóide. Uma descrição completa dos oito dissômicos e dos trissômicos foi apresentada por KAUFER & UPSHALL (1973), inclusive do tipo $n+VIII$, até então não descrito. Os oito tipos dissômicos podem ser reconhecidos pelo seu crescimento lento, conidiação pobre e alta instabilidade. O tamanho do centro da colônia aneuplóide, sua coloração e conidiação permitem distinguir claramente os oito tipos.

As aberrações cromossômicas numéricas foram des

critas também em outros fungos. COX & BEVAN (1962) constataram a ocorrência espontânea de aneuplóides em *Saccharomyces cerevisiae*, sugerindo a não-disjunção mitótica como uma das possíveis causas do fenômeno. Outra causa sugerida foi a ocorrência de meiose anômala. Os autores sugerem a possibilidade de a idade da colônia influenciar no aparecimento de aneuplóides. PARRY & COX (1970) verificaram a alta tolerância à aneuploidia neste mesmo fungo, bem como maior incidência de dissômicos para alguns dos cromossomos testados.

Algumas técnicas de análise com utilização de aneuplóides já foram descritas. UPSHALL & KAUFER (1974) desenvolveram um método meiótico para detecção visual de translocações, comparando a frequência de dissômicos de cruzamentos de translocações heterozigotas com a frequência obtida do cruzamento controle de linhagens normais. KAUFER (1973, 1975) descreveu novas técnicas para o mapeamento do centrômero e de marcas meióticas não ligadas em *A. nidulans*, utilizando dissômicos provenientes de linhagens heterozigotas com translocações recíprocas.

2.2. Aspectos citológicos

Vários são os gêneros de fungos que têm sido estudados em seus aspectos citológicos, vegetativos ou reprodutivos. A revisão de literatura aqui apresentada procurou focalizar não apenas a citologia mas também as técnicas utilizadas.

McCLINTOCK (1945) ressaltou a utilidade e im portância dos fungos para estudos genéticos e a necessidade de mais conhecimentos dos cromossomos e do comportamento do núcleo. No seu trabalho, descreveu o comportamento dos cromossomos de *Neurospora crassa*, desde a fertilização até a primeira metáfase meiótica e nas duas mitoses que ocorrem no asco. Vários processos para coloração de cromossomos foram experimentados, tendo a orceína acética apresentado os melhores resultados. Segundo aquela autora, o sucesso do processo de coloração depende em grande parte, do material utilizado. OLIVE (1953) desenvolveu estudos bastante amplos sobre a morfologia e ciclo dos cromossomos daquele fungo. Concluiu que a estrutura do núcleo e as divisões mitóticas que ocorrem na fase vegetativa têm grande semelhança com as dos organismos superiores. Relatou bons resultados na utilização da orceína acética, ressaltando que a hidrólise prévia tornou possível a coloração do fuso. Quando necessário, foi utilizado o carmin acético para a coloração dos centríolos. SINGLETON (1953) com as mesmas técnicas utilizadas por OLIVE (1953) fez uma descrição completa da morfologia dos cromossomos daquele fungo e do ciclo dos mesmos no desenvolvimento dos ascos. BARRY (1969), utilizando o método da orceína acética-lática proposto por BARRY (1966), descreveu o diplôteno difuso naquele fungo, propondo que este estágio difuso não representa, necessariamente, um estágio de atividade genica intensa, no sentido de dirigir a atividade metabólica do asco.

OLIVE (1950) desenvolveu amplos estudos citol^ógicos sobre o desenvolvimento do asco em *Patella melanona*. Verificou que ele se origina da célula intermediária binucleada do bâculo ("crozier") e que a fusão nuclear ocorre bem cedo no seu desenvolvimento. Observou que os 4 cromossomos ($n=4$) têm tamanhos diferentes e que o mais longo parece estar ligado ao nucléolo durante a prófase mei^ótica. Ressaltou, ainda os resultados da técnica empregada com o uso do carmin propiônico .

WILSON (1952), estudando a origem das hifas ascógenas em *Pyronema confluens*, verificou que elas se originam do oogônio, inicialmente como pequenas papilas anucleadas. Estas aumentam de tamanho, tornam-se mais globosas e os núcleos do oogônio começam a passar para elas, um por vez, raramente dois. Posteriormente, as hifas crescem e se ramificam. Há, frequentemente, dois núcleos na extremidade de uma hifa jovem que se tornam mais espaçados, à medida que as hifas se alongam. Os núcleos sofrem mitoses simultâneas, mas as divisões não são conjugadas. Formam-se as paredes, de maneira que, nas hifas ascógenas septadas, há uma célula apical uninucleada, uma intermediária binucleada e uma célula basal, bulbosa, contendo um número variável de núcleos. Bâculos laterais são formados a partir das células binucleadas. Após mitoses simultâneas dos dois núcleos, forma-se uma célula terminal uninucleada, uma intermediária binucleada e uma célula podal uninucleada. A célula binucleada do bâculo pode proliferar dando outro bâculo, ou formar um asco após a fusão de seus dois núcleos. Nova técnica de

coloração, utilizando a reação de Feulgen seguida de esmagamento e montagem em carmim propiônico, para o estudo de cromossomos em apotécios daquela espécie, foi descrita por McINTOSH (1954), tendo sido obtida uma diferenciação excepcionalmente nítida dos cromossomos.

Em *Pyronema domesticum* (HUNG & WELLS, 1971) o desenvolvimento dos bâculos é similar ao descrito para outros ascomicetos.

WILSON (1956) descreveu o desenvolvimento do ascogônio e peritécio de *Endoconidiophora fagacearum*. Utilizou várias técnicas de coloração (hematoxilina férrica de Heidenhein, corante tríplice de Fleming, hematoxilina férrica, safranina), todas elas apresentando resultados satisfatórios.

LU (1967) utilizou uma nova técnica de coloração pela hematoxilina, para estudar o comportamento do fuso e do centríolo, durante a meiose, em *Gelasinospora calospora*. Descreveu o diplôteno difuso, chamando a atenção para a semelhança entre este e os primeiros estágios da meiose, pois os cromossomos se apresentam alongados e se tornam difusos. O autor sugeriu que o estágio difuso pode ser análogo ao dos cromossomos plumulados de organismos superiores e pode ser a característica da atividade gênica durante este estágio.

FURTADO (1968) utilizou a técnica HCl-Giemsa para estudos citológicos em basídios de *Exidia nucleata*, tendo obtido ótimos resultados no estudo da meiose. Ressaltou que o

método utilizado não coloriu a membrana nuclear, embora esta tenha sido demonstrada pela microscopia eletrônica. Utilizando a mesma técnica, modificada para compensar o manuseio de ascos intactos dentro dos peritécios, o mesmo autor (1970) estudou o desenvolvimento do asco de *Sordaria brevicollis*. Observou que o comportamento dos cromossomos, inclusive o pareamento de homólogos, segue o padrão básico de outros pirenomicetos.

BECKETT & WILSON (1968) estudaram o desenvolvimento do asco de *Podospora anserina* desde o báculo até a formação dos esporos. Obtiveram bons resultados com a utilização da técnica de Feulgen-carmim propiônico, proposta por McINTOSH (1954).

MAINWARING (1971) estudou a citologia de *Podospora arizonensis* desde a formação dos bâculos até a primeira divisão mitótica no asco. Utilizou a técnica do carmim propiônico, precedida pela fixação em Carnoy ou fixador de Newcomber, tendo sido ambos os fixadores igualmente eficientes.

LU & RAJU (1970), utilizando a técnica da hematoxilina, obtiveram ótimos resultados no estudo da prófase meiótica de algumas espécies de gênero *Copprinus* (*C. lagopus*, *C. micaceus*, *C. comatus* e *C. atramentarius*). Neste mesmo gênero, LU (1974) desenvolveu estudos sobre o papel da temperatura e da luz no controle do início da meiose em *C. lagopus*. O desenvolvimento da meiose foi acompanhado citologicamente, utilizando-se a técnica do esmagamento em hematoxilina férrica-propiônica.

DUNCAN & GALBRAITH (1973) desenvolveram nova técnica para estudar os eventos nucleares em corpos de frutificação de basidiomicetos, fixando o material com solução de bicloreto de mercúrio em ácido acético glacial, hidrolizando com ácido fosfórico e corando com Giemsa.

ELLIOT (1960) descreveu a origem dos ascos de *Aspergillus nidulans*, mostrando que estes se originam em báculos. Os dois núcleos de uma célula terminal de uma hifa ascógena dividem-se simultaneamente, formando uma célula terminal uninucleada, uma célula intermediária binucleada e uma célula basal ou podal uninucleada. A célula intermediária alarga-se e forma o asco; seus dois núcleos se fundem originando o zigoto diplóide. Este imediatamente sofre meiose, produzindo quatro células haplóides. Observou, na diacinese e metáfase I, oito bivalentes : três grandes (cromossomos 1, 2 e 3, tendo satélite o cromossomo 2), dois de tamanho médio (cromossomos 4 e 5), dois pequenos (cromossomos 6 e 7) e um muito pequeno (cromosomo 8). Mostrou também que as linhagens diplóides são bem diferentes das haplóides. Naquelas a meiose ocorre normalmente até a metáfase I, mas as demais fases e também ascos com ascósporos são dificilmente vistos. A anáfase I frequentemente não ocorre e os cromossomos se apresentam aglomerados. As quatro células haplóides dentro de cada asco sofrem uma divisão mitótica formando oito ascósporos por asco. Os ascósporos têm coloração avermelhada e são binucleados devido a uma nova visão mitótica antes da maturação do esporo. Utilizou a técnica da orceína acé

tica, precedida de hidrólise em HCl, para a coloração do conteúdo dos cleistotécios, enfatizando ser esta a única técnica satisfatória.

BAKERSPIGEL (1959), realizando estudos sobre núcleos vegetativos interfásicos e em divisão, em *Neurospora crassa*, utilizando as técnicas HCl-Giemsa, Feulgen, Azur A-SO₂ e hematoxilina fêrrica, verificou que as duas primeiras coravam bem os núcleos dos conídios que não estavam em germinação. Não conseguiu observar a membrana nuclear e afirmou que, naquele fungo, a divisão mitótica diferia da mitose clássica.

SOMERS et alii (1960) estudando a mitose em *Neurospora crassa*, concluíram que esta é similar à mitose clássica. Em suas preparações utilizaram as técnicas daorceína acética e de Feulgen. Verificaram que conídios maduros apresentam um número variável de um a oito núcleos, que aparecem como corpos extremamente condensados com cerca de 1 micrômetro de diâmetro. Núcleos com a mesma morfologia puderam ser observados em hifas vegetativas. Núcleos apresentando fenômenos degenerativos puderam ser observados em hifas com várias semanas de idade.

LU (1962) descreveu um novo fixador e nova técnica, utilizando carmim propiônico para a coloração de núcleos de fungos. O autor realçou o fato de que a técnica HCl-Giemsa apresenta bons resultados para a coloração de núcleos intactos, mas que não diferencia detalhes dos cromossomos entre a prófase e a anáfase. Afirmou que o método proposto cora levemente o citoplasma; cora bem o nucléolo e o centríolo; e revela os de

talhes, em todos os estágios, da divisão nuclear.

Concluiu que os resultados sugeriram distorção muito pequena das figuras citológicas. Em suas preparações utilizou material proveniente de culturas de *Neurospora crassa* e de *Gelasinospora calospora*.

WARD & CIURYSEK (1962), utilizando a técnica HCl-Giemsa fizeram estudos sobre a mitose somática em *Neurospora crassa*. Observaram que, nas hifas mais velhas, os núcleos aparecem como corpos esféricos intensamente corados, intimamente associados aos centríolos. Devido ao crescimento periférico da colônia, a proporção núcleos em repouso/núcleos em divisão tende a aumentar com a idade da colônia. Este fato, segundo aqueles autores, deve ter contribuído para dificultar algumas das tentativas feitas anteriormente para demonstrar a divisão nuclear em hifas vegetativas. Assim, utilizaram sempre culturas jovens em seus experimentos, pois, nestas, as hifas apresentam núcleos interdivisionais geralmente grandes, que se coram menos intensamente e parecem apresentar uma estrutura granular ou fibrosa. Afirmam que a sequência de eventos na divisão dos núcleos somáticos daquele fungo se desenvolve de acordo com os padrões da mitose clássica. Em relação à técnica utilizada, os autores afirmam que a temperatura e duração da hidrólise, o pH do tampão e o tempo de coloração tiveram grande influência na qualidade das preparações.

WEIJER et alii (1965) utilizaram as técnicas de

Feulgen e do cristal violeta para a coloração do núcleo e cromossomos de *Neurospora crassa*. Os autores dividiram a cariocinese somática em três ciclos independentes : juvenil, maturação I e maturação II. Realçaram que, embora um fuso típico esteja ausente nos três ciclos, as fibras se originam da mesma maneira que na mitose clássica.

NAMBOODIRI & LOWRY (1967) utilizaram um mutante de *Neurospora crassa* que produz bandas de crescimento definido e que permite, assim, melhores estudos sobre a divisão nuclear vegetativa.

Concluíram que naquele fungo existe, pelo menos , dois tipos de núcleos, o esférico e o alongado, que seguem caminhos diferentes na divisão celular, não sendo apenas configurações diferentes dentro do mesmo ciclo mitótico.

McGINNIS (1953) utilizou a técnica do esmagamento em orceína acética, com fixação prévia em Carnoy, para o estudo de cromossomos mitóticos em *Puccinia graminis*, Todos os seis cromossomos observados apresentavam tamanhos relativamente uniformes na metáfase, embora pequenas variações tivessem sido notadas em células diferentes. Como o número básico de cromossomos da espécie é três ($n=3$), o autor discute a natureza poliploide da linhagem em estudo.

KNOX-DAVIES & DICKSON (1960), em estudos citológicos de *Helminthosporium turcicum*, após testarem vários corantes, optaram pelo método de Giemsa, precedido por fixação em

Carnoy e hidrólise em HCl 1N. Naquele trabalho, os autores concluíram que o núcleo vegetativo interfásico típico apresenta filamentos de cromatina, matriz e membrana nuclear. Mostraram também a ocorrência de núcleos aneuplóides nos ascos, como resultado da não disjunção na anáfase.

AIST & WILSON (1965), em estudos sobre a divisão nuclear em hifas vegetativas de *Ceratocystis fagacearum*, utilizaram as técnicas de Feulgen, do HCl-Giemsa e da hematoxilina com alúmen de ferro. Concluíram que Giemsa cora melhor o material, especialmente os cromossomos, do que a fucsina básica ou a hematoxilina.

Verificaram que a divisão nuclear é diferente do processo mitótico clássico por ocorrer perpendicularmente ao eixo longitudinal da hifa e pelo fato de o movimento na anáfase não ser sincronizado. Posteriormente, verificaram que naquele fungo as fibras do fuso ocorrem apenas entre cromátides irmãs em separação e que esta é causada pela elongação das mesmas. (AIST & WILSON, 1967). Ainda mais recentemente observaram que não há rompimento da membrana nuclear de *C. fagacearum* e de *Fusarium oxysporum* durante o processo mitótico (AIST & WILSON, 1969).

BEHMER et alii (1968) em estudos sobre núcleos de *Torulopsis utilis*, utilizaram métodos de coloração de Giemsa, do verde de metila-pironina, o de Ford com cristal violeta-pironina e o da fucsina básica. Segundo os autores, os resultados

dos melhores e mais constantes foram obtidos com as modificações introduzidas no método de Giemsa, embora, com a variante de Ford, bons resultados também foram obtidos.

Em relação ao gênero *Aspergillus*, YUILL (1950) , estudando núcleos de várias espécies, verificou uma correlação entre o tamanho do conídio e o número de núcleos. Os conídios uninucleados raramente excedem 4 micrômetros em diâmetro, enquanto os multinucleados apresentam diâmetro geralmente superior a 5 micrômetros. Além disso, mostrou que, em *A. carbonarius* os núcleos de um conídio derivam, normalmente, de mais de um núcleo do esterígio.

ISHITANI et alii (1956) mostraram que, em conídios de *A. nidulans*, há manutenção da proporção DNA/citoplasma, tanto nos haplóides como nos diplóides, e que esta proporção pode ser mantida por dois processos distintos. Primeiro, por redução do número de núcleos nos conídios diplóides das linhagens com mais de um núcleo por conídio. Segundo, por aumento da quantidade de citoplasma nos conídios das linhagens diplóides que os apresentam uninucleados.

Em relação aos núcleos mitóticos em hifas em crescimento, em *A. nidulans*, ROBINOW & CATEN (1969), utilizando diversas técnicas de coloração, esclareceram vários aspectos do seu comportamento, mostrando até a presença de fibras entre os dois núcleos filhos. A microscopia eletrônica mostrou que a mitose se processa sem que haja rompimento da membrana nuclear e que

as fibras são constituídas por feixes de fibrilas. Para explicar as configurações vistas durante a divisão da cromatina, foi proposto por aqueles autores que os cromossomos se ligam às fibras do fuso em vários pontos ao longo de seu comprimento. Com a elongação das fibras as cromátides irmãs separam-se e passam, sem sincronismo, para as extremidades do fuso.

CLUTTERBUCK (1969) mostrou que, em *A. nidulans* os esporos diplóides são uninucleados e apresentam o dobro do volume de conídios haplóides. Verificou que o tamanho das hifas cenocíticas não é afetado pela ploidia, mas que as hifas haplóides apresentam cerca da metade do número de núcleos das hifas diplóides.

PAES DE BARROS (1977) mostrou, através de estudos citogenéticos em *A. nidulans*, que sua instabilidade está associada ao material genético adicional e que, ao se produzirem setores melhorados por uma linhagem duplicada, ocorrem perdas do material genético adicional. Concluiu que a técnica citológica que apresentou melhores resultados para coloração de núcleos dos conídios foi a de HCl-Giemsa.

FULLER (1976) fez uma ampla revisão da mitose em fungos e concluiu que o conhecimento detalhado deste processo só será alcançado através da associação entre a microscopia ótica e a eletrônica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Linhagens utilizadas

Este trabalho desenvolveu-se utilizando três linhagens de *Aspergillus nidulans*, a V8, a MSE e a dl, cujas características são :

- linhagem V8, contendo marcadores genéticos no grupo de ligação I, uma duplicação cromossômica deste mesmo grupo translocada para o grupo de ligação II, e o gene v8 no grupo de ligação IV (AZEVEDO & ROPER, 1970) (Figura 1).

- linhagem MSE (Master Strain E de McCULLY & FORBES, 1965) apresentando marcadores genéticos em todos os oito grupos de ligação (Figura 2).

- linhagem dl, dissômica para o grupo de ligação III.

As linhagens V8 e MSE foram obtidas da coleção do Setor de Genética de Microorganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em Piracicaba

ba. A linhagem dissômica dl, foi por nós obtida no Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

3.1.2. Meios de Cultura

Meio mínimo líquido (PONTECORVO et alii 1953).

NaNO_3	6,00 g
KCL	0,52 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,52 g
KH_2PO_4	1,52 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	traços
ZnSO_4	traços
Glicose	10,00 g
H_2O destilada	1 000,00 ml

pH ajustado para 6,5 antes da esterilização, com NaOH, à temperatura ambiente.

Meio mínimo sólido (PONTECORVO et alii 1953).

Para o preparo do meio sólido adicionou-se ágar em pó (Difco) ao meio mínimo líquido com pH 6,5, até obter a concentração final de 1,5%.

GRUPOS DE LIGAÇÃO

MARCADORES GENÉTICOS

Figura 1 - Marcadores genéticos da linhagem V8.

Observações:

1. Os centrômeros estão designados por O.
2. As distâncias não estão em escala no mapa.

GRUPOS DE LIGAÇÃO

MARCADORES GENÉTICOS

Figura 2 - Marcadores genéticos da linhagem MSE

Observações:

1. Os centrômeros estão designados por 0.
2. As distâncias não estão em escala no mapa.

Meio de Galactose

Preparou-se da mesma forma que o meio mínimo só lido, substituindo-se a glicose por igual quantidade de galacto se como fonte de carbono.

Meio completo líquido (PONTECORVO, et alii, 1953).

Acrescentaram-se ao meio mínimo líquido :

Peptona	2,00 g
Extrato de levedura	0,50 g
Caseína hidrolizada	1,50 g
Solução de vitaminas	1,00 ml
Ácido nucleico de leveduras	2,50 ml

pH ajustado para 5,0, 6,0, 6,5, 7,0 ou 8,0 com NaOH ou HCL antes da esterilização.

Meio completo sólido (PONTECORVO et alii, 1953).

Adicionou-se ágar em pó ao meio completo líquido até obter a concentração final de 1,5%.

Meio mínimo + 2% de meio completo

Ao meio mínimo líquido adicionaram-se 2% de meio

completo (V/V). Distribuiu-se em tubos com 2,5 ml por tubo , autoclavou-se e conservou-se em refrigerador.

3.1.3. Solução de Tween 80

Adicionou-se 0,1 ml de Tween 80 em 99,9 ml de solução salina 0,85%. Colocaram-se 2,5 ml da solução em tubos de ensaio, que foram autoclavados e conservados em refrigerador.

3.1.4. Solução salina

Foram dissolvidos 0,89 g de cloreto de sódio(NaCl) por litro de solução. 9,0 ml da solução foram depois colocados em tubos de ensaio, autoclavados e conservados em refrigerador.

3.1.5. Solução de vitaminas

Biotina	0,20 mg
Aneurina ou tiamina	10,00 mg
Ácido p-aminobenzóico	10,00 mg
Piridoxina	50,00 mg
Ácido nicotínico	100,00 mg
Riboflavina	100,00 mg
Água destilada	100,00 ml

Após esterilização, em vapor fluente por 3 dias consecutivos, conservou-se em frasco escuro, sob clorofórmio, no refrigerador a 4°C.

3.1.6. Solução de desoxicolato de sódio

Desoxicolato de sódio	1,60 g
Água destilada	10,00 ml

Autoclavou-se e conservou-se em refrigerador.

3.1.7. Tampão fosfato, pH 7,0 (FURTADO, 1968)

De acordo com o sal utilizado empregou-se uma das seguintes fórmulas :

Fórmula 1 :

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3,73 g
H_2O destilada	1 000,00 ml

Fórmula 2 :

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,80 g
H_2O destilada	1 000,00 ml

Após o preparo, quando não em uso, guardou-se em refrigerador.

3.1.8. Formalina neutra

Em um frasco de 500 ml colocou-se quantidade de carbonato de sódio suficiente para formar uma camada de aproximadamente 5 centímetros de altura. Completou-se a mistura com formalina. Agitou-se a mistura todos os dias, durante 10 dias .

3.1.9. Albumina a 5% (ROBINOW & CATEM, 1969)

Em uma proveta de 100 ml foram colocados 5 ml de clara de ovo. Completou-se o volume com água destilada, agitou-se, filtrou-se e conservou-se em refrigerador.

3.1.10. Fixadores

- Solução de Helly (ROBINOW & CATEM, 1969)

Solução A :

dicromato de potássio	3,00 g
cloreto mercúrico	5,00 g

Água destilada	100,00 ml
----------------	-----------

Solução B :

Formalina neutra

A 10ml da solução A adicionaram-se, imediatamente antes do uso, 0,6 ml da solução B.

- Carnoy

Ácido acético glacial	1 parte
-----------------------	---------

Alcool 95%	3 partes
------------	----------

3.1.11. Corantes

- Solução estoque de Giemsa (FURTADO, 1968)

Giemsa	3,8 g
--------	-------

Glicerol	250 ml
----------	--------

Metanol	250 ml
---------	--------

Misturou-se e conservou-se em frasco de vidro com boca esmerilhada.

- Orceína acética-lática (BARRY et alii, 1966)

Orceína	100,00 mg
---------	-----------

Componente líquido	5,00 ml
--------------------	---------

Refluir por 4 minutos após o início da fervura, em um bequer coberto com a tampa de uma placa de Petri sobre a qual se colocam alguns cubos de gelo.

* Componente líquido

Ácido acético glacial	47 ml
Solução de ácido lático (1 ml de ácido lático em 24 ml de H ₂ O)	5 ml
H ₂ O	28 ml
HCl 1N	5 ml

3.1.12. Placas de cultura e de análise

Para a cultura das linhagens e a análise genética das colônias segregantes, utilizaram-se placas de Petri, contendo, cada uma, aproximadamente 20 ml. de meio de cultura apropriado a cada caso.

3.1.13. Equipamento para microscopia e fotografias

Utilizou-se para os exames citológicos um fotomicroscópio Zeiss II, equipado com oculares Kpl 10X, objetivas

de contraste de fase e câmara clara. Para as fotografias em preto e branco, utilizou-se filme Kodak Panatomic-X, ASA 32, e para as fotografias coloridas o Kodakcolor II, ASA 80.

3.2. Métodos

3.2.1. Esterilização e incubação

As placas de Petri, após a lavagem, eram esterilizadas em estufa de secagem, a 150°C, por 2 horas.

Os meios de cultura e as soluções, bem como as placas de Petri utilizadas contendo material vivo, eram sempre esterilizados em autoclave por 15 minutos a 1 atmosfera e a 120°C.

3.2.2. Frequência de dissômicos

- Obtenção espontânea de dissômicos

Conídios da linhagem V8 eram suspensos em solução de Tween 80 e desagregados por agitação. O número de conídios da suspensão era estimado através de contagem em câmara de Neubauer. Eram preparadas suspensões de conídios da região do

bordo e da região central, de colônias incubadas a 28°C e a 37°C. Em seguida, eram feitas diluições em salina que permitissem a obtenção de 50 a 100 colônias por placa, através da semeadura de 0,1 ml. da suspensão. Os conídeos, provenientes de colônias desenvolvidas em meio completo com valores de pH 5,0 , 6,0, 6,5, 7,0 e 8,0, eram semeados em séries de placas de Petri com os mesmos valores de pH e incubadas a 28°C e 37°C. Após 72 horas de incubação, procedia-se a contagem do número de colônias normais e dissômicas. As colônias dissômicas eram repliçadas, com o uso de fio de platina, para placas contendo meio completo, em disposição tal que permitisse replicações posteriores através de um replicador de oito pontos.

- Obtenção espontânea de dissômicos com desoxicolato de sódio.

Foi utilizado o mesmo método descrito acima, adicionando-se a cada litro de meio completo 2,5 ml. de uma solução de desoxicolato de sódio, perfazendo uma concentração final de 0,08% (MACINTOSH & PRITCHARD, 1963).

3.2.3. Estabilidade dos Dissômicos

Conídeos provenientes de colônias dissômicas eram

suspensões em solução de Tween 80, desagregados por agitação e seu número estimado através de contagem em câmara de Neubauer. Após as diluições adequadas em salina, 0,1 ml. da suspensão era semeado em placas com meio completo. Após 72 horas de incubação procedia-se a contagem de número de colônias normais e de colônias dissômicas, estimando-se, assim, a frequência de perda do cromossomo aneuplóide.

3.2.4. Análise genética

- Obtenção de heterocários

A heterocariose em *A. nidulans* (PONTECORVO et alii, 1953) ocorre entre duas linhagens que requerem diferentes fatores de crescimento. Os heterocários balanceados eram obtidos através da seguinte técnica. Número aproximadamente igual de conídios das duas linhagens complementares eram colocados em tubos de ensaio, contendo 2,5 ml de meio mínimo líquido, suplementado com 2% de meio completo. Incubava-se em estufa a 37°C por um período de 48 a 72 horas, suficiente para que se formasse uma película de hifas na superfície do meio. Estas películas eram transferidas para placas contendo meio mínimo, cortadas em vários pedaços. Estes eram distribuídos de modo mais ou menos equidistantes pela superfície das placas. Setores heterocarióticos, com hifas contendo núcleos geneticamente diferentes, puderam ser observados após 6 a 7 dias de incubação.

- Análise meiótica

A análise meiótica, baseada no ciclo sexual do fungo, foi feita segundo o método descrito por PONTECORVO et alii (1953), através da análise de ascósporos provenientes de cleistotécios híbridos.

Os heterocários produzidos de acordo com a técnica descrita acima, eram mantidos em placas com meio mínimo, vedadas com fita celulósica, em estufas a 37°C por um período de 8 a 10 dias. Após esse período os maiores cleistotécios eram retirados (BARACHO et alii, 1970), rolados em meio mínimo para retirar as hifas aderentes e as células de Hülle, e esmagados contra as paredes de tubos de ensaio contendo 2,5 ml de solução de Tween 80. Com as mesmas pipetas utilizadas para o esmagamento dos cleistotécios lavavam-se as paredes dos tubos suspendendo, assim, os ascósporos na solução. Semeava-se 0,1 ml de cada susensão de ascósporos em placas de Petri contendo meio completo , conservando-se as soluções restantes em refrigerador a 4°C. As placas eram incubadas em estufa a 37°C por 72 horas, verificando-se, a seguir, quais cleistotécios eram híbridos. Os cleistotécios autofecundados, bem como os híbridos que não produziam colônias dissômicas eram descartados, utilizando-se apenas os cleistotécios híbridos que mantiveram o cromossomo aneuplóide durante a meiose.

Ascósporos dos cleistotécios híbridos selecionados eram semeados em placas de Petri contendo meio completo. Após 72

horas de incubação a 37°C contavam-se as colônias normais e as dissômicas. Todas as colônias eram, então, transferidas para as placas de análise contendo meio de galactose, fazendo-se as leituras após 48 e 72 horas de incubação.

3.2.5. Análise citológica

3.2.5.1. Técnicas de coloração

- Técnica HCl-Giemsa (PAES DE BARROS, 1977), com algumas modificações.

A - Albuminização da lamínula

Uma gota de albumina a 5% era colocada sobre a lamínula e espalhada, com o auxílio de outra lamínula colocada em ângulo de aproximadamente 45°, de modo a formar uma fina película. Deixava-se secar por alguns segundos.

B - Coleta de conídios

A lamínula albuminizada era colocada diretamente sobre a colônia do fungo, exercendo-se pressão suficiente para que os conídios aderissem à albumina.

C - Fixação

A lâminula contendo os confídios era colocada em um vidro de relógio, com a porção albuminizada para cima. Adicionava-se solução fixadora de Helly em quantidade suficiente para cobrir a lâminula. Fixava-se por 15 minutos.

D - Lavagem

O material fixado era lavado em água destilada a té a remoção do excesso de fixador.

E - Hidrólise

A hidrólise do material era feita em HCl 1N, a 60°C, por 15 minutos.

F - Lavagem

Após a hidrólise, lavava-se o material, em banhos de 5 minutos, duas vezes em água de torneira e uma vez em tam pão fosfato pH 7,0.

G - Coloração

No momento do uso, para cada ml de solução tam pão utilizado, acrescentava-se uma gota de solução estoque de Giemsa. O material hidrolisado permanecia nesta mistura durante

te 15 minutos.

H - Montagem

Após a coloração, a montagem era feita em tam
pão fosfato pH 7,0. Retirava-se o excesso de tampão, vedando, a
seguir, os bordos da lamínula com esmalte incolor.

- Técnica HCl - Giemsa para hifas ascógenas.

A - Fixação

Blocos de ágar, retirados das placas de cultura ,
contendo os peritécios eram colocados em fixador de Carnoy e
submetidos ao vácuo para a retirada de bolhas de ar e melhor pe
netração do líquido fixador.

B - Coleta de hifas ascógenas

Cleistotécios de idade apropriada eram. colocados
sobre uma lamínula, em uma gota de albumina a 5% e dissociados.
As paredes dos cleistotécios eram removidas e o material, jun
tamente com a albumina, era espalhado pela lamínula. Deixava-se
secar por alguns segundos.

C - Hidrólise

A lamínula contendo as hifas ascógenas era colocada em um bequer, contendo HCl 1N a 60°C, com a porção albuminizada para cima. Deixava-se hidrolisar por 5 minutos.

D - Lavagem

Interrompia-se a hidrólise submetendo o material a 2 banhos em água de torneira e um banho em tampão fosfato pH 7,0, durante 5 minutos cada um.

D - Coloração

A solução corante era preparada no momento do uso, adicionando-se uma gota de solução estoque de Giemsa para cada mililitro de solução tampão utilizado. O material permanecia nesta solução por 30 minutos.

F - Montagem

A lamínula contendo as hifas ascógenas era submetida a um rápido banho em tampão fosfato, para retirar o excesso de corante. A lamínula montada em uma gota de tampão fosfato era colocada entre folhas de papel de filtro e pressionada para retirar o excesso de líquido e obter melhor esmagamento do material. Imediatamente após, os bordos das lamínulas eram vedados com esmalte incolor.

- Técnicas da orceína acética para coloração
de hifas ascógenas

A - Fixação

Os cleistotécios foram fixados em solução de Car
noy por um período de 4 horas, à temperatura ambiente.

B - Coleta de hifas ascógenas

Os cleistotécios escolhidos eram colocados em uma
lamínula, sobre uma gota de albumina, e esmagados. As paredes
dos cleistotécios eram removidas e as hifas eram dissociadas
com o auxílio de estiletes. Espalhava-se o material, juntamente
com a albumina, pela lamínula, e deixava-se secar por alguns seg
undos.

C - Hidrólise

A lamínula, com a porção albuminizada para cima ,
era colocada em um bequer contendo HCl 1N, deixando-se hidroli
sar por 5 minutos, a 60°C.

D - Lavagem

Após a hidrólise, o material era lavado rapidam

mente em solução de Carnoy.

E - Coloração

Sobre o material eram colocadas algumas gotas de orceína acética recém-preparada, deixando corar por 30 minutos. A seguir, procedia-se ao esmagamento entre folhas de papel de filtro. Os bordos da lamínula eram vedados com esmalte incolor.

3.2.5.2. Medidas dos diâmetros celulares e nucleares dos conídios

O material citológico proveniente das linhagens MSE, V8 e dissômica era preparado de acordo com a técnica HCl-Giemsa para conídios, descrita no item 3.2.5.1. .

Os diâmetros dos conídios e de seus núcleos foram obtidos através do equipamento microscópio descrito no item 3.1.13. . Com o auxílio da câmara clara traçavam-se dois diâmetros perpendiculares entre si dos conídios e de seus núcleos, calculando-se, a seguir, os diâmetros médios respectivos. Antes da utilização a câmara clara era aferida com o auxílio de uma escala micrométrica. Com os dados obtidos foram calculados os diâmetros modais e os volumes modais (SPIEGEL, 1970) .

4. RESULTADOS

4.1. Frequência de dissômicos

Semeaduras da linhagem V8 foram feitas em placas como tendo meio completo e em placas com meio completo mais desoxicolato de sódio, tendo sido obtidas 2 833 colônias das quais 126 foram dissômicas. Do total de colônias, foram obtidas 1334 de semeaduras em meio completo, sendo que destas 55 foram dissômicas (4,122%) e das 1499 provenientes de semeaduras em meio completo com desoxicolato de sódio, 71 foram dissômicas(4,736%). A análise estatística indicou o valor de $\chi^2=0,627$, não significativo, esperando-se a mesma frequência de dissômicos nos dois meios de cultura (Tabela 1).

Posteriormente, abandonou-se o uso de desoxicolato no meio de cultura, e os dados obtidos da análise de 45 257 colônias, provenientes de 10 semeaduras consecutivas, estão apresentados na Tabela 2. Destas colônias, 1855 foram dissômicas, o que indicou uma frequência global de 4,165%.

Todos os aneuplóides isolados foram classificados como dissômicos para o grupo de ligação III, de acordo com sua morfologia (UPSHALL, 1971 ; KAUFER & UPSHALL, 1973) (Figura 3).

4.2. Possíveis modificadores da frequência de dissômicos

4.2.1. Efeito da temperatura

4.2.1.1. Efeito da temperatura na não- disjunção mitótica na germinação do conídio.

Conídios provenientes de colônias desenvolvidas a 37°C foram semeados em duas séries de placas de Petri contendo meio completo. Uma série foi incubada a 28°C, tendo produzido 21 754 colônias, das quais 20 885 foram haplóides e 869 dissômicas (3,994%). A outra série, incubada a 37°C, forneceu 23 503 colônias, das quais 22 487 foram haplóides e 1 016 dissômicas (4,322%). Os dados apresentados na Tabela 3, analisados estatisticamente, forneceram o valor de $\chi^2 = 3,04$, considerado não significativo, esperando-se a mesma frequência de dissômicos em ambas as temperaturas utilizadas.

4.2.1.2. Efeito da temperatura na não- disjunção mitótica na formação do conídio.

Foram analisadas 4.527 colônias provenientes de conídios da linhagem V8 formados a 28°C, das quais 4 352 foram haplóides e 175 dissômicas (3,865%). Das 8.446 colônias provenientes de conídios formados a 37°C, 301 (3,563%) foram dissômicas. A análise estatística indicou o valor de $\chi^2 = 0,75$, valor considerado não significativo para a mesma proporção de dissômicos esperada nas duas temperaturas. Os dados estão apresentados na Tabela 4.

4.2.2. Efeito do pH na não-disjunção mitótica medi da através da frequência de dissômicos.

A Tabela 5 mostra os resultados de sementeiras consecutivas de conídios da linhagem V8 em séries de placas de Petri contendo meio de cultura com diversos níveis de pH.

Foram analisadas 21 761 colônias. Em pH 5,0, foram obtidas 4 703 colônias haplóides e 183 dissômicas, num total de 4 886 colônias (3,745%). Em pH 6,0, foi obtido um total de 4 149 colônias, sendo 3 963 haplóides e 186 dissômicas (4,483%). Em pH 6,5, obtiveram-se 4 864 colônias, sendo 4 668 haplóides e 196 dissômicas (4,029%). Em pH 7,0, 3 390 colônias sendo 3 245 haplóides e 145 dissômicas (4,277%). Em pH 8,0 foram obtidas 4 382 colônias, das quais 4 223 foram haplóides

des e 159 dissômicas (3,628%). A análise estatística forneceu valor de $\chi^2 = 5,591$, não significativo, esperando-se a mesma proporção de dissômicos em todos os níveis de pH.

4.2.3. Efeito da idade do conídio na não-disjunção mitótica.

Nos experimentos realizados para analisar o efeito desempenhado pela idade do conídio na não-disjunção mitótica, medida através da frequência de aneuplóides, foram analisadas 45 257 colônias provenientes de sementeiras de esporos da região central de colônias V8, esporos estes com aproximadamente 8 dias de idade, e de esporos da região do bordo, os mais novos das colônias (Tabela 6).

Das 17 680 colônias provenientes de conídios da região do bordo, 17 088 foram haplóides e 592 foram dissômicas (3,348%). Os conídios da região central produziram 27 577 colônias, das quais 26 284 foram haplóides e 1 293 foram dissômicas (4,688%). O valor de $\chi^2 = 48,48$ foi considerado altamente significativo, para uma mesma proporção de dissômicos esperada das duas regiões.

4.3. Estabilidade dos dissômicos

Após 72 horas de incubação a 37°C, foram conta

das 31 colônias haplóides e 2 878 colônias dissômicas provenientes de conídios da região central de colônias dissômicas anteriormente isoladas. Esses resultados indicaram que 1,07% dos conídios perderam o cromossomo adicional (Tabela 7).

4.4. Análise Genética

A análise genética a que foram submetidos os dissômicos isolados procurou verificar a segregação da marca galactose, apresentada pela linhagem MSE e localizada no grupo de ligação III, uma vez que todos os dissômicos o são para este grupo de ligação. Os dados estão apresentados na Tabela 8 .

Das 121 colônias segregantes analisadas, 64 foram haplóides e 57 foram dissômicas, tendo a análise estatística apresentado o valor de $\chi^2 = 0,40$, não significativo para uma segregação esperada de 1:1. A segregação para a marca galactose foi de 90 gal⁺ para 31 gal⁻, também não significativa para uma proporção esperada de 3:1 ($\chi^2 = 0,02$). Em conjunto, foi obtida a seguinte segregação : 35 colônias haplóides gal⁺, 29 haplóides gal⁻, 55 dissômicas gal⁺ e 2 dissômicas gal⁻.

4.5. Diâmetros dos conídios e de seus núcleos.

As Figuras 4 e 5 ilustram os resultados citolô

gicos obtidos com as linhagens V8 e dissômica, respectivamente.

As médias aritméticas dos diâmetros dos núcleos e das células das três linhagens estudadas e os respectivos desvios padrões estão apresentados na Tabela 9. A partir destes dados foram calculados os diâmetros modais e os volumes modais (SPIEGEL, 1970), apresentados na Tabela 12.

Os diâmetros médios dos conídios e seus núcleos foram comparados através do teste F. Os resultados da análise, que se encontram nas Tabelas 10 e 11, indicam diferenças significativas ao nível de 1%, tanto para as células como para os núcleos. Assim, aplicou-se o teste de Tukey, cujos resultados estão expressos na Tabela 9. A diferença mínima significativa (d.m.s.) ao nível de 5% foi de 0,0565 em relação aos diâmetros nucleares e de 0,1019 em relação aos diâmetros celulares dos conídios.

A partir da distribuição das frequências dos diâmetros dos núcleos, apresentada na Tabela 13, foram construídos os histogramas e polígonos de frequência, representados na Figura 6.

4.6. Coloração de hifas ascógenas

Os resultados da coloração de núcleos e cromossomos em hifas ascógenas estão apresentados nas Figuras 7 e 8 , respectivamente.

Tabela 1 Frequências de dissômicos em meio completo (MC) e em meio completo com desoxicolato de sódio(MC+DS)

Meio de Cultura	Nº de Colônias		% de colônias Dissômicas
	Haplóides	Dissômicas	
MC	1279	55	4,122
MC + DS	1428	71	4,736
Totais	2707	126	4,447

Tabela 2 - Obtenção espontânea de dissômicos em meio completo

Semeadura	Nº de colônias		% de colônias	
	Haplóides	Dissômicas	Total	dissômicas
1	1279	55	1334	4,123
2	6272	218	6490	3,359
3	5358	234	5592	4,184
4	7932	397	8329	4,766
5	5756	290	6046	4,782
6	1717	76	1793	4,238
7	4115	168	4283	3,922
8	3778	194	3972	4,884
9	4921	177	5098	3,472
10	2244	76	2320	3,276
TOTAL	43372	1885	45257	4,165

Figura 3 - Linhagem dissômica (dl)

Tabela 3 - Efeito da temperatura na não-disjunção mitótica na germinação do conídio.

Semeadura	Nº de colônias a 28°C		Nº de colônias a 37°C	
	Haplóides	Dissômicas	Haplóides	Dissômicas
1	569	20	710	35
2	3730	120	2542	98
3	3115	109	2243	125
4	4315	213	3617	184
5	3011	153	2745	137
6	643	30	1074	46
7	1413	68	2702	100
8	1054	82	2724	112
9	1768	36	3153	141
10	1267	38	977	38
TOTAL	20885	869	22487	1016

Tabela 4 - Efeito da temperatura na não-disjunção mitótica na formação do conídio.

Origem dos conídios (°C)	Colônias	Semeaduras a 37°C				Total
		1	2	3	4	
28°C	HAPLÓIDES	643	1413	1894	403	4352
	DISSÔMICAS	30	68	68	9	175
37°C	HAPLÓIDES	1074	2702	2682	1687	8145
	DISSÔMICAS	46	100	34	121	301

Tabela 5 - Efeito do pH na não-disjunção mitótica

pH	Colônias	Semeadura					Total
		1	2	3	4	5	
5,0	Haplóides	310	1435	1247	946	765	4703
	Dissômicas	12	47	43	28	53	183
6,0	Haplóides	223	1245	1126	593	764	3963
	Dissômicas	8	41	53	28	56	186
6,5	Haplóides	262	1163	838	1040	1365	4668
	Dissômicas	11	49	51	26	59	196
7,0	Haplóides	306	1064	1223	637	15	3245
	Dissômicas	10	40	37	58	0	145
8,0	Haplóides	178	1356	924	899	866	4223
	Dissômicas	14	41	50	28	26	159

Tabela 6 - Efeito da idade do conídio na não-disjunção mitótica

Semeadura	Nº de colônias originadas de conídios do bordo		Nº de colônias originadas de conídios do centro	
	Haplóides	Dissômicas	Haplóides	Dissômicas
1	87	17	1192	38
2	2692	93	3580	125
3	2377	82	2981	152
4	3329	84	4603	313
5	2395	104	3361	186
6	431	9	1286	67
7	1724	61	2391	107
8	2503	104	1275	90
9	594	22	4327	155
10	956	16	1288	60
TOTAL	17088	592	26284	1293

Tabela 7 - Frequência de perda do cromossomo adicional.

Semeadura	nº de Colônias		% de colônias Haplóides
	Haplóides	Dissômicas	
1	20	1702	1,175
2	11	1176	0,935
TOTAL	31	2878	1,077

Tabela 8 - Análise meiótica do cruzamento MSE X Dissômico.

Segregantes	Nº de Colônias
Haplóides, gal ⁺	35
Haplóides, gal ⁻	29
Dissômicos, gal ⁺	55
Dissômicos, gal ⁻	2
TOTAL	121

Figura 4 - Conídios da linhagem V8, corados segundo a técnica HCl-Giemsa (aum. 100x10x1,25).

Figura 5 - Conídios da linhagem dissômica (dl), corados segundo a técnica HCl-Giemsa (aum. 100x10x1,25).

Tabela 9 - Valores médios (em micrômetros) obtidos de 100 medições dos diâmetros de conídios e de seus núcleos e sua comparação pelo teste de Tukey (*) .

Linhagens	Diâmetro médio	
	Célula	Núcleo
MSE	2,9480 a	0,9373 a
V8	3,5117 b	1,1823 b
d1	3,8748 c	1,3477 c

*- valores seguidos da mesma letra não diferem ao nível de 5%

Tabela 10 - Análise de variância das médias dos diâmetros dos núcleos dos confídios.

F.V.	G.L.	SQ	QM	S	F
Linhagens	2	8,5449	4,2724	2,0669	146,3150
Resíduo	297	8,6771	0,0292	0,1708	
TOTAL	299	17,2208			

Tabela 11 - Análise de variância das médias dos diâmetros dos
confídios das 3 linhagens utilizadas.

F.V.	G.L.	SQ	QM	S	F
Linhagens	2	46,7006	23,3503	4,8322	246,3111
Resíduo	297	28,1704	0,0948		
TOTAL	299	74,8710			

Tabela 12 - Volumes modais (em micrômetros) dos núcleos e das células das diferentes linhagens.

Linhagens	Diâmetro	
	Célula	Núcleo
MSE	12,4868	0,4089
V8	26,2625	0,8444
d1	26,4081	1,0801

Tabela 13 - Variabilidade do diâmetro nuclear nas diversas linhagens.

Amplitudes totais dos Diâmetros (μm)	Nº de colônias		
	MSE	V8	DISSÔMICA
0,541-0,690	1	--	--
0,691-0,840	16	1	--
0,841-0,990	60	10	--
0,991-1,140	23	29	8
1,141-1,290	--	38	33
1,291-1,440	--	15	30
1,441-1,590	--	5	19
1,591-1,740	--	2	10

Figura 6 - Histogramas e polígonos de frequências representativos das frequências dos diâmetros dos núcleos das três linhagens.

Figura 7 - Núcleos em hifas ascogenas, corados segundo a técnica HCl-Giemsa (aum. 100x10x1,25).

Figura 8 - Cromossomos em hifa ascogena, corados segundo a técnica HCl-Giemsa (aum. 100x10x1,25).

5. DISCUSSÃO

5.1. Obtenção de dissômicos com desoxicolato de sódio

Os resultados obtidos nos experimentos iniciais (Tabela 1), nos quais foram utilizados meios completos com e sem desoxicolato de sódio, mostraram não haver diferenças significativas nas frequências obtidas nos dois meios de cultura ,
($\chi^2 = 0,627$, n.s.).

PIZZIRANI & AZEVEDO (1975) e PIZZIRANI (1977), utilizando desoxicolato de sódio em proporção de 0,08% estimaram a frequência de aneuplóides em linhagens haplóides normais e duplicadas de *A. nidulans*. Segundo aqueles autores, o desoxicolato de sódio diminui o tamanho das colônias, facilitando deste modo a visualização das colônias aneuplóides.

O fato de a linhagem V8, por nós utilizada, apresentar crescimento lento, eliminou a dificuldade de visualização dos aneuplóides pelo crescimento vigoroso de colônias haplóides, o que explica os resultados obtidos.

5.2. Frequência e estabilidade dos dissômicos.

Os dados da Tabela 2, obtidos por amostragem de conídios em meio completo, indicam que dissômicos podem ser obtidos facilmente da linhagem V8, uma linhagem deteriorada. As frequências foram altas em relação às obtidas por outros pesquisadores, e todos os dissômicos foram de um só tipo, isto é, para o grupo de ligação III.

Em relação à estabilidade dos dissômicos (Tabela 7), os resultados indicaram uma frequência muito pequena de perda do cromossomo aneuplóide. Apenas 1,077% dos conídios provenientes de colônias dissômicas deram origem a colônias haplóides.

Neste aspecto, POLLARD et alii (1968) verificaram que a frequência de aneuplóides, em especial de dissômicos, é relativamente alta em cruzamentos de linhagens com aberrações cromossômicas, sendo extremamente baixa quando as linhagens cruzadas não apresentam essas aberrações.

Experimentos posteriores mostraram, no entanto, que linhagens haplóides com aberrações cromossômicas apresentaram frequências maiores de aneuplóides originados por não-disjunção mitótica do que as linhagens haplóides normais.

DANTAS D'ARCE (1972) comparou a frequência de aneuplóides em linhagens haplóides normais e com duplicação

cromossômica. Os resultados obtidos mostraram a ocorrência de aneuplóides somente nas linhagens com aberrações cromossômicas , com frequência de 0,205%.

UPSHALL (1974) enfocou novamente o problema, mostrando que translocações heterozigotas aumentaram a frequência de não-disjunção mitótica e meiótica, produzindo dissômicos em frequência aproximada de 0,02%.

PIZZIRANI & AZEVEDO (1975) e PIZZIRANI (1977) estimaram a frequência de aneuplóides em 0,12% para as colônias originadas de linhagem haplóide normal e em 0,44% para as originadas de linhagem haplóide duplicada.

AZEVEDO & ROPER (1970) analisaram uma série de variantes deterioradas obtidas de linhagem duplicada de *A. nidulans*. A variante V8, com uma mutação (v8) no grupo de ligação IV, caracterizou-se por apresentar boa estabilidade e produzir alta frequência de dissômicos para o grupo de ligação III . Foi proposto por aqueles autores que a deterioração e o aumento da instabilidade resulta de duplicação em tandem em qualquer dos segmentos duplicados do cromossomo e que sua transposição para regiões não duplicadas reduz a instabilidade.

PARRY & COX (1970) observaram que em *Saccharomyces cerevisiae* alguns cromossomos (V, VIII, IX, XII e XIII) , bem como o que transporta o gene tyr 4, são mais tolerados na condição dissômica.

HAMERTON (1971) , em capítulo sobre a genética

da não-disjunção, mostra que o controle genético desempenha um papel importante neste fenômeno, com vários casos interessantes descritos no gênero *Drosophila*. Em centeio, MUNTZING (1946, in: HAMERTON, 1971) concluiu que a heterocromatina do satélite, em bora não envolvida mecanicamente no processo de não-disjunção, é capaz de influir em outras partes do mesmo cromossomo. De maneira similar, a heterocromatina do satélite é capaz de controlar a não-disjunção polarizada do cromossomo X em *Sciara*. Outro fato interessante é que, no homem, os cromossomos 12 e 13, que mais ocorrem como trissômicos, também possuem satélites e braços heterocromáticos curtos.

Em *A. nidulans* o cromossomo 2 é tão grande quanto o 1 (o maior) e apresenta satélite (ELLIOT, 1960). DANTAS D'ARCE (1972), em estudos de sobrevivência de dissômicos à luz ultra-violeta, concluiu que o grupo de ligação III é relativamente grande, sendo menor apenas que os grupos I, VIII e II . Entretanto, PIZZIRANI (1977) afirmou que métodos que envolvam a sobrevivência a agentes físicos e químicos não são tão precisos para a determinação do tamanho dos cromossomos em *A.nidulans*. Aquela autora utilizou a comparação de tamanhos de conídios e de seus núcleos de linhagens haplóides e dissômicas, concluindo que o grupo de ligação III é maior que o grupo IV e que o VI.

Os fatos expostos não impedem uma possível correlação entre o cromossomo 2 e o grupo de ligação III, o que, mais uma vez, ressalta a necessidade de estudos citológicos de nú

cleos e cromossomos de dissômicos.

Assim, concluiu-se que o tipo de aberração cromossômica da linhagem de origem desempenha papel significativo na frequência de aneuplóides. No entanto, como a totalidade dos dissômicos foi para o grupo de ligação III, bem como sua estabilidade, levou este autor a admitir que as características genéticas inerentes à linhagem, possivelmente o gene v8, mesmo localizando-se no grupo de ligação IV, seriam causas adicionais para o aumento da frequência de não disjunção mitótica.

Em vista disso, este autor sugere que novas pesquisas sejam conduzidas, procurando verificar se a transferência do gene v8 para outra linhagem implicaria, conseqüentemente, em aumento da frequência de não-disjunção mitótica na linhagem receptora.

5.3. Possíveis fatores modificadores da frequência de dissômicos.

5.3.1. Temperatura

O efeito da temperatura na frequência de dissômicos foi estudado sob dois aspectos : na formação e na germinação dos conídios.

Os dados apresentados na Tabela 3, referentes ao

possível efeito da temperatura alterando a frequência de não - disjunção mitótica na germinação do conídio, mostram variações relativamente grandes em algumas sementeiras. As análises individuais das sementeiras 3, 8 e 9 indicaram valores de χ^2 altamente significativos para iguais proporções esperadas de dissômicos. (12,26, 18,64 e 18,16, respectivamente). Porém, as frequências de dissômicos foram maiores ora a 28°C, ora a 37°C. As frequências totais, por outro lado, não diferiram entre si.

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos em 4 sementeiras, procurando verificar algum efeito da temperatura modificando a taxa de não-disjunção mitótica na formação do conídio. Este efeito foi estimado através da frequência de dissômicos, obtida pela sementeira de conídios desenvolvidos a 28°C e a 37°C. A análise estatística apresentou $\chi^2 = 0,75$, valor considerado não significativo para proporções iguais de dissômicos esperadas de conídios formados nas duas temperaturas. Entretanto, como nos dados da Tabela 3, houve uma certa variação nos resultados das sementeiras, repetindo-se o mesmo comportamento : em algumas sementeiras as frequências de dissômicos foram significativamente maiores a 37°C, em outras, a 28°C.

Embora não se tenha constatado qualquer efeito da temperatura na frequência de dissômicos, as variações observadas nas diversas repetições e o valor relativamente alto do χ^2 obtido dos dados da Tabela 3 não permitem descartar completamente a hipótese da possibilidade de um efeito da temperatura

ra na não-disjunção mitótica. Deve-se também considerar que SUBRAMANIAN & RANGANATHAN (1947, in: ESSER & KUENEN 1967) descreveram um caso de indução de tetrassômico em *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando choque de frio, embora neste caso todos os cromossomos tenham sido afetados. Assim, seria necessário, no futuro, testar amplitudes maiores de temperatura, como, por exemplo, 25°C e 42°C.

5.3.2. pH do meio de cultura

A revisão de literatura mostrou que vários agentes, físicos e químicos atuam das mais diferentes formas em *A. nidulans*. O PFA (para-fluorofenilalanina) atua na distribuição dos cromossomos, possivelmente causando haploidização por perdas sucessivas de cromossomos (LHOAS, 1961 ; McCULLY & FORBES, 1965). Outros agentes, como o NG (N-metil-N'-nitrosoguanidina) e o FUDR (5-fluorodesoxiuridina), aumentam a taxa de permuta mitótica (SHANFIELD & KAUFER, 1971), efeito também produzido pela luz ultra-violeta (CHANG & TUVENSON, 1967). O benlate, por sua vez, induz instabilidade em diplóides, com efeito similar ao do PFA (HASTIE, 1970). Em relação ao pH do meio de cultura não se encontrou, contudo, nenhuma referência.

Usualmente acerta-se o pH do meio de cultura ao redor de 6,5 (PONTECORVO et alii, 1953). A experiência mostra, entretanto, que *A. nidulans* suporta grandes variações de

pH, aproximadamente de 4,5 a 8,0.

Os resultados da Tabela 5 mostraram frequências poucos maiores de dissômicos nos níveis de pH 6,0, 6,5 e 7,0 e menores nos níveis 5,0 e 8,0. A análise, no entanto, forneceu o valor de $\chi^2 = 5,59$, não significativo (GL=4), indicando não haver diferenças estatísticas entre as frequências de dissômicos obtidas nos diversos níveis de pH.

5.3.3. Idade do conídio

Os dados apresentados na Tabela 6 referem-se a 10 repetições onde foram contadas as colônias haplóides e dissômicas provenientes de conídios da região do bordo e da região central de colônias V8, incubadas a 37°C. Do total de colônias obtidas de conídios da região do bordo, 3,348% foram dissômicas. Dos conídios da região central obteve-se uma frequência de 4,688%. Estas frequências são estatisticamente diferentes ($\chi^2 = 48,48$) mostrando que a frequência de dissômicos é afetada pela idade do conídio : conídios mais velhos apresentam maior frequência de dissômicos que os mais jovens.

Neste aspecto, COX & BEVAN (1962) sugeriram a possibilidade de a idade da colônia influenciar no aparecimento de aneuplóides em *Saccharomyces cerevisiae*. Em organismos

superiores, mais especificamente no homem, a aneuploidia tem sido bem estudada, embora não se tenha encontrado nenhuma referência ao mecanismo da não-disjunção, em si. HAMERTON (1971) fez uma ampla revisão do assunto, mostrando o efeito da idade na frequência de trissômicos, nos casos de mongolismo (síndrome de Down) e em culturas de linfócitos de mulheres com mais de 55 anos de idade. O autor sugeriu a possibilidade de a idade causar redução generalizada na eficiência mitótica, afetando, assim, a distribuição dos cromossomos.

A comparação das frequências de dissômicos a partir de conídios das duas regiões, com uma diferença de idade de, aproximadamente, 8 dias, mostrou que os conídios mais velhos produziram maior frequência de dissômicos em 7 das 10 repetições efetuadas. Assim, os experimentos futuros, que venham a envolver frequências de não-disjunção, deverão levar em consideração o aspecto da idade da colônia, bem como manter certa uniformidade em relação à região de coleta de conídios.

5.4. Diâmetros dos conídios e de seus núcleos.

5.4.1. Material e métodos utilizados

Em relação aos núcleos vegetativos de *A. nidulans* a revisão de literatura mostrou que estes podem apresentar uma grande variação de forma, difícil de ser interpretada

(WEIJER & WEISBERG, 1966). Assim, procurou-se escolher o material que permitisse medidas mais precisas para o cálculo do volume nuclear. A escolha dos conídios foi devida ao fato de os mesmos apresentarem núcleos esféricos (WEIJER & WEISBERG , 1966) e de estarem em estado interfásico (HEAGY & ROPER , 1952), não apresentando, portanto, as variações de forma que viriam dificultar as medidas (PAES DE BARROS, 1977).

De acordo com o ciclo vegetativo de *A. nidulans* (PONTECORVO et alii, 1953) descrito no item 2.1.1., as cadeias lineares de conídios, que se formam a partir dos esterígmas secundários, apresentam os conídios mais velhos nas extremidades das mesmas e os mais jovens, nas suas bases. Assim, os conídios de uma cadeia representam várias fases de um processo de diferenciação, fato este que foi considerado na coleta dos mesmos para a análise citológica.

A técnica utilizada, descrita no item 3.2.5.1. , sugerida por PAES DE BARROS (1977), permite a coleta de conídios que estão numa mesma fase de crescimento, evitando as grandes variações apresentadas por uma população em crescimento, por serem analisadas fases diferentes desse crescimento (SCHREIBER, 1946, 1950, 1951).

Reverendo a literatura, este autor verificou que vãrias técnicas têm sido empregadas para a coloração de núcleos e cromossomos de fungos, como a da orceína acética, a do carmim acético, a da hematoxilina, a do HCl-Giemsa, a de Feulgen

e outras, com os mais variados resultados. Assim, entre as técnicas mais utilizadas, procurou-se testar a que mais se adaptava ao material utilizado, pois, em 1945, McCLINTOCK já afirmava que o processo de coloração pode apresentar bons resultados em função do material utilizado.

Para a coloração dos núcleos dos conídios as técnicas utilizando a orceína e o carmim não forneceram resultados satisfatórios, talvez devido à procedência dos corantes, o mesmo ocorrendo com a técnica de Feulgen.

A técnica HCl-Giemsa foi a que apresentou os melhores resultados. Contudo, foram necessárias algumas modificações na técnica utilizada por PAES DE BARROS (1977), para adaptá-la à natureza da linhagem por nós utilizada. As modificações implicaram na diminuição da concentração do corante, bem como do tempo de coloração, como descrito no item 3.2.5.1. . As objeções apresentadas por ROBINOW & CATEN (1969) quanto ao uso desta técnica não se aplicam a este caso, uma vez que a intensa coloração dada pelo Giemsa acentua os contornos dos núcleos, facilitando o traçado de seus diâmetros.

Para as medições dos diâmetros dos conídios e de seus núcleos, optou-se pela utilização da câmara clara, como descrito no item 3.2.5.2., pelo fato de que a obtenção direta de medidas ao microscópio, através do uso de ocular micrométrica é difícil e lenta, pois as pequenas oscilações causadas pelo manuseio do microscópio dificultam o ajuste dos traços da es

cala com os limites dos núcleos e dos confídios. O método utilizando a ampliação de fotografias, além do alto custo e da necessidade de técnica perfeita para as ampliações, a fim de não introduzir erros, em geral, atenua os limites das figuras, em especial dos núcleos, exigindo várias medidas do mesmo material para a obtenção de um resultado razoável.

Os resultados obtidos, especialmente em relação aos núcleos, quando comparados com os obtidos por PAES DE BARROS , 1977), indicam boa precisão do método (Tabela 15).

5.4.2. Comparação dos diâmetros celulares e nucleares das linhagens estudadas.

Na Tabela 9 encontram-se os resultados das medidas dos diâmetros dos confídios e de seus núcleos nas linhagens haplóides (MSE), deteriorada (V8) e dissômica. Pode-se observar que, tanto em relação aos núcleos quanto aos confídios , a linhagem dissômica apresenta diâmetros maiores que a deteriorada (V8) e esta, por sua vez, apresenta-os maiores que a haplóide.

Duplicações em tandem no segmento duplicado seriam responsáveis pela deterioração (NGA & ROPER, 1968). A linhagem V8 é derivada de linhagem duplicada, apresentando maior estabilidade, provavelmente devido a transposições de partes

duplicadas para regiões não duplicadas (AZEVEDO & ROPER,1970). Esperava-se, pois, que a linhagem V8 apresentasse diâmetros celulares e nucleares maiores que os da linhagem haplóide e menores que os da dissômica dela originada, que, além das duplicações, apresenta um cromossomo adicional.

A análise dos histogramas e polígonos de frequências (Figura 6) mostra que a linhagem V8 apresenta maior variabilidade de diâmetro nuclear que as outras duas. Esse fato era esperado, pois apesar de maior estabilidade apresentada em relação a outras linhagens deteriorados (AZEVEDO & ROPER , 1970), a linhagem V8 apresenta certa instabilidade que seria produzida por perda, em tamanhos variáveis, do segmento duplicado (NGA & ROPER, 1968). PONTECORVO & KAUFER (1958) verificaram que conídios da região central de colônias dissômicas apresentaram variação de tamanho, desde o da haplóide até ao da diplóide. Em relação ao diâmetro nuclear, os dados da Tabela 13 mostram que a linhagem dissômica apresentou pequena variação deste caráter, provavelmente devido à estabilidade apresentada pela linhagem (vide dados da Tabela 7) e pela técnica de coleta que, além das vantagens já discutidas, se limitou ao centro dissômico da colônia. Além disso, a linhagem dissômica apresenta, com frequência, conídios binucleados e mesmo trinucleados, cujos diâmetros celulares maiores se constituem em fonte de variação quando se analise este caráter.

5.4.2.1. O volume modal

Como foi observado no item 5.3.1, os conídios das cadeias lineares, que se formam a partir dos esterígmas secundários, representam fases diversas de um processo de diferenciação. Como o volume nuclear foi estimado através das medidas destes conídios, seria razoável esperar que as curvas e os histogramas apresentados na Figura 6 indicassem as variações de uma população em crescimento, não sendo, portanto, normais. Em tretanto, tal fato não ocorreu, parecendo indicar que os confidios analisados se encontravam em fases semelhantes de desenvolvimento, o que provavelmente foi determinado pelo método de coleta dos conídios descrita no item 3.2.5.1. Se as populações estão em crescimento ativo e se se pretende examiná-las numa mesma fase do período interfásico, torna-se necessário comparar seus volumes modais, pois assim as diferenças volumêtricas observadas serão resultantes apenas das variações quantitativas do genoma (SCHEREIBER, 1946, 1950, 1951).

Tabela 14 - Relação entre os volumes modais das três linhagens.

Acrêscimo no volume em relação à linhagem					
Linhagens	MSE			V8	
MSE	0,4089				
V8	0,4089	+	0,4355		
d1	0,4089	+	0,4355	+	0,2357
% em relação	MSE		106,50		57,64
à linhagem :	V8				27,91

A análise dos dados da Tabela 14 mostra que a linhagem V8 apresenta um acréscimo de pouco mais de 100% no volume do núcleo em relação à linhagem haplóide (MSE). Como a linhagem V8 é derivada da linhagem A (duplicada), este aumento de volume poderia ser devido à duplicação do grupo de ligação I, translocada para o grupo de ligação II. PAES DE BARROS (1977) analisou a linhagem duplicada A, encontrando cerca de 40% de acréscimo no volume nuclear, em relação à linhagem haplóide. O valor encontrado aqui para a linhagem V8 foi

bastante elevado para ser atribuído somente à duplicação cromossômica, mesmo considerando que o grupo de ligação I possa ser o maior deles (DANTAS D'ARCE, 1972). Assim, outros fatores devem influir no volume nuclear desta linhagem. Quando comparado com o volume modal do núcleo da linhagem A (PAES DE BARROS, 1977), o volume do núcleo da linhagem V8 é cerca de 28% maior. Este aumento provavelmente se deve à natureza deteriorada da linhagem V8, que apresentaria duplicações em tandem em qualquer dos segmentos translocados do cromossomo (AZEVEDO & ROPER, 1970). Além disso, o gene v8 localizado no grupo de ligação IV, poderia causar um aumento de outros componentes macromoleculares no núcleo. Deve ser também considerado que a linhagem A é relativamente instável, perdendo, com frequência, partes do segmento cromossômico duplicado. Pode, dessa maneira, originar conídios haplóides, que, analisados citologicamente, concorreriam para diminuir o volume médio calculado. A linhagem V8, por outro lado, por apresentar boa estabilidade e alta frequência de não-disjunção mitótica para o grupo de ligação III, teria conídios dissômicos que, na análise citológica, aumentariam o volume médio.

A linhagem dissômica, por sua vez, apresenta um acréscimo de cerca de 27% em relação à linhagem V8, que poderia ser determinado pelo cromossomo adicional. Segundo ELLIOT (1960), há uma grande variação de tamanho entre os cromossomos de *A. nidulans* (item 2.2). Isto permitiria que os cromos

somos maiores produzissem, quando em duplicata como nos dissô-
micos, um aumento considerável no volume nuclear. O grupo de
ligação III é razoavelmente grande (DANTAS D'ARCE, 1972; PIZ-
ZIRANI, 1977) (vide item 5.2) e poderia explicar este au-
mento no volume nuclear, o que sugere, mais uma vez, uma cor-
relação entre o cromossomo 2 e o grupo de ligação III. Outros
determinantes parciais do volume nuclear seriam os iniciadores
da duplicação nuclear e as unidades de replicação (ROSEMBERGER
& KESSEL, 1967; KESSEL & ROSEMBERGER, 1968). De acordo com su-
gestão apresentada por ROPER (não publicada), tendo um nú-
cleo haplóide de *A.nidulans* 8 unidades de replicação, um nú-
cleo com um cromossomo a mais ou teria 8 unidades de replicação
(neste caso o cromossomo adicional não duplicaria na divi-
são do núcleo) ou teria 16 unidades. Assim, um núcleo dissômi-
co apresentaria um volume bastante próximo do volume de um nú-
cleo diplóide. Este aspecto é bastante reforçado pela compara-
ção do volume modal aqui obtido para a linhagem dissômica
($1,0801 \mu\text{m}^3$ com o valor obtido por PAES DE BARROS (1977) pa-
ra a linhagem diplóide ($1,0513 \mu\text{m}^3$).

5.4.3. Coloração de hifas ascógenas

Como foi ressaltado anteriormente, procurou-se tes-
tar, neste trabalho, as técnicas mais utilizadas para a colora-

ção de núcleos e cromossomos em hifas ascógenas.

As hifas foram obtidas de cleistotécios provenientes de cruzamentos MSE x Dissômico. Na preparação das lâminas para exame microscópico, o material foi previamente fixado à lamínula com a utilização de albumina a 5%, desenvolvendo-se, a seguir, os processos descritos no item 3.5.2.1., referentes às hifas ascógenas. Esta técnica revelou-se a melhor para o material estudado, pois a técnica comumente utilizada, onde se procede o esmagamento dos cleistotécios hidrolizados diretamente em uma gota de corante, provoca a perda acentuada de material.

Foram testados vários processos de coloração, em especial os de Feulgen, o da hematoxilina, o da orceína acética e o da HCl-Giemsa. Os melhores resultados foram obtidos com as duas últimas técnicas, embora a coloração com a orceína acética não tenha fornecido bons contrastes.

Para a obtenção de bons resultados com a técnica HCl-Giemsa, foram necessárias algumas adaptações no tempo de hidrólise, na diluição do corante e no tempo de coloração. Os resultados foram considerados bons em relação aos núcleos. Quanto aos cromossomos, é válida a observação de que este método cora intensamente os elementos cromatínicos, dificultando a observação da morfologia dos cromossomos. (ROBINOW & CATEN, 1969). Nas figuras 7 e 8 podem ser observados os resultados da técnica utilizada. Figuras microscópicas melhores puderam ser observadas, permitindo contar até oito cromossomos, embora sem

nenhum detalhe da morfologia dos mesmos.

As técnicas testadas têm sido utilizadas com sucso em vários outros gêneros. Além disso, devem ser ressaltados, mais uma vez, os resultados obtidos por ELLIOT (1960) em *A. nidulans*. Isso nos leva a concluir que o problema maior para a coloração localiza-se na própria natureza da linhagem utilizada. Esta não se revelou favorável aos estudos citológicos, pelo menos diante das técnicas até agora disponíveis para estudos em microscopia ótica. Esses fatos, associados ao tamanho bastante reduzido dos cromossomos, sugerem, mais uma vez, a necessidade de novos estudos, à luz da microscopia eletrônica.

5.5. Análise genética

Os resultados da Tabela 8 mostram uma segregação de 55 colônias dissômicas, gal^+ para 35 haplóides, gal^+ para 29 haplóides, gal^- , com $\chi^2 = 1,28$, não significativo, indicando que os resultados estão de acordo com a segregação esperada de 3:1:1, partindo-se da hipótese de que o cromossomo aneuplóide é transferido na meiose.

Entretanto, a Tabela 8 mostra também a presença de 2 segregantes dissômicos gal^- não esperados deste cruzamento. De acordo com o exposto no item 3.2.4., os ascósporos foram semeados em placas de Petri contendo meio completo. Após a iden

tificação das colônias haplóides e dissômicas, todas foram transferidas para meio de galactose, para a análise da marca genética em questão. Duas colônias registradas como dissômicas não cresceram neste meio seletivo, mostrando tratar-se, pois de colônias dissômicas gal^- . A ocorrência destas colônias pode ser explicadas principalmente por dois processos : recombinação e perda do cromossomo adicional por um dissômico de constituição $gal^+ gal^-$, resultando um haplóide gal^- .

TABELA 15 - Diâmetros dos conídios e de seus núcleos obtidos através de fotografias (PAES DE BARROS, 1977) e através de câmara clara.

Linhagens	Fotografia		Câmara clara	
	Célula	Núcleo	Célula	Núcleo
Haplóide	2,7031	0,9562	2,9480	0,9373
Duplicada	2,9531	1,0718	--	--
Deteriorada	2,9687	1,0843	--	--
V8(deteriorada)	--	--	3,5117	1,1823
Dissômica	--	--	3,8748	1,3477

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi desenvolvido com a finalidade de se analisar genética e citologicamente a linhagem de *teriorada* V8 de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter e os dissômicos por ela produzidos por não-disjunção mitótica.

As estimativas das frequências de aneuplóides foram feitas através de sementeiras de conídios da linhagem V8 em meios completos com e sem desoxicolato de sódio. Paralelamente, foram estudados os possíveis agentes modificadores da frequência de aneuplóides : temperatura, pH e idade do conídio.

Estudos citológicos foram conduzidos para comparar os tamanhos dos núcleos e das células de conídios das linhagens V8, dissômica e MSE, e analisar hifas ascógenas provenientes de cruzamentos MSE x dissômico.

Os resultados obtidos permitiram chegar às seguintes conclusões :

1. Em virtude da baixa taxa de crescimento da linhagem V8, tornou-se desnecessária a adição de desoxicolato

de sódio para melhor visualização dos aneuplóides.

2. O tipo de aberração cromossômica e a constitução genética da linhagem são fatores que influíram na frequência de aneuplóides. O tipo de dissômico obtido e sua alta estabilidade reforçam a possibilidade do gene V8 aumentar a taxa de não-disjunção mitótica.

3. Dentro dos limites utilizados não houve efeítos da temperatura ou do pH na frequência de aneuplóides. A idade do conídio influiu na não-disjunção mitótica: conídios mais velhos produzem maior frequência de aneuplóides que os mais novos.

4. A análise genética do cruzamento Dissômico x MSE mostrou que o cromossomo adicional é transferido durante o processo meiótico.

5. Citologicamente, a linhagem V8 apresenta o diâmetro médio de seus núcleos maior que o da linhagem MSE e menor que o da linhagem dissômica.

6. A técnica citológica com melhores resultados para a coloração de núcleos de conídios e de hifas ascógenas das linhagens estudadas foi a HCl-Giemsa. A diluição do corante e o tempo de coloração e hidrólise foram adaptados para cada linhagem.

7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present study was carried out to analyse genetically and cytologically a deteriorated V8 strain of *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter, and the dissomics produced by mitotic non-disjunction.

Estimates of the frequency of aneuploids were made by plating out conidia of the V8 strain on complete medium with and without sodium deoxycholate. In parallel, studies were made of factors which might influence the frequency of aneuploids : temperature, pH and the age of the conidia.

Cytological studies were carried out to compare the sizes of the nuclei and cells of conidia of the V8, dissomic and MSE strains, and to analyse ascogenous hyphae produced by MSE x dissomic crosses.

From the results obtained, the following conclusions can be drawn :

1. because of the low growth rate of the V8

strain, it was not necessary to add sodium deoxycholate in order to distinguish aneuploids.

2. the type of chromosomal aberration and the genetic constitution of the strain are factors which influence the frequency of aneuploids. The type of dissonics obtained, and their high stability, suggest that the v8 gene increases the rate of mitotic non-disjunction.

3. within the limits tested, temperature and pH had no effect on aneuploid frequency, but age of conidia did have an effect : old conidia produce a higher frequency of aneuploids than younger ones.

4. genetic analysis of the dissonic x MSE cross showed that the additional chromosome was not lost during meiosis.

5. Cytologically, the V8 strain shows a greater mean nuclear diameter than the MSE and a smaller one than the dissonic strain.

6. the cytological technique which gave best results for staining the nuclei of conidia and ascogenous hyphae of the studied strains was HCl-Giemsa. The dilution of the stain and the times of staining and hydrolysis were adjusted for each strain.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIST, J.R. & Wilson, C.R., 1965. Observations on nuclear division in vegetative hyphae of *Ceratocystis fagacearum*. *Arkan*
sas Academy of Science Proceedings, 19: 32-36.
- AIST, J.R. & Wilson, C.R., 1967. Nuclear behavior in the vegetative hyphae of *Ceratocystis fagacearum*. *American Journal of Botany*, 54: 99-104.
- ANDERSON, E.G., 1929. Studies on a case of high non- disjunction in *Drosophila melanogaster*. *Zeitschrift fuer Induktive Abstammungs*, 51: 391.
- AZEVEDO, J.L. & ROPER, J.A., 1970. Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: sucessive and transposable genetic changes. *Ge*
netical Research, 16: 79-93.
- BAINBRIDGE, B.W. & ROPER, J.A., 1966. Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. *Jour
nal of General Microbiology, 42: 417-424.*
- BAKERSPIGEL, A., 1959. The structure of the nuclei in the vegetative mycelium of *Neurospora crassa*. *American Journal of Botany*, 46: 180-190.

- BARACHO, I.R., VENCÓVSKY, R. & AZEVEDO, J. L., 1970. Correlation between size and hibrid or selfed state of the cleistothecia in *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, 54: 109-116.
- BARRY, E.G., 1966. Cytological techniques for meiotic chromosomes in *Neurospora*. *Neurospora Newsletter*, 10: 12-13.
- BARRY, E.G., 1969. The diffuse diplotene stage of meiotic prophase in *Neurospora*. *Chromosoma*, 26: 119-129.
- BEADLE, G.W., 1932. The relationships of crossing over to chromosome association in *Zea euchlaena* hybrids. *Genetics*, 17: 491-501.
- BECKETT, A. & WILSON, I. M., 1968. Ascus cytology of *Podospora anserina*. *Journal of General Microbiology*, 53: 81-87.
- BEHMER, O.R., FREITAS NETO, A.G. & SCALABRINI, M.D.L., 1968. Coloração do núcleo da *Torulopsis utilis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 10 (6): 394-397.
- CHANG, L. & TUVESON, R.W., 1967. Ultraviolet-sensitive mutants in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 56: 801-810.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1969. Cell volume per nucleus in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 55: 291-299.
- COX, B.S. & BEVAN, E.A., 1962. Aneuploidy in yeast. *New Phytologist*, 61: 342-355.

- DANTAS D'ARCE, M.M.C., 1972. Contribuição ao estudo de aberrações cromossômicas numéricas em *Aspergillus nidulans*. Disser
tação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de mestre, 50 p., Piracicaba, SP.
- DOBZHANSKY, T., 1930. Translocations involving the third and fourth chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Genética*, 15: 347-399.
- DOBZHANSKY, T., 1933. Studies on chromosomes conjugation II. The relation between crossing over and disjunction of chromosomes. *Zeitschrift fuer Induktive Abstammungs*, 64: 269-309.
- DUNCAN, L.G. & GALBRAITH, M.H., 1973. Improved procedures in fungal cytology utilizing Giemsa. *Stain Technology*, 48: 107-110.
- ELLIOT, C.C., 1960. The cytology of *Aspergillus nidulans*. *Genetic Research*, 1: 462-476.
- ESSER, K., & KUENEN, R., 1967. *Genetics of fungi*. Springer Verlag, New York, 500 p.
- FULLER, M.S., 1976. Mitosis in fungi. *International Review of Cytology*, 45: 113-151.
- FURTADO, J.S., 1968. Basidial cytology of *Exidia nucleata*. *Mycologia*, 55 (1): 9-15.
- FURTADO, J.S., 1970. Ascal cytology of *Sordaria brevicolis*. *Mycologia*, 52 (3): 453-461.

- GLASS, H.B., 1933. A study of dominant mosaic eye-colour mutants in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Genetics*, 28:69-112.
- GLASS, H.B., 1935. A study of factors influencing chromosomal segregation in translocations of *Drosophila melanogaster*. *Research Bulletin*, 231: 1-28.
- HAMERTON, J.L., 1971. *Human cytogenetics*. New York, Academic. 2V.
- HASTIE, A.C., 1970. Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, 226: 771.
- HEAGY, F.C. & ROPER, J.A., 1952. Deoxyribonucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus* conidia. *Nature*, 170: 713-714.
- HUNG, C.Y. & WELLS, K., 1971. Light and electron microscopic studies of crozier development in *Pyronema domesticum*. *Journal of General Microbiology*, 66: 15-27.
- ISHITANI, G., UCHIDA, K. & IKEDA, Y., 1956. The relation of DNA content to cell size in *Aspergillus*. *Experimental Cell Research*, 10:737-740.
- KAFER, E., 1960. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 186: 619-620.
- KAFER, E., 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46: 1581-1609.

- KAFER, E., 1965. Origins of translocations in *Aspergillus* ni
dulans. *Genetics*, 52: 217-232.
- KAFER, E., 1973. Disomics from heterozygous crosses providing evidence for reciprocal translocations and for map position of centromeres and meiotically unlinked markers in *Aspergillus*. *Genetics*, 74: 129-130 (abst.)
- KAFER, E., 1975. Reciprocal translocations and translocations disomics of *Aspergillus nidulans* and their use for genetic mapping. *Genetics*, 79: 7-30.
- KAFER, E. & UPSHALL, A., 1973. The phenotypes of the eight di
somics and trisomics of *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Heredity*, 64(1): 35-38.
- KESSEL, M., & ROSEMBERGER, R.F., 1968. Regulation and timing of deoxyribonucleic acid synthesis in hyphae of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 95: 2275-2281.
- KNOX-DAVIES, P.S. & DICHSON, J.G., 1960. Cytology of *Helminthosporium turcicum* and its ascigerous stage, *Trichometaspahaeria turcica*. *American Journal of Botany*, 47(5): 328-339.
- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with para-fluorophenylalanine. *Nature*, 130: 744.
- LU, B.C., 1962. A new fixative and improved propionocarmine squash technique for staining fungus nuclei. *Canadian Journal of Botany*, 40: 843-847.

- LU, B.C., 1967. The course of meiosis and centriole behaviour during the ascus development of the ascomycete *Gelasinospora calospora*. *Chromosoma*, 22: 210-226.
- LU, B.C., 1974. Meiosis in *Coprinus*: VI. the control of the initiation of meiosis. *Canadian Journal of Genetics and cytology*, 16: 155-164.
- LU, B.C. & RAJU, N.B., 1970. Meiosis in *Coprinus*: II. chromosome pairing and the lampbrush diplotene stage of meiotic prophase. *Chromosoma*, 29: 305-316.
- MAINWARING, H.R., 1971. Changes in chromosome morphology during the mitotic prophase in the ascus of the apomitic ascomycete, *Podospora arizonensis*. *Archives of Microbiology*, 75: 296-303.
- McCLINTOCK, B., 1945. *Neurospora*. I. Preliminary observations of the chromosomes of *Neurospora crassa*. *American Journal of Botany*, 32: 671-678.
- McCULLY, K.S. & FORBES, E., 1965. The use of p-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research*, 6: 352-359.
- McGINNIS, R.C., 1953. Cytological studies of chromosomes of rust fungi. I. the mitotic chromosomes of *Puccinia graminis*. *Canadian Journal of Botany*, 31: 522-526.

- McINTOSH, D.L., 1954. A Feulgen-Carmine technic for staining fungus chromosomes. *Stain Technology*, 29: 29-31.
- McINTOSH, M.E., & PRITCHARD, R.H., 1963. The production and replica plating of micro-colonies of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 4: 320-322.
- NAMBOODIRI, A.N., & LOWRY, R.J., 1967. Vegetative nuclear division in *Neurospora*. *American Journal of Botany*, 54: 735-748.
- NGA, B.H. & ROPER, J.A., 1968. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 58: 193-209.
- OLIVE, L.S., 1950. A cytological study of ascus development in *Patella melaloma* (Alb. & Schw.) Seaver. *American Journal of Botany*, 37: 757-763.
- OLIVE, L.S., 1953. The structure and behavior of fungus nuclei. *The Botanical Review*, 19: 439-555.
- PAES DE BARROS, J., 1977. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de mestre, 81p., Piracicaba, S.P.
- PARRY, E.M. & COX, B.S., 1970. The tolerance of aneuploid in yeast. *Genetical Research*, 16: 333-340.

- PIZZIRANI, A.A., 1977. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de mestre, 111p., Piracicaba, S.P.
- PIZZIRANI, A.A., & AZEVEDO, J.L., 1975. Obtenção de aneuploidias em *Aspergillus nidulans* com desoxicolato de sódio. In: *Relatório científico do Departamento de Genética da ESALQ/USP*, 148-149.
- POLLARD, D.R., KAUFER, E. & JOHNSTON, M.T., 1968. Influence of chromosomal aberrations on meiotic and mitotic nondisjunction in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 60: 743-757.
- PONTECORVO, G., 1956. The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology*, 10: 393-400.
- PONTECORVO, G., & KAUFER, E., 1958. Genetic analysis based on mitotic recombination. *Advances in Genetics*, 9: 71-104.
- PONTECORVO, G., ROPER, J.A., HEMMONS, L.M., McDONALD, K.D. & BUFTON, A.W.J., 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5: 141-238.
- RAJU, N.B. & LU, B.C., 1970. Meiosis in *Coprinus*. III. Timing of meiotic events in *C. lagopus* (sensu Buller). *Canadian Journal of Botany*, 48: 2183-2186.
- ROBINOW, C.F. & CATEN, C.E., 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.
- ROSEMBERGER, R.F., & KESSEL, M., 1977. Synchrony of nuclear replication in individual hyphae of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 94: 1464-1469.
- SCHREIBER, G., 1946. Estudos cariométricos dos poliplóides de *Coffea*. *Bragantia*, 6: 279-298.
- SCHREIBER, G., 1950. Some basic facts concerning the variability of nuclear size. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 22: 151-160.
- SCHREIBER, G., 1951. Pesquisas de citologia quantitativa, X^o : Pesquisas cariométricas nos meristemas de *Allamanda cathartica* L. var. *nobilis*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 23: 394-414.
- SHANFIELD, B. & KAUFER, E., 1971. Chemical induction of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 67: 209-219.
- SINGLETON, J.R., 1953. Chromosome morphology and the chromosome cycle in the ascus of *Neurospora crassa*. *American Journal of Botany*, 40: 124-144.
- SOMERS, C.E., WAGNER, R.P. & HSU, T.C., 1960. Mitosis in vegetative nuclei of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 45: 801-810.
- SPIEGEL, M.R., 1970. Estatística. 2^a ed. Rio de Janeiro. Editora McGraw Hill do Brasil. 580 p.

- STURTEVANT, A.H., 1926. A crossover reducer in *Drosophila me-*
lanogaster due to inversion of a section of the third chromos
some. *Biologisches Zentralblatt* , 46: 697-702.
- TIFFANY, L.H., 1956. The development of ascocarps of *Endoconi-*
diophora fagacearum. *Phytopathology*, 46: 29.
- UPSHALL, A., 1971. Phenotypic specificity of aneuploid states
in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 18: 167-171.
- UPSHALL, A. & KAUFER, E., 1974. Detection and identification of
translocations by increased specific nondisjunction in *As-*
pergillus nidulans. *Genetics*, 76: 19-31.
- UPSHALL, A., 1974. Genetic factors affecting non-disjunction
in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 33: 445.
- WARD, E.W.B. & CIURYSEK, K.W., 1962. Somatic mitosis in *Neuros-*
pora crassa. *American Journal of Botany*, 49: 393-399.
- WEIJER, J., KOOPMANS, A. & WEIJER, D.L., 1965. Kariokinesis of
somatic nuclei of *Neurospora crassa*: III. The juvenile and
maturation cycles (Feulgen and Crystal Violet staining). *Ca-*
nadian Journal of Genetics and Cytology, 7: 140-163.
- WEIJER, J. & WEISBERG, S.H., 1966. Kariokinesis of the somatic
nucleus of *Aspergillus nidulans*: I. The juvenile chromosome
cycle (Feulgen staining). *Canadian Journal of Genetics and*
Cytology, 3: 361-373.

- WILSON, C.L., 1956. Development of the ascogonium and peritec
cium of *Endoconidiophora fagacearum*. *Phytopatology*, 46: 625
-632.
- WILSON, I.M., 1952. The ascogenous hiphae of *Pyronema con*
fluens. *Annals of Botany*, 16 (63): 321-328.
- YUILL, E., 1950. The numbers of nuclei in conidia of *Asper*
gilli. *Transactions of the British Mycological Society*, 33:
324-331