ASPECTOS GENÉTICOS E CITOLÓGICOS DA INSTABILIDADE MITÓTICA EM *Aspergillus nidulans*

DULCE REGINA NIFFINEGGER E SOUZA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

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 Melhora-
mento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro 1979

Às memórias de

GIORGIO SCHREIBER, professor, incentivador e amigo,

RODOLPHO NIFFINEGGER FILHO, amigo, incentivo e pai.

COM SAUDADE

Aos Professores e Geneticistas de Microrganismos,

JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

ALINE APARECIDA PIZZIRANI KLEINER

EDMAR CHARTONE DE SOUZA

Minha homenagem

e admiração

.iii.

A

HILDA, *minha mãe*

ROGÉRIO, *meu irmão*

EDMARZINHO e GUILHERME, *meus filhos*

e TEREZINHA,

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho queremos agradecer e, em especial a:

- *Prof. João Lúcio de Azevedo*, pela orientação, confiança, exemplo e extrema bondade.
- *Prof.^a Aline Aparecida Pizzirani Kleiner*, pela nossa introdução no laboratório de Microrganismos, seu desprendimento, dedicação, cooperação e também pelas ilustrações desse trabalho.
- *Prof. Edmar Chartone de Souza*, companheiro de vida e de profissão, pelo incentivo, colaboração, sugestões e carinho constantes.
- *Prof.^a Consuelo Margarida Rubio di Biagi*, pelas valiosas sugestões durante todo o decorrer desse trabalho e também pela revisão cuidadosa do manuscrito.
- *Prof. José Branco de Miranda Filho e Isaias Olivio Geraldi*, pela valiosa orientação na execução das análises estatísticas.
- *Teresa Losada Vale*, pela inestimável colaboração na parte estatística e humana.
- *Prof.^a Margarida L.R. Aguiar Perecin e Prof. Claudio Luiz Messias*, pelo auxílio na execução das microfotografias.
- *Profs. Humberto Coelho de Carvalho, Milton Mirahy Maciel e Delson Lavalle*, pelo apoio e compreensão, como chefes do Departamento de Biologia Geral da U.F.M.G.
- *Dr. D.D. Perkins e Dr.^a D. Newmeyer* (Stanford University) pela atenção e sugestões oferecidas.

- *Prof. Flávio Cesar Almeida Tavares*, pela disponibilidade e colaboração.
- *Lídia Favraud*, pela cooperação amiga e constante; *José Odair Pereira*, pelas sugestões e companheirismo e *Maria José Valarini*, pelo auxílio providencial na correção dos originais.
- *Cleusa Graça Fonseca*, *Flávia Maria de Oliveira* e *Ubirajara Gabriel de Castro*, pelo imprescindível apoio na área das comunicações.
- *Instituto de Genética da ESALQ/USP*, na pessoa de seu Diretor *Prof. Ernesto Paterniani*, pela acolhida e utilização de instalações e equipamentos.
- *Professores do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas*, pela contribuição para nossa formação científica e amizade.
- *Colegas e amigos do curso de Pós-Graduação*, pela convivência, alegrias e esperanças compartilhadas e, em particular àqueles do Setor de Microrganismos.
- *Companheiros e amigos do Departamento de Biologia Geral da U.F.M.G.*, pela oportunidade concedida.
- *Nilza Maria Nalle Bértoli*, *Luiz Carlos Variassimo*, *Eliana Detoni* e *Terezinha J.L. Barrete*, pela colaboração na aquisição bibliográfica.
- *Funcionários do Instituto de Genética*, representados na pessoa de sua secretária, *Ericka Spruck*, pelo excelente atendimento.
- *Funcionários do Setor de Genética de Microrganismos*: *Antonio José Rocha Campos*, *Luís Próspero*, *Rodolfo Fulini*, *Salvador Pexe* e *Orlando Bueno Cardoso*, pela importância e eficiência dos serviços técnicos prestados.
- *Srs. José Bróglia*, *Alaor de Oliveira* e *Cleusval Bissi*, pela montagem, fotografia e datilografia desse trabalho.
- *Familiares e amigos*, pelo carinho, apoio e compreensão.
- E ainda às seguintes instituições e órgãos: *Instituto de Ciências Biológicas e Conselho de Pós-Graduação da UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS*; *COPELT*, *CAPES-PICD* e *CNPq-PIG*, pelos auxílios concedidos para a realização desse trabalho.

CURRICULUM VITAE

DULCE REGINA NIFFINEGGER e SOUZA, natural de Rio de Janeiro e filha de Rodolpho Niffinegger Filho e Hilda Paes Niffinegger, obteve os títulos de bacharel e licenciado no curso de História Natural da Universidade Federal de Minas Gerais. Iniciou a carreira universitária na Universidade de Brasília onde lecionou no Centro Integrado de Ensino Médio. Foi admitida, por concurso público na Universidade Federal de Minas Gerais, onde inicialmente trabalhou no Colégio Universitário e depois no Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas, onde é atualmente professor assistente da disciplina Genética e Evolução. Como parte do "Programa Quinquenal de Capacitação Docente" do Departamento de Biologia Geral da UFMG obteve ingresso no curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da USP, e atualmente desenvolve pesquisa na área de Genética de Microrganismos.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. RESUMO	01
2. INTRODUÇÃO	03
3. REVISÃO DA LITERATURA.	06
3.1. O fenômeno da instabilidade	06
3.1.1. Aspectos gerais.	06
3.1.2. Primeiras evidências	10
3.1.3. Instabilidade em fungos.	12
3.1.4. Em <i>Aspergillus nidulans</i>	14
3.1.5. Fatores que afetam a instabilidade . .	26
3.1.6. Da natureza da instabilidade	31
3.2. Instabilidade: suas implicações	33
3.2.1. Aspectos gerais	34
3.2.2. Alterações na morfologia das colônias..	36
3.2.3. Na conidiogênese	39
3.2.4. Na germinação de conídios.	45
3.2.5. No tamanho dos conídios.	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1. Linhagens utilizadas.	54
4.1.1. Marcadores genéticos e fenótipos das marcas utilizadas.	57
4.2. Meios de cultura e soluções utilizadas. . . .	58
4.2.1. Meio mínimo (<i>PONTECORVO e col., 1953</i>) ..	58
4.2.2. Meio completo sólido (<i>PONTECORVO e col.,</i> <i>1953</i>)	58
4.2.3. Solução de vitaminas	59
4.2.4. Solução de ácido nucléico de leveduras..	59
4.2.5. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo	60
4.2.6. Meio mínimo de galactose	60
4.2.7. Meio de acetato de amônio (<i>APIRION, 1962</i>)	60
4.2.8. Suplementos adicionados ao meio mí- nimo	61

	<u>Página</u>
4.2.9. Solução salina (0,85%).	61
4.2.10. Solução de tween "80" - (0,1% - V/V). .	62
4.2.11. Solução de cloroneb - 2% (Du Pont 65% de P.A.) (1,4-dicloro-2,5-dimetoxil benze no)	62
4.2.12. Solução de albumina 5%	62
4.2.13. Solução fosfato pH 6,9	62
4.2.14. Solução Helly	63
4.2.15. Formol neutro.	63
4.2.16. Solução estoque de GIEMSA.	64
4.2.17. Meios de análise	64
4.3. Equipamentos para microscopia e fotografia. .	64
4.4. Esterilização e incubação	65
4.5. Obtenção espontânea e manutenção dos variantes deteriorados e heterocarióticos	65
4.6. Ação da temperatura na obtenção de setores na linhagem A	66
4.7. Taxa de crescimento das colônias	67
4.8. Medidas microscópicas	68
4.8.1. Medidas da estrutura conidial.	68
4.8.2. Observação de algumas etapas da conidogênese	69
4.8.3. Diâmetro de conídios, núcleos e por- centagens de conídios uni, bi e trinucleados	70
4.8.4. Medida da taxa de germinação dos conídios	71
4.8.4.1. Em meio completo líquido. . .	71
4.8.4.2. Em blocos de meio completo, entre lâmina e lamínula: técnica especial para conídios le- tais	72
4.9. Manipulação de conídios, apresentando letali- dade, em setores heterocarióticos	73
4.9.1. Medida da germinação de conídios viá- veis e letais	75
4.9.2. Contagem do número de conídios amare- los e verdes	75

	<u>Página</u>
4.9.3. Diâmetro de núcleos e conídios amarelos e verdes	76
4.9.4. Análise genética	76
4.10. Técnicas de análise genética geral.	77
4.10.1. Obtenção do heterocário	77
4.10.2. Análise através do ciclo parassexual.	78
4.10.3. Análise através do ciclo sexual	79
4.10.4. Testes de alelismo	81
4.11. Análise estatística	81
5. RESULTADOS	84
5.1. Obtenção espontânea de setores, análise de seu número e posição em diferentes temperaturas..	84
5.2. Características dos variantes obtidos espontaneamente e isolados para análise.	92
5.2.1. Variantes deteriorados	92
5.2.2. Variantes heterocarióticos	94
5.3. Medida da taxa de crescimento das colônias.	96
5.4. Medidas microscópicas	103
5.4.1. De estruturas conidiais.	103
5.4.2. De variantes deteriorados.	103
5.4.3. De setores heterocarióticos.	106
5.4.4. Alterações na estrutura conidial detectadas através de análise microscópica	111
5.4.5. Observação de algumas etapas da conidiogênese	119
5.4.6. Diâmetro de conídios e seus núcleos; número de núcleos.	119
5.4.6.1. Em variantes deteriorados	119
5.4.6.2. Em setores heterocarióticos..	121
5.4.7. Medida da taxa de germinação em conídios	129
5.4.7.1. Germinação em blocos de meio completo entre lâmina e lâmina nula	129

	<u>Página</u>
5.4.7.2. Germinação em meio completo líquido	134
5.4.8. Manipulação de conídios apresentando letalidade em setores heterocarióticos	143
5.4.8.1. Frequência de conídios amarelos (letais) e verdes	143
5.4.8.2. Valores médios dos diâmetros de conídios e núcleos letais e não letais em setores heterocarióticos	145
5.4.8.3. Germinação de conídios viáveis e letais em setores heterocarióticos	151
5.5. Análise genética	151
5.5.1. Para variantes deteriorados.	154
5.5.2. Para setores heterocarióticos.	160
5.5.2.1. Utilizando as técnicas convencionais	160
5.5.2.2. Análise genética de conídios letais e não letais de setores heterocarióticos (utilizando-se técnica especial). .	166
5.6. Testes de alelismo	169
6. DISCUSSÃO	173
6.1. Ação da temperatura na instabilidade em <i>A. nidulans</i> ..	173
6.2. Características dos variantes obtidos.	178
6.2.1. Variantes deteriorados	178
6.2.2. Setores heterocarióticos	179
6.3. Alterações nas estruturas conidiais e crescimento das colônias	180
6.3.1. Em variantes deteriorados.	180
6.3.2. Para setores heterocarióticos.	185
6.4. Observações de algumas etapas da conidiogênese..	187

	<u>Página</u>
6.5. Diâmetro de conídios e núcleos.	189
6.5.1. Para variantes deteriorados.	190
6.5.2. Para setores heterocarióticos.	191
6.6. Germinação de conídios	196
6.6.1. Em meio completo sólido.	196
6.6.2. Em meio completo líquido	198
6.7. Manipulação de conídios letais em setores heterocarióticos	200
6.8. Análise genética.	203
6.8.1. Análise genética das linhagens deterioradas	203
6.8.2. Análise genética de componentes de setores heterocarióticos	210
7. CONCLUSÕES	218
8. SUMMARY	220
9. LITERATURA CITADA.	222

LISTA DAS TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Variantes deteriorados, origem, localização e respectivos autores em <i>Aspergillus nidulans</i> ..	19
2 - Número e frequência de setores obtidos da linhagem A de <i>A. nidulans</i> em diferentes temperaturas (Exp. a)	85
3 - Número e posição dos setores em relação aos quadrantes em diferentes temperaturas (Exp.a)	86
4 - Número e frequência de setores obtidos da linhagem A de <i>Aspergillus nidulans</i> em diferentes temperaturas (Exp. b)	87
5 - Número e posição dos setores em relação aos quadrantes em diferentes temperaturas (Exp.b)..	88
6 - Número, posição e relação de vizinhança de setores originados da linhagem A incubada em diferentes temperaturas	89
7 - Características gerais dos variantes deteriorados selecionados, todos com genótipo <i>proA₁</i> e <i>pabaA₆</i>	93
8 - Tipos de setores heterocarióticos e seus produtos, resultantes de sementeira em meio completo ou observação ao microscópio.	97
9 - Média do crescimento em cm de 10 colônias das linhagens A, MSE, <i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₂</i> e dos variantes deteriorados originados da linhagem A..	99
10 - Análise de variância para os valores médios obtidos para o 1º e 5º dias de crescimento de colônias de linhagens originais e variantes deteriorados	100
11 - Comparação entre tratamentos e as testemunhas pelo teste de Dunnet com relação aos valores médios obtidos para o 1º e 5º dias de crescimento	101

TabelaPágina

12 - Média ($\bar{m}$) de 20 medidas em micra (μ) e respectivos desvios padrões (s) de estruturas conidiais dos variantes deteriorados e das linhagens A, MSE e <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂	104
13 - Análise de variância para os valores médios obtidos de altura e diâmetro do pedúnculo, altura da vesícula e altura do conidióforo em variantes deteriorados	105
14 - Comparação entre os tratamentos e as testemunhas pelo teste de Dunnet para os valores médios de altura e diâmetro do pedúnculo; altura da vesícula e altura do conidióforo em variantes deteriorados . . .	107
15 - Média de 20 medidas em micra ($\bar{m}$) e seus respectivos desvios padrões (s) de estruturas conidiais de componentes de setores heterocarióticos e das linhagens A, MSE e <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂ . .	108
16 - Análise de variância para os valores obtidos da medição de altura e diâmetro do pedúnculo, altura da vesícula e altura do conidióforo de componentes de setores heterocarióticos	109
17 - Comparação entre os tratamentos e as testemunhas pelo teste de Dunnet para os valores médios de altura e diâmetro do pedúnculo, altura da vesícula e altura do conidióforo de componentes de setores heterocarióticos	110
18 - Características microscópicas dos variantes deteriorados e das linhagens A, MSE e <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂ (crescidos durante 72 horas). . .	112
19 - Características microscópicas de alguns variantes heterocarióticos.	118
20 - Valores médios ($\bar{m}$) e respectivos desvios padrões (s) de 25 conídios haplóides e de seus núcleos nos variantes deteriorados e linhagens A, MSE e <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂	122
21 - Análise da variância da medida de diâmetro de conídios e núcleos haplóides de variantes deteriorados e linhagens originais.	122

TabelaPágina

22 - Comparação entre os tratamentos e as testemunhas pelo teste de Dunnet, para os valores obtidos de diâmetros de confídios e núcleos haplóides de variantes deteriorados	123
23 - Frequência de confídios haplóides uni, bi e trinucleados em variantes deteriorados e linhagens originais	124
24 - Valores médios ($\bar{m}$) e respectivos desvios padrões (s) de confídios diplóides e de seus núcleos, resultantes do cruzamento de variantes deteriorados, linhagem A e <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂ com a linhagem <i>MSE</i>	125
25 - Análise de variância para as medidas de diâmetro de confídios diplóides resultantes do cruzamento de variantes deteriorados e linhagens originais com a linhagem <i>MSE</i>	126
26 - Comparação entre os tratamentos e as testemunhas pelo teste de Dunnet, para os valores de diâmetro de confídios e núcleos diplóides de variantes deteriorados	127
27 - Frequência dos confídios uni, bi e trinucleados nas linhagens diplóides	128
28 - Valores médios ($\bar{m}$) dos diâmetros de confídios haplóides e de seus núcleos e respectivos desvios padrões (s) em setores heterocarióticos e linhagens A, <i>MSE</i> e <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂	130
29 - Análise da variância dos valores obtidos para diâmetro de confídios e núcleos em setores heterocarióticos e linhagens originais	131
30 - Comparação entre os tratamentos e as testemunhas pelo teste de Dunnet para os valores de diâmetro de confídios e núcleos haplóides de setores heterocarióticos	132
31 - Frequência de confídios uni, bi e trinucleados em setores heterocarióticos e linhagens originais	133

TabelaPágina

32 - Número e porcentagem de conídios germinando (G) e não germinando (N/G) de variantes deteriorados e linhagens A, MSE e <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂ , em blocos de meio completo	135
33 - Número e porcentagem de conídios germinando (G) e não germinando (N/G), de setores heterocarióticos e linhagens A, <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂ e MSE, em blocos de meio completo entre lâminas e lamínula.	136
34 - Número e porcentagem de conídios germinando em meio completo líquido com 4, 8 e 12 horas para variantes deteriorados e linhagens A, MSE e <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂	139
35 - Número e porcentagem de conídios germinando em meio completo líquido com 4, 8 e 12 horas para setores heterocarióticos e linhagens A, MSE e <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂	140
36 - Número e frequência de colônias e conídios amarelos (letais) e verdes (viáveis) em setores heterocarióticos, através de semeadura e observação microscópica	144
37 - Valores médios ($\bar{m}$) de diâmetros de 25 conídios e núcleos haplóides e seus respectivos desvios padrões (s) em setores heterocarióticos e linhagens originais	146
38 - Análise da variância para os valores obtidos da medição de 25 conídios e núcleos haplóides de setores heterocarióticos	147
39 - Comparação entre os controles e as testemunhas pelo teste de Dunnet para conídios e núcleos haplóides de setores heterocarióticos..	147
40 - Valores médios ($\bar{m}$) do diâmetro de 25 conídios e núcleos diplóides e respectivos desvios padrões (s) em heterocarióticos cruzados com a linhagem MSE	148

TabelaPágina

41 - Análise da variância para os valores obtidos da medição de confídios e núcleos diplóides obtidos do cruzamento entre setores heterocarióticos e linhagem MSE	149
42 - Comparação entre os tratamentos e as testemunhas, pelo teste de Dunnet, para valores de diâmetro de confídios e núcleos diplóides em heterocarióticos	150
43 - Confídios viáveis e letais de setores heterocarióticos germinando em blocos de meio completo entre lâmina e lamínula	152
44 - Análises mitóticas resultantes dos cruzamentos entre os variantes deteriorados, provenientes da linhagem A, e a linhagem MSE	155
45 - Análise meiótica do variante deteriorado V ₄₇	156
46 - Análise meiótica do variante deteriorado V ₄₈	157
47 - Análise meiótica do variante V ₄₉ X MSE	157
48 - Análise meiótica do variante deteriorado V ₅₀ X MSE	158
49 - Análise meiótica do determinante de 1a. ordem V _{50.1} X MSE	158
50 - Análise meiótica do variante V ₅₁ X MSE.	158
51 - Análise meiótica do determinante de 1a. ordem V _{51.1} X MSE.	159
52 - Análise meiótica do variante deteriorado V ₅₂ X MSE	159
53 - Segregação meiótica de cruzamentos envolvendo variantes deteriorados originados da linhagem A X MSE	161
54 - Análises mitóticas resultantes dos cruzamentos entre confídios de setores heterocarióticos, provenientes da linhagem A, e a linhagem MSE.	162

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
55 - Análise meiótica do cruzamento entre componentes do H ₃ X MSE	163
56 - Análise meiótica do cruzamento entre componentes do H ₄ X MSE	163
57 - Análises meióticas dos componentes dos setores H ₅ , H ₆ e H ₇ X MSE	164
58 - Segregação meiótica de cruzamentos envolvendo componentes de setores heterocarióticos originados da linhagem A X linhagem MSE.	165
59 - Análises mitóticas resultantes dos cruzamentos entre os componentes dos setores heterocarióticos através de seus conídios amarelos (leais) e verdes com a linhagem MSE	168
60 - Segregação meiótica de cruzamentos envolvendo componentes de setores heterocarióticos H ₈ , H ₉ e H ₁₅ X MSE	170
61 - Variantes e segregantes utilizados nos testes de alelismo: sua localização nos grupos de ligação	171
62 - Segregação meiótica obtida do cruzamento entre variantes deteriorados	172
63 - Comparação entre médias (μ) obtidas para diâmetro de conídios e núcleos em <i>A. nidulans</i> por diversos autores e diferentes métodos	195

LISTA DAS FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Marcadores genéticos da linhagem A.	54
2 - Marcadores genéticos da linhagem MSE.	55
3 - Marcadores genéticos da linhagem <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂	56
4 - Esquema da estrutura conidial em <i>A. nidulans</i> indicando os locais de medições	69
5 - Média de duas repetições para a frequência de tipos de setores obtidos da linhagem A crescida em diferentes temperaturas	90
6 - Produção de setores em diferentes temperaturas	91
7 - Comparação da produção de setores nas temperaturas de 30°C e 40°C	91
8 - Linhagens <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂ (à direita) e A (à esquerda)	95
9 - Variantes deteriorados derivados espontaneamente a partir da linhagem A	95
10 - Linhagem A apresentando setores heterocarióticos e melhorados	98
11 - Representação gráfica das médias dos diâmetros de colônias com 1 a 7 dias de crescimento. Linhagens A, MSE, <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂ e variantes deteriorados da linhagem A	102
12 - O "relógio" da conidiogênese para alguns dos variantes deteriorados (V ₄₉ e V ₅₀), heterocarióticos (H ₂ A e V) e linhagens originais (A e MSE)	120
13 - Representação gráfica da porcentagem de germinação de conídios de variantes deteriorados e linhagens A, MSE e <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂ em blocos de meio completo durante 12 horas	137

FiguraPágina

14 - Representação gráfica da porcentagem de germinação de conídios de setores heterocarióticos e linhagens A, MSE e <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂ em blocos de meio completo durante 12 horas	138
15 - Germinação de conídios de variantes deteriorados e linhagens originais em meio completo líquido em diferentes tempos de incubação . .	141
16 - Germinação de conídios de setores heterocarióticos e das linhagens originais em meio completo líquido em diferentes tempos de incubação	142
17 - Conídios amarelos (claros) e verdes (escuros) do H ₈ (objetiva 100 x 1,25 x 3,2)	144
18 - Representação gráfica da porcentagem de germinação de conídios letais e não letais de setores heterocarióticos e das linhagens controle (12 horas)	153
19 - Localização dos determinantes de deterioração nos grupos de ligação em <i>A. nidulans</i>	209
20 - Modelo para explicar a origem das linhagens deterioradas e seus derivativos, analisados no presente trabalho	211
21 - Modelo para explicar os diversos tipos de componentes obtidos em setores heterocarióticos	216

1. RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo o estudo da instabilidade mitótica, sob os pontos de vista genético e citológico, em variantes deteriorados e setores heterocarióticos originados, espontaneamente da linhagem A de *A. nidulans*. Também a frequência de setores em diferentes temperaturas foi analisada nessa linhagem.

Verificou-se que a linhagem com duplicação, originou setores cuja frequência foi alterada pela variação da temperatura, sendo que a 40°C foi observado tanto aumento na frequência total de setores quanto na de setores amarelos (originados de deleção do segmento translocado ao grupo de ligação II). Além disso, a frequência de setores gêmeos, de diversos tipos, aumentou com a temperatura.

Da análise citológica de variantes deterioradas diversas alterações nas estruturas conidiais foram detectadas, não ocorrendo o mesmo para os componentes de setores heterocarióticos analisados. Modificações nas taxas de germinação também foram observadas em alguns variantes, e todos esses fatos traduziram-se, fenotipicamente, em alterações na mor-

fologia e crescimento das colônias.

A presença da duplicação modificou o diâmetro dos núcleos conidiais tanto para a linhagem com duplicação como para variantes deteriorados e heterocarióticos e, sua excisão parcial ou total pode ser constatada através de métodos citológicos e confirmada geneticamente. Com a utilização de técnica especial foi possível a detecção de conídios hipohaplóides em setores heterocarióticos, verificando-se, citologicamente, que a deleção alterou drasticamente a germinação, o tamanho dos núcleos e conídios e foi geneticamente localizado no grupo de ligação II.

Para variantes deteriorados, a análise genética mostrou que os determinantes de deterioração localizaram-se em vários dos grupos de ligação e, na maioria dos casos, apenas um gene estava envolvido. Possíveis casos de transposição e de novas duplicações em tandem, aumentando ou diminuindo o padrão de instabilidade, foram verificados. Para componentes de setores heterocarióticos, quando apenas os conídios viáveis puderam ser analisados, os resultados foram comparáveis àqueles obtidos para as linhagens originais, com e sem duplicação, indicando que nesses casos ocorreu, provavelmente, deleção preferencial de diversos tamanhos, nos segmentos envolvidos.

Assim, a presença da duplicação em linhagens de *A. nidulans* apresenta consequências e implicações genéticas e citológicas no desenvolvimento, mais complexas do que aquelas passíveis de observação macroscópica, apenas.

2. INTRODUÇÃO

Casos de instabilidade do material genético es
tão se tornando cada vez mais frequentes à medida que os estu
dos de genética clássica e molecular se avolumam. Modifica-
ções dessa natureza apresentam importantes conotações evolu-
tivas, ao lado de mutações e recombinações gênicas.

Os microrganismos, devido a uma série de vantaga
gens para estudos genéticos, vêm-se constituindo numa impor-
tante fonte de dados sobre instabilidade. O *A. nidulans*, além
de todas as prerrogativas inerentes a um microrganismo euca-
riótico, apresenta ciclo parassexual e certas aberrações cro-
mossômicas que resultam num sistema genético versátil para
tais estudos. Nesse fungo filamentoso, a presença de duplicaça
ões traduz-se em setores fenotipicamente distintos, os quais
são equivalentes às células somáticas de organismos superio-
res, com a vantagem adicional de permitirem manipulação gené-
tica e citológica.

O fenômeno da instabilidade mitótica tem sido relacionado com a presença de material cromossômico em excesso, fatores citoplasmáticos, transposição de segmentos duplicados, mutação, efeito de posição, entre outras causas. Ao lado disso, muitos agentes químicos e físicos podem alterar os padrões de instabilidade.

As pesquisas genéticas sobre esse fenômeno, entretanto, não vêm sendo acompanhadas na mesma velocidade por estudos citológicos e moleculares. E, apesar das dificuldades relativas ao tamanho reduzido dos cromossomos nesse fungo, faz-se necessário um melhor conhecimento das consequências da instabilidade no desenvolvimento e morfogênese, o que permitiria avaliar a extensão, o tempo e as implicações das mudanças decorrentes. Além disso, a obtenção de setores permite a detecção de aberrações, possibilita análise genética das marcas envolvidas, oferece meios para o ensaio de drogas com efeitos mutagênicos, fornece material para estudos de complementação gênica, propicia modelos para estudos de genes letais em populações em equilíbrio, além de possibilitar especulações amplas sobre causas, comportamento e implicações da instabilidade.

São, pois, objetivos desse trabalho:

a) obtenção espontânea de setores deteriorados e heterocarióticos para análise de frequência e da sua posi-

ção em relação a setores melhorados, e investigação da ação da temperatura na instabilidade.

b) desenvolvimento de metodologia adequada a estudos genéticos e citológicos de componentes letais em setores derivados da linhagem A.

c) mapeamento dos determinantes de deterioração e de letalidade (em heterocarióticos) através de análises genéticas, utilizando os ciclos sexual e parassexual.

d) análise citológica dos setores obtidos, principalmente com relação a tamanho dos conídios e núcleos, germinação, conidiogênese e crescimento das colônias.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Dentro dos objetivos propostos e devido às implicações genéticas e citológicas derivadas da instabilidade serem, muitas vezes, inseparáveis, tentar-se-á nessa revisão discutir aspectos genéticos e citológicos da instabilidade, separando-os, entretanto, apenas como recurso didático.

3.1. O fenômeno da instabilidade

3.1.1. Aspectos gerais

Atualmente, os cromossomos que eram vistos como estruturas conservadoras e fiéis na transmissão de mensagens genéticas, assumem uma nova posição de liberalidade e uma certa inconstância evidenciadas, principalmente, pela constatação de recombinações ilegítimas (atualmente sendo legitimadas pelos novos conceitos do gene, *GILBERT, 1978*), deleções, duplicações, inversões, translocações, transposições que além

de aumentarem as possibilidades de variabilidade e evolução, tornam muitos dos materiais genéticos instáveis (*NEVERS e SAEDLER, 1977*).

Entre os procariotos a adição de segmentos de DNA, estruturalmente definidos, em plasmídeos, fagos e cromossomos bacterianos, e a excisão de segmentos específicos de DNA de tais cromossomos pode representar o principal mecanismo na evolução de pro e talvez de eucariotos (*COHEN, 1976; DOOLITTLE, 1978*). Além disso, estudos comparativos dos efeitos produzidos por elementos genéticos transponíveis (transposons) em plasmídeos e em eucariotos sugerem que segmentos de DNA podem desempenhar importante papel na organização e controle da expressão da informação genética também em organismos superiores (*COHEN, 1976; REANNEY, 1976; HELINSKI, 1976; COHEN e KOPECKO, 1976*).

Certas similaridades entre transposons e elementos de inserção com outros tipos de sistemas "translocacionais" poderiam ser citadas:

a) O bacteriófago Mu-1 que causa mutação polar através de inserção no cromossomo de *E. coli*, semelhantemente aos elementos de inserção (*COHEN, 1976*).

b) "Os elementos controladores" que regulam a expressão fenotípica em milho, os quais são capazes de mobilização para vários sítios dos cromossomos (*RHOADES, 1941; McCLIN-*

TOCK, 1951, 1953, 1955, 1965; PETERSON, 1970 a, b, 1976; FINCHAM e SASTRY, 1974; COHEN e KOPECKO, 1976).

c) Transposição de um "modulador" do locus R no cromossomo 10 em milho (WILLIAMS e BRINCK, 1972).

d) "Epissomos controladores" em *Salmonella* responsáveis pela instabilidade (DAWSON e SMITH-KEARY, 1963).

e) "Elementos movimentadores" (moduladores) em milho (GREENBLATT, 1966, 1968; GREENBLATT e BRINK, 1962, 1963).

f) Inserção de sequências de DNA repetitivo associada à instabilidade genética em *Drosophila* (GREEN, 1975)

g) Transposições desempenhando importante papel na diferenciação de células formadoras de anticorpos (HIZUMI, 1976).

h) "Elementos transponíveis" no fungo *A. nidulans* (NGA e ROPER, 1968; AZEVEDO e ROPER, 1970). Nos casos apresentados a presença da duplicação não provoca apenas deleção de segmentos, mas também novas duplicações em tandem, as quais podem causar maior ou menor instabilidade, se transpostas para novos sítios de inserção.

O comportamento de tais sistemas instáveis é semelhante seja em bactéria, milho, fumo, *Drosophila*, ratos e homens. Analogias entre sistemas eucarióticos e elementos ge

néticos transponíveis encontrados em plasmídeos são ainda especulativas, mas podem ser de grande importância para a elucidação de problemas que são de complexa interpretação nos organismos superiores (COHEN, 1976). No caso especial do *A. nidulans* a inserção de elementos transponíveis pode causar letalidade, alterações morfológicas e auxotrofia e todas essas mudanças são similares às que ocorrem em outros organismos (MEZEZES e AZEVEDO, 1978).

No caso especial das duplicações elas tem sido observadas em uma variedade de loci em *E. coli*, *Salmonella* e seus bacteriófagos, em *Bacillus subtilis* e em *Diplococcus pneumoniae*. Em muitos casos, as duplicações podem ser selecionadas pelo aumento da dosagem gênica (STARLINGER, 1977). Em outros casos, as duplicações são hábeis para manterem um estado heterogenótico, apresentando efeito polar e sua distinção de recombinantes verdadeiros é possível pela sua natureza instável.

Em procariotos parece possível que cromossomos mais complexos tenham evoluído através de duplicações de pequenos cromossomos ancestrais, e fortes indicações para a ocorrência de um mecanismo de tal tipo são encontradas em *Streptomyces coelicolor* e *Escherichia coli* (ANDERSON e ROTH, 1977). Assim, o rearranjo de DNA pode ser produzido num certo tempo da evolução. Rearranjos tais como inversões tipo sobreposição podem ter ocorrido, separadas no tempo por muitas

gerações de células. Fenômeno semelhante pode ter ocorrido em eucariotos.

3.1.2. Primeiras evidências

Os primeiros estudos de mutações frequentes associadas a genes mutadores datam da época da redescoberta das leis de Mendel (EMERSON, 1914 e 1917) e os estudos subsequentes puderam evidenciar o caráter autônomo de diversos genes mutadores em *Drosophila viridis* (DEMEREK, 1941) e que conduzia a um comportamento genético instável. Outros casos de instabilidade foram descritos por McCLINTOCK (1951) em milho, surgindo dessa época o conceito de "elementos controladores". Ainda em milho GREENBLAT (1968) sugeriu que a transposição ocorria apenas na fase de replicação tanto do cromossomo quanto do elemento transponível, estando envolvidos, nesse caso, tanto a transposição quanto a duplicação. Em outros vegetais a ocorrência de setores coloridos como em *Nicotiana* (BURNS e GERSTEL, 1967), *Antirrhinum* (HARRISON, 1971; HARRISON e CARPENTER, 1977; SASTRY, 1976), milho (GAVAZZI e col., 1977) fornece um interessante sistema de visualização da instabilidade provocada por alterações qualitativas e quantitativas do material genético, apesar de não permitir o isolamento das regiões mutadas para posteriores cruzamentos e estudos genéticos.

Entre os animais atenção especial foi dada aos estudos de aberrações cromossômicas, envolvendo transposições em *Drosophila*, onde GREEN (1967, 1969, 1973) analisou a instabilidade do locus "white" relacionada à transposição de um "elemento" controlador" que provoca reversão (pela liberação de tal elemento) e instabilidade. Genes instáveis são revistos por ALDERSON (1966) em *Drosophila* e casos de instabilidade são descritos em mamíferos como o *Hamster* (HUGHES e AUSTIN, 1966) e homem (RETHORÉ e col., 1974).

Dentre os microrganismos, diversos casos de instabilidade têm sido relatados e TREFFERS e col. (1954) e GOLDSTEIN e SMOOT (1955) correlacionaram altas taxas de mutação para resistência auxotrófica em *E. coli* com genes mutadores. Em *Salmonella*, casos de instabilidade relacionados à reversão de marcas auxotróficas (DARLINGTON, 1966; KINGSMAN e col., 1978) e biossíntese de aminoácidos (RIYASATY, 1966) foram descritos. DAWSON e SMITH-KEARY (1963) sugeriram o nome de "epissomos controladores" aos elementos responsáveis pela instabilidade em *Salmonella*. Ainda em *E. coli*, instabilidade mutacional relacionada ao gene supressor "ocre" (BRIDGES e col., 1971) foi descrita. Recentemente, estudos de instabilidade tem sido realizados em *Salmonella typhimurium* (ANDERSON e ROTH, 1978), onde a presença de duplicações cromossômicas em "tandem" foi relacionada a fusão gênica e formação de novos promotores. Já em *E. coli*, EPHRATI-ELIZUS e LUTHER-DAVIES

(1977) analisaram a instabilidade fenotípica de um mutante *tip-2*, relacionada a supressão e filamentação.

3.1.3. Instabilidade em fungos

Dentre os fungos que apresentam instabilidade, a *Neurospora crassa* tem fornecido importantes informações sobre esse fenômeno e, por estar próxima filogeneticamente ao *A. nidulans* poderia ser usada como ponto de referência nessa revisão. Em 1963, *BARNETT e DeSERRES* sugeriram que, num caso de instabilidade em *Neurospora* a causa poderia ser correlacionada a mudanças do tipo transição de bases. *NEWMAYER (1965)* e *NEWMAYER e TAYLOR (1967)* analisaram instabilidade relacionada a inversão pericêntrica dando origem, através de permuta simples, a dois produtos: um duplicado e outro deficiente e letal. Duplicações relacionadas a translocações e quebras, produzindo derivativos euplóides foram observadas por *TURNER (1975, 1977)*. Mutantes que aumentam a frequência de deleções e, possivelmente da permuta, em *Neurospora* foram descritos por *NEWMAYER e GALEAZZI (1977)*. Esses mutantes foram analisados com relação à sensibilidade à luz ultra-violeta, recombinação, reparo e suas implicações no aumento da instabilidade (*NEWMAYER e GALEAZZI, 1978, NEWMAYER e col., 1978*).

Em recente revisão, *PERKINS e BARRY (1977)* fi-

zaram uma comparação do fenômeno da instabilidade entre *A. nidulans* e *Neurospora crassa*. Em ambos os casos as seguintes relações podem ser citadas:

- a) Todas as duplicações são instáveis;
- b) O material duplicado é perdido por um ou vários passos até originar haplóides efetivos;
- c) A instabilidade é aumentada por cafeína, azul de tripan, mutantes *uvr*;
- d) Um fator recessivo reduz a instabilidade.

Diferenças podem estar relacionadas à melhor adequabilidade do *A. nidulans* para esses estudos: a não afetação da fertilidade; a estabilidade do diplóide; ao tipo de crescimento e a presença de conídios uninucleados que facilitam os ensaios de instabilidade. Já em *Neurospora* o mapeamento e rearranjos produzidos por duplicações e outras aberrações podem ser facilmente detectáveis por análise citológica.

Também em *Saccharomyces* casos de instabilidade relacionados a perda de segmentos cromossômicos (HABER, 1974; CAMPBELL e col., 1975), duplicação e fusão gênica (BOLLON, 1975; HANSCHKE, 1975; HANSCHKE e col., 1978), transposição (LATEN e col., 1976) têm sido descritos.

3.1.4. Em *Aspergillus nidulans*

No caso especial de *Aspergillus nidulans* estudos de instabilidade estão, em grande parte relacionados à presença de material genético em excesso. Linhagens com um segmento cromossômico em duplicata são instáveis na mitose (BAINBRIDGE e ROPER, 1966; NGA e ROPER, 1968), sofrendo frequentes trocas intracromossômicas que podem envolver um ou ambos segmentos presentes em duplicata. Variantes melhorados surgem através de deleções e variantes deteriorados originam-se de novas duplicações em tandem, e de transposições do segmento extra para novos sítios de inserção, no mesmo ou em outro grupo de ligação (AZEVEDO e ROPER, 1970). A esse tipo de instabilidade foi dado o nome de "não conformidade mitótica" (NGA e ROPER, 1969; AZEVEDO e ROPER, 1970 e ROPER e col., 1972). Os setores originados através desse mecanismo "ganho-perda-ganho" podem ser detectados macroscopicamente em colônias de linhagens portando duplicações as quais apresentam marcadores para coloração dos esporos, o que facilita a inspeção visual.

Ao contrário do que ocorre em plantas (HARRISON e CARPENTER, 1977; GAVAZZI e col., 1977) os setores em fungos podem ser manipulados genética e citologicamente. Essa possibilidade tem permitido uma série de estudos sobre o fenômeno e correlações com fenômenos de instabilidade, transposição e

elementos de inserção em procariotos, possibilitando extrapolação para outros eucariotos (REANNEY, 1976; NEVERS e SAEDLER, 1977).

Os estudos genéticos, utilizando o *A. nidulans* iniciaram-se com ROPER (1952) e PONTECORVO e col. (1953, 1954) quando da descoberta de recombinantes mitóticos e diplóidia. A série de processos - heterocariose, diploidia, permuta mitótica, haploidização - foi denominada "ciclo parassexual" (PONTECORVO, 1954) e abriu caminho para estudos genéticos em muitas espécies de fungos imperfeitos (para maiores detalhes citam-se as revisões: ROPER, 1966; AZEVEDO, 1972, 1976; PEREIRA, 1978).

A permuta mitótica tem sido usada para mapeamento gênico e esse processo é semelhante ao descrito, pela primeira vez, em *Drosophila* (STERN, 1936). Haploidização, a qual é efetivamente semelhante a uma meiose, sem permuta (PONTECORVO e col., 1954) fornece a base para uma grande variedade de análises.

Em *Aspergillus nidulans*, além da possibilidade de ocorrência de ciclo parassexual e sexual, a presença de aberrações cromossômicas diversas tem permitido uma série de informações bioquímicas, fisiológicas, genéticas e citológicas de grande importância para estudos similares em outros eucariotos. Dentre as aberrações cromossômicas, duplicações

foram detectadas, pela primeira vez, por *PRITCHARD (1955)*, quando isolava um revertente espontâneo para adenina no grupo de ligação I. Esse revertente aparente possuía um segmento cromossômico extra translocado para o grupo de ligação II, o que tornava tal linhagem instável. Outras linhagens, com duplicação, apresentam translocações não recíprocas e *BAINBRIDGE e ROPER (1966)* observaram que do cruzamento entre certos parentais, aparentemente normais, a progênie apresentava 1/3 de anormalidade. Estava envolvida, nesse caso, uma translocação de um segmento do grupo de ligação III para o grupo VIII. Outras linhagens com duplicação têm sido obtidas com o uso de, por exemplo, radiação gama (*ALMEIDA, 1976*). Até agora, 7 a 8 linhagens com diferentes duplicações já foram obtidas e todas apresentam comportamento similar (*BAINBRIDGE e ROPER, 1966; BALL, 1967; NGA e ROPER, 1969; ROPER e col., 1972; ALMEIDA, 1976; BIRKETT e ROPER, 1977*), mas apenas 2 linhagens estão definidos suficientemente para estudos detalhados (*BIRKETT e ROPER, 1977*).

As linhagens portadoras de duplicação apresentam morfologia característica denominada "crinkled" (enrugada) e a taxa de crescimento e conidiação são, em geral, reduzidas (*NGA e ROPER, 1968*). Além disso, produzem setores conspícuos e manipuláveis do ponto de vista genético e citológico. Apenas em um caso (*ALMEIDA, 1976*) linhagens com duplicação não apresentaram morfologia "crinkled".

Os setores obtidos da linhagem com duplicação (I - II) podem ser dos seguintes tipos:

a) Melhorados (de coloração amarela ou verde, dependendo do segmento deletado estar nos grupos de ligação I ou II), os quais são estáveis e com crescimento melhor do que a linhagem original (*NGA e ROPER, 1968*);

b) Deteriorados (com várias nuances de coloração), com graus de instabilidade maior ou menor do que a linhagem original, os quais podem surgir de inversões, novas duplicações em tandem e transposições do segmento duplicado (*NGA e ROPER, 1968; AZEVEDO e ROPER, 1970*). A ocorrência de setores deteriorados em linhagens duplicadas foi relacionada à presença de duplicação em tandem (*AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971*). Assim, era esperado que ocorresse setor deteriorado ao lado de setor não deteriorado. Em alguns casos verificou-se a ocorrência de "twin spots" (setores gêmeos), mas em outros a ausência de um dos dois setores poderia ser explicada por letalidade do melhorado por deleção, ou inviabilidade do deteriorado. Dos setores obtidos, 31 foram analisados através do ciclo parassexual, localizando-se em quase todos os grupos de ligação. *ROSATO (1973)* se propôs a obter variantes melhorados, através da eliminação de material genético extra de linhagens deterioradas, utilizando acriflavina, além da indução de instabilidade com o uso de EMS. Os derivados morfológicos obtidos foram analisados geneticamente. *ZUCCHI (1975)*

analisou diversos deteriorados obtidos espontaneamente de uma linhagem portadora de duplicação. *MENEZES (1974)* utilizou luz ultra-violeta e DNA exógeno na obtenção de variantes deteriorados, os quais foram analisados geneticamente, além de serem conduzidos estudos de reversão. *ALMEIDA (1976)* obteve linhagens com duplicações cromossômicas através da radiação gama e *PAES DE BARROS (1977)* analisou um variante deteriorado, genética e citologicamente, concluindo que a presença da duplicação altera o diâmetro e volume dos núcleos conidiais implicados.

FAVRAUD (em publicação) vem analisando novos setores de deteriorados obtidos espontaneamente da linhagem A.

Entretanto, para facilitar o acompanhamento desses trabalhos, um resumo dos variantes deteriorados já estudados, sua origem, localização e autores está apresentado na Tabela 1.

c) Setores heterocarióticos, de rara ocorrência apresentando uma mistura não usual de cabeças de conídios amarelos e de conídios verdes e uma alta proporção de cabeças individuais contendo tanto conídios verdes quanto amarelos (*ROPER e NGA, 1969*).

Tabela 1 - Variantes deteriorados, origem, localização e respectivos autores em *Aspergillus nidulans*.

Varian- te	Linhagem original	Tratamento	Grupo de ligação	Autores
a*) V ₅	A (NGA e RO- PER, 1968)	espontâneo	VIII	AZEVEDO e ROPER, 1970
V ₆			Deleção no I	
V ₈			IV	
V ₉			III	
V ₁₀			VII	
V ₁₁			V	
V ₁₂			Deleção no I	
V ₁₃			VIII	
V ₁₈			IV	
V ₁₉			III	
V ₂₀			VIII	
V ₂₁			V	
V ₂₂			I	
V ₁₄	A	espontâneo	Muito ins- táveis pa- ra análise	AZEVEDO e ROPER, 1970
V ₂₃				
V ₂₄				
V ₁	B (NGA e RO- PER, 1968)	espontâneo	V	AZEVEDO e ROPER, 1970
V ₂			II - I	
V ₃			II - I	
V ₄			II - I	
V ₇			II - I	
V ₁₅			IV	
V ₁₆			VI	
V ₁₇			VII	

- Continua-

Tabela 1 - Continuação.

Varian- te	Linhagem original	Tratamento	Grupo de ligação	Autores
b*) V ₂₅	B	espontâneo	VI - IV - I	<i>AZEVEDO, 1971</i>
V ₂₆	A	espontâneo	III	<i>AZEVEDO, 1971</i>
V ₂₇			VIII	
V ₂₈			I	
V ₂₉			VIII	
V ₃₀			II	
V ₃₁			II	
V ₃₂			III	
c) V ₃₃	A	EMS	VIII	<i>ROSATO, 1973</i>
V ₃₄	A	EMS	VIII	
V _{3.4}	V ₃	Acriflavina	II	
V _{5.3}	V ₅	EMS	VI ou VII	
V _{8.2}	V ₈	EMS	VII	
V _{8.3}	V ₈	EMS	I ou VII	
V _{9.6}	V ₉	EMS	VII	
V _{9.7}	V ₉	EMS	III e VI	
d) V ₃₅	A	espontâneo	VIII	<i>MENEZES, 1974</i>
V ₃₆			I	
V _{36.1}			IV	
V _{36.1.1}			I	
V ₃₇			VII	
V _{37.1}			I	
V ₃₈			VIII	

- Continua -

Tabela 1 - Continuação.

Varian- tes	Linhagem original	Tratamento	Grupo de ligação	Autores
d) V _{38.2}			IV	
V ₃₉			V	
V _{39.1}			I	
V ₄₀			V	
V ₄₁	A	U.V.	I	MENEZES, 1974
V ₄₂			III	
V ₄₃			III	
V ₄₄			I, II e V	
V _{44.1}			VI	
V ₄₅			I	
e) C ₃	C (BAINBRIDGE e ROPER, 1966)	espontâneo	III	ZUCCHI, 1975
C ₄			Não detectado	
C ₇			II	
C ₈			I (VIII)	
C _{8.1}			I	
C _{8.1.1}			I e III	
C _{8.1.2}			I	
C _{8.2}			I	
C _{8.2.2}			I	
C _{8.4}			Não detectado	
D ₁	D (BRAINBRIDGE e ROPER, 1966)	espontâneo	V	
D _{1.3}			I, III, IV (V)	
D ₂			VI, VII	
D ₃			Não detectado	

- Continua -

Tabela 1 - Continuação.

Varian- tes	Linhagem original	Tratamento	Grupo de ligação	Autores
D ₄			III	
D ₄ .1			Não detectado	
D ₄ .2			I, III, V	
f) V ₄₆	A	espontâneo	I	PAES DE BARROS, 1977

Observação: a* e b* - Os derivativos dos variantes apresentados por AZEVEDO e ROPER (1970) e AZEVEDO (1971) não estão discriminados na Tabela 1 devido ao seu grande número (para maiores detalhes - Ver AZEVEDO, 1971).

O primeiro setor heterocariótico contendo conídios amarelos letais, potencialmente hipohaplóides, foi detectado numa colônia proveniente da linhagem A crescida em meio completo. Quando semeados nesse meio, conídios desse setor originavam apenas colônias verdes, embora 400 conídios amarelos tivessem sido inoculados. Nenhuma colônia amarela foi obtida, mesmo variando-se os meios e as temperaturas de incubação. Dificuldades de manutenção permitiram que apenas a componente verde de um heterocariótico fosse analisado geneticamente, e seu comportamento frente à instabilidade e altera

ções morfológicas foram idênticos à linhagem A original (ROPER e NGA, 1969). Para se analisar o componente amarelo letal uma técnica especial foi desenvolvida comparável a de AZEVEDO e ROPEF (1970). Essa técnica, utilizou a propriedade de inibição do crescimento da linhagem A pelo *pFA* (NGA e ROPEF, 1968) e só permitiu o crescimento de heterocário entre MSE e amarelo letal. Dentre seis tentativas, apenas um caso de heterocário balanceado, entre MSE e amarelo letal, foi obtido. Dos ascósporos provenientes de cleistotécios, contaram-se 232 colônias brancas e 214 amarelas, todas de morfologia normal, fato este que confirmou a deleção do alelo y^+ na linhagem contendo o amarelo letal. Todos os segregantes foram biotina - independentes, mostrando que a deleção incluiu o alelo bi. Entretanto, quando parte do segmento duplicado permaneceu nos variantes amarelos de A, um cruzamento com a linhagem MSE deu, por recombinação, segregantes "crinkled". A ausência de tais segregantes mostrou que a linhagem amarelo letal perdeu esta região. Em meio completo com *pFA*, diplóides amarelo letal// MSE originaram apenas setores brancos haplóides, não ocorrendo translocações. Sendo o cromossomo de *Aspergillus nidulans* muito pequeno (PONTECORVO e col., 1953; ELLIOT, 1960) não foi possível detecção microscópica da deleção, mas os resultados combinados de análise mitótica e meioótica deixaram poucas dúvidas sobre a natureza hipohaplóide do amarelo letal (ROPER e NGA, 1969). Na mesma referência, aliás aqui citada de forma extensiva devido sua raridade e importân

cia comparativa com o presente trabalho, os autores utilizaram a mesma técnica para a linhagem duplicada B (NGA e ROPER, 1968). Os setores heterocarióticos obtidos foram de menor frequência, mais instáveis e com morfologia anormal, quando comparados a similares da linhagem A. A partir de diplóides, derivados do cruzamento entre as linhagens A e MSF obtiveram-se setores diplóides, hiperdiplóides e hipodiplóides. Em todos os casos foi mostrado que a deleção atingiu toda, parte ou mais do que o segmento duplicado, produzindo, desse modo, os hipohaplóides e hipodiplóides. A ocorrência de hipohaplóides explicaria alguns casos de variação fenotípica, que poderiam ser correlacionados com variação por efeito de posição (ROPER e NGA, 1969; CLUTTERBUCK, 1970b).

Estudos de letais em *Aspergillus nidulans*, não relacionados a setores heterocarióticos, têm sido conduzidos através do sistema de letais balanceados (TECTOR e KÄFFER, 1962; KÄFFER e CHEN, 1964; AZEVEDO e ROPER, 1967; ROPER e NGA, 1969; PIZZIRANI, 1977).

Através da introdução de técnicas adequadas, um número cada vez maior de mutações letais está sendo analisado, e em organismos superiores são importantes tanto para a estimativa de taxas de mutação, quanto para estudos de genética do desenvolvimento e, além disso, diferentes mutações letais, sob a forma de sistemas balanceados, podem ser utili-

zadas para fins industriais (ROPER e AZEVEDO, 1967; BALL e AZEVEDO, 1976; PIZZIRANI, 1977; BONATELLI Jr., 1977).

Um outro tipo de variante que ocorre naturalmente, em *Aspergillus nidulans*, é o "fluffy" (cotonoso). Apresenta-se com excessivo micélio aéreo e é observado especialmente em culturas provenientes de confídios velhos (GROSE e CLUTTERBUCK, 1975). São fenotipicamente semelhantes àqueles descritos por ROPER (1958) como miceliais, os quais transferem sua característica para outras linhagens, sendo esta capacidade diminuída com o tempo. Eventualmente, as linhagens miceliais parecem perder sua habilidade de transferência (ROPER, não publicado). Esse comportamento foi relacionado a fatores citoplasmáticos e à presença de plasmídeos transmissíveis (PETERSON, 1970), mapeáveis como um gene nuclear em seu estado cromossomal. Já DORN (1970) isolou mutantes "fluffy" e relacionou-os a genes cromossomais, embora DORN e col. (1967) tenham relatado, previamente, a possibilidade da condição "fluffy" ser transferida, entre linhagens, através do heterocario. Além disso, estes mutantes apresentam a propriedade de serem reparados, fenotipicamente, por vários inibidores da síntese de ácidos nucleicos e proteínas, verificando-se especificidade de inibidores para certos mutantes. Os mutantes "fluffy" comportam-se, muitas vezes, como invasivos de colô-

nias normais, sugerindo-se talvez uma insensitividade a mecanismos normais de auto-inibição, a qual previne crescimento micelial irregular (CLUTTERBUCK, 1977). Alguns desses mutantes têm sido relacionados com genes recessivos nucleares (BALL e AZEVEDO, 1964), já aqueles estudados por DORN e col. (1967) e DORN (1970) apresentaram-se como invasivos e dominantes, em alguns casos, sendo especulativamente relacionados a genes citoplasmáticos ou infecção por vírus em adição a fatores nucleares, fato este comparável ao que ocorre com certos processos cancerígenos. Esses variantes podem fornecer importantes informações sobre processos bioquímicos e mecanismos controladores da diferenciação, além disso, em muitos casos, variantes "fluffy" e miceliais estão relacionados à ocorrência de instabilidade em certas linhagens de *A. nidulans*.

3.1.5. Fatores que afetam a instabilidade.

Mudanças ambientais tais como a presença de certas drogas no meio de cultura, agentes mutagênicos físicos e químicos, tanto em linhagens diplóides quanto em linhagens portadoras de duplicação, podem alterar os padrões de instabilidade em *Aspergillus nidulans*.

Em 1970, COOKE e col. utilizaram o azul de tripan e verificaram que ocorria um aumento da instabilidade

em linhagens com duplicação. *PALMER e ROPER (1970)* analisaram o comportamento da instabilidade frente à diferentes drogas: a) cafeína, a qual induziu quebras e previniu reparos de lesões espontâneas; b) atebrina, que aumentou significativamente a frequência de setores amarelos, os quais surgem por deleção no segmento translocado, sendo que a droga mostrou-se mais ativa em meio completo do que em meio mínimo suplementado pelos requisitos essenciais; c) verde malaquita, que também aumentou o número de setores amarelos após 8 dias de incubação. Entretanto, outros compostos não aumentaram, significativamente, a frequência de setores: ciclohexamida, 6-aminonicotinamida, metano, acriflavina e cristal violeta.

LEE e NGA (1973) utilizaram o trimetilbenzeno antraceno e obtiveram linhagens instáveis com presença de translocação (VI - VIII) responsável por uma alta produção de cleistotécios. A ação da acriflavina e etilmetano sulfonato (EMS) sobre a instabilidade de linhagens com duplicação foi analisada por *ROSATO (1973)*.

Algumas drogas usadas como fungicidas mostram-se efetivas na alteração da instabilidade quando usadas em diplóides e linhagens com duplicação. Assim o benlate (*HASTIE, 1970*), não apenas aumentou a frequência de segregantes, mas especialmente a de segregantes haplóides e seu comportamento foi similar ao da *p*-fluorfenilalanina (*MORPURGO, 1961*). O benzimidazole e o tiofanato (*KAPPAS e col., 1973*) induziram insta-

bilidade em diplóides de *A. nidulans*. Utilizando o cloroneb e o vitavax (AZEVEDO e col., 1977) verificaram que o cloroneb aumentou a instabilidade enquanto o vitavax reduziu-a, mostrando ação diferencial sobre o material duplicado.

Outras drogas como o hidrato de cloral (MERCER e MORRIS, 1975; SINGH e SINHA, 1976), griseofulvina (KAPPAS e GEORGOPOULOS, 1974) interferem na divisão e recombinação mitóticas, influenciando indiretamente na instabilidade. O brometo de etídio (BONATELLI Jr. e AZEVEDO, 1977) age reduzindo o número de setores produzidos por linhagens portadoras de duplicação e em diplóides. O mecanismo de atuação do E.B. é, possivelmente, ao nível de DNA mitocondrial, através da inibição da respiração, e podendo alterar ainda a haploidização e permuta mitóticas. A cumarina aumentou a instabilidade em linhagens com duplicação, através de deleção preferencial do segmento translocado (MAJERFELD e ROPER, 1978a).

A ação de mutagênicos físicos também é importante para estudos de instabilidade e, em 1968, NGA utilizando radiação gama verificou a ocorrência de várias translocações em linhagens de *A. nidulans*, as quais mantiveram-se morfolologicamente normais e estáveis. AZEVEDO (1975) selecionou dois variantes obtidos após irradiação com ultra-violeta, sendo um mais estável e o outro mais instável que a linhagem original. O mais instável apresentou uma translocação e o mais estável, um determinante de estabilidade localizado no grupo

de ligação VIII. *PARAG e ROPER (1975)* obtiveram alta instabilidade em linhagens portando duplicações (I - II), após tratamento com luz ultra-violeta. *MENEZES (1974)* verificou que ultra-violeta e DNA exógeno alteram o padrão da instabilidade, sendo que o DNA comporta-se como um agente mutagênico. *ALMEIDA (1976)* obteve linhagens com duplicações através do uso de raios gama, ocorrendo alta incidência de translocações. Trabalhos recentes como o de *MAJERFELD e ROPER (1978b)* mostram o efeito de dose de produtos de genes *uvr* em linhagens com duplicações em *A. nidulans*.

A presença da duplicação, aliada à ocorrência de mutação (*PARAG, 1977*) afeta a recombinação mitótica em *A. nidulans* e apresenta efeito profundo na permutação em diplóides. *VAN de VATE e JANSEN (1978)* observaram que o aumento da taxa de recombinação é atribuído às mesmas lesões que são responsáveis pela ocorrência de deleções em linhagens com duplicações em *A. nidulans*. Esses dados sugerem que fatores genéticos também podem alterar os padrões de instabilidade em linhagens portadoras de segmentos cromossômicos em duplicata.

A ação da temperatura na instabilidade de linhagens com duplicação, em *A. nidulans*, tem sido pouco investigada. *LIEBER (1976)* apresentou alguns dados mostrando que a frequência de deleções no cromossomo III (portando duplicação) é grandemente influenciada por baixas temperaturas enquan

to no cromossomo I (também com segmento cromossômico em duplicata) é influenciada por altas temperaturas; esses resultados poderiam ser correlacionados à existência de instabilidade e mutabilidade em outros organismos e, devido a escassez de dados comparativos em *A. nidulans*, seria interessante citá-los aqui. Entre os vegetais, que apresentam expressão fenotípica da instabilidade através da produção de setores nas flores, por exemplo, o fenômeno já foi visto em *Portulaca grandiflora* (FABERGE e BEALE, 1941), em *Nicotiana langsdorffii* e *N. sanderae* (SAND, 1957), em *Antirrhinum majus* (HARRISON e FINCHAM, 1964), em milho (RHOADES, 1941; PETERSON, 1952, 1976), nos quais a variação na temperatura aumentou o número de setores. Em animais, MÜLLER (1928) analisou taxas de mutação em *Drosophila*, sua variabilidade e dependência da temperatura. GOWEN e GAY (1933) estudaram o efeito da temperatura na cor dos olhos de *Drosophila melanogaster*. TIMOFÉEFF-RESSOUSKY e col. (1935) mostraram que em *Drosophila* mutações letais, ligadas ao sexo, ocorrem mais frequentemente em altas temperaturas. Ainda em *Drosophila*, DEMEREC (1932) analisou o gene instável miniatura 3-gamma frente a diferentes temperaturas, não detectando diferenças perceptíveis quanto à taxa de mutação, e HOUSE (1955) estudou a influência da temperatura na expressão gênica.

3.1.6. Da natureza da instabilidade

Apesar dos vários estudos do comportamento da instabilidade frente a diferentes fatores físicos, químicos e genéticos, ainda há especulações sobre a sua natureza. *KÄFFER (1961)* relacionou sua maior ocorrência em confídios aneuplóides, a perdas sucessivas do material genético em excesso até voltar ao estado haplóide. Através de permuta mitótica podem surgir setores diplóides, de genótipo diferente, e também setores haplóides (*ROPER, 1952*) e, devido à presença do material duplicado poderia ocorrer uma distribuição irregular dos cromossomos na mitose (*PONTECORVO e col., 1954*).

A presença de fatores citoplasmáticos foi correlacionada à instabilidade e, nesse caso a presença de partículas citoplasmáticas (*ARLETT e col., 1962*) ou alterações em organelas-sedes de DNA extracromossômica, tais como mitocôndrias (*ROSATO, 1977*) provocariam instabilidade. *BALL (1967)* relacionou a genes supressores casos de instabilidade em *A. nidulans*.

NGA e ROPER (1966) sugeriram que perda terminal, mutação, permuta mitótica e permuta desigual entre cromátides irmãs poderiam explicar o fenômeno. Os mesmos autores em 1969, estudando uma linhagem que apresentava um segmento cromossômico em duplicata, evidenciaram que o não balanceamento cromossômico era o responsável pela instabilidade, sendo

que as deleções seriam restritas à região duplicada. Com a descoberta dos hipohaplóides em 1969 (*ROPER e MGA*) ficou evidenciado, entretanto, que as deleções podiam atingir mais do que a região duplicada.

AZEVEDO (1971) e AZEVEDO e ROPER (1970) relacionaram a instabilidade, em linhagens com duplicação, à ocorrência de novas duplicações em tandem e transposições dos segmentos cromossômicos. Já *CASE e ROPER (1975)* mostraram que a maioria dos casos de instabilidade em diplóides não balanceados relaciona-se à permuta mitótica. Em diplóides homozigotos, para uma linhagem com duplicação, a permuta mitótica não elimina material em excesso, entretanto tais diplóides apresentam-se muito instáveis (*CASE e ROPER, não publicado*). Setores provenientes de tais diplóides, quando analisados, mostraram-se quantitativamente próximos ao diplóide e com configuração de translocação homozigota. Assim, a linhagem A e seu correspondente diplóide diferem tanto na instabilidade quanto na distribuição relativa das quebras (*BIRKETT e ROPER, 1977*).

Segundo *BIRKETT e ROPER (1977)* o processo da instabilidade envolve dois aspectos:

a) As deleções surgem via lesões no DNA muitas das quais são reparáveis. A redução do reparo pela cafeína, ultra-violeta ou por mutações poderia dar uma impressão mais acurada da incidência de erros iniciais.

b) Os produtos da instabilidade que representam um quadro complexo do fenômeno. Alguns desses variantes acumularam mutações sucessivas em todos os grupos de ligação afetando a morfologia e a estabilidade; outros produzem dissômos; outros ainda podem gerar letais recessivos, quando no estado diplóide, podendo estar envolvida, ainda, transposição de segmentos cromossômicos.

As principais dificuldades referem-se à aparente diversidade dos processos envolvidos e às dúvidas sobre a natureza de muitos dos eventos iniciais ~~da~~ instabilidade. Atualmente, entretanto, setores deteriorados de linhagem com duplicação (III - VIII) vêm sendo estudados e isto tem possibilitado definir os eventos iniciais, mostrando a relação entre os tipos altamente instáveis de famílias individuais (*BIRKETT e ROPER, não publicado*). Além disso, recentemente, os estudos com elementos transponíveis e sua correlação com o locus "Sticky" em *A. nidulans* poderiam correlacionar permutas entre sequência de DNA palindrômico e normal em linhagens com duplicação (*BIRKETT e ROPER, 1977*).

3.2. Instabilidade: suas implicações

O fenômeno da instabilidade, principalmente relacionado à presença de duplicação, apresenta uma série de implicações genéticas que redundam em alterações morfológicas,

citológicas e moleculares, as quais devem afetar o desenvolvimento e comportamento do *Aspergillus nidulans*. Serão abordadas aqui algumas dessas implicações as quais estão relacionadas diretamente com o presente trabalho.

3.2.1. Aspectos gerais

Considerando-se as mudanças para o desenvolvimento como processos morfogenéticos, com complexidades variáveis, pode-se distinguir duas fases distintas (TURIAN, 1966) em Ascomicetos, em geral:

a) Inicial, com processos morfogenéticos simplificativos, correspondendo à germinação de esporos. Essa fase é caracterizada pela transição morfológica de um esporo diferenciado para um estágio de rápida desdiferenciação, do qual surge o tubo germinal e, conseqüentemente a primeira hifa vegetativa.

b) Final, com processos morfogenéticos elaborados, correspondendo ao fenômeno reprodutivo da formação do esporo. Essa fase é iniciada pela transição fisiológica do estado vegetativo para o reprodutivo, originando conídios ou ascósporos.

Essas duas fases delimitam o ciclo vital do fungo definido como um desenvolvimento de esporo a esporo, sepa-

rado por períodos mais ou menos prolongados de crescimento micelial. Durante esse período intermediário, estruturas peculiares, tais como oídios, esclerócios, etc., podem ser formadas em alguns Ascomícetos. "Estudos de morfogênese não têm sido encarados como um importante campo de pesquisa e as estruturas reprodutivas têm sido analisadas apenas no campo da morfologia, sendo que os aspectos bioquímicos e fisiológicos do processo são ainda, praticamente desconhecidos" (TURIAN, 1966). Apesar de, atualmente, alguns Ascomícetos já estarem sendo investigados morfologicamente, FOSTER, ainda em 1949, afirmava que "a era moderna do estudo de metabolismo em fungos está apenas começando, mas os sinais de uma imensa vantagem nas numerosas fases desse campo são inequívocos. Sua importância é reconhecida prática e academicamente". Esse panorama está um tanto mudado e, em 1977, BULL e TRINCI afirmaram que "os fungos são, inquestionavelmente, os organismos de escolha para estudos de numerosos aspectos da bioquímica microbiana, sendo necessário considerar-se, entretanto, sua extrema diversidade morfológica e plasticidade, sua capacidade biossintética e sua utilidade como sistema modelo para análises bioquímicas, do comportamento sexual, diferenciação, e efeitos da idade". Apesar disso, o conhecimento da bioquímica em fungos é ainda fragmentário, enquanto em bactérias referências sobre investigação da fisiologia do crescimento, são numerosas. Duas causas, para essa discrepância, são apontadas pelos mesmos autores: falta de análises adequadas do modo de crescimento dos

fungos e dificuldades técnicas para o acompanhamento do crescimento micelial.

Em *Neurospora* (MISHRA, 1977, mais recentemente) e especificamente em *Aspergillus nidulans* (TRINCI, 1969, 1971; BAINBRIDGE, 1976; BAINBRIDGE e TRINCI, 1969; BULL, 1970; BULL e CARTER, 1973; ZONNEVELD e col., 1977; MARTINELLI e BAINBRIDGE, 1974; CLUTTERBUCK, 1973, entre muitos outros) vem sendo investigados aspectos do desenvolvimento, da bioquímica e morfogênese.

Entretanto, no caso especial de linhagens portando duplicações e portanto, instáveis, quase nada se sabe com respeito a alterações morfológicas, citológicas e bioquímicas.

3.2.2. Alterações na morfologia das colônias

No caso especial de *Aspergillus nidulans*, a presença de segmentos cromossômicos em duplicata, tem sido relacionada a alterações da morfologia das colônias tanto da linhagem original como de seus variantes e derivativos, que ainda mantêm a duplicação. Tanto a forma da colônia, quanto as taxas de crescimento e conidiação, são alteradas, quando comparadas às linhagens haplóides padrões (BAINBRIDGE e ROPER, 1966; NGA e ROPER, 1968). Todas as linhagens portadoras de

duplicação, já analisadas, apresentam uma morfologia "crinkled" característica, exceto algumas das linhagens obtidas por ALMEIDA (1976). De 32 variantes deteriorados analisados por AZEVEDO e ROPER (1970) e AZEVEDO (1971) várias alterações foram observadas, tais como: a) efeito da temperatura na pigmentação e conidiação, em diversos graus nos variantes e linhagens duplicadas, enquanto no controle não se observou tal fenômeno; b) taxas de conidiação alteradas, na maioria dos variantes analisados, quando comparados com um controle não duplicado; c) pigmentação alterada na maioria dos variantes, mas não nas linhagens originais com e sem duplicação; d) ausência de cleistotécios, ou reduzida formação em grande parte dos variantes observados, sendo em 5 casos constatada a ocorrência de alta produção dessas estruturas; e) bordos da colônia, em alguns casos, alterados e irregulares.

LACAVA (1973), utilizando radiação gama obteve mutantes com morfologia alterada que foram relacionados à presença de translocações. MENEZES (1974) ao analisar variantes deteriorados originados de linhagem portando duplicação constatou também alterações na coloração e taxa de conidiação. ROSATO (1973) obteve variantes de morfologia alterada, ao utilizar EMS e acriflavina em linhagens com duplicação.

Recentemente, alterações na morfologia de colônias em *Aspergillus nidulans* e em outros fungos foram revisitas amplamente por ROSATO (1977) e BIAGI (1977).

O *Aspergillus nidulans* completa seu ciclo assexual em 1 dia (AXEROLD, 1972) e, em linhas gerais, a diferenciação da colônia inicia-se com o aumento do micélio até formar uma colônia madura, a qual estende-se no substrato de maneira radial. A diferenciação ocorre, provavelmente, como uma resposta direta às mudanças induzidas no meio pelo crescimento do fungo (COCHRANE, 1958). Colônias maduras podem ser divididas em quatro zonas morfológicas distintas (YANAGITA e KOGANÉ, 1962): a) zona de extensão (semelhante à zona periférica de crescimento - TRINCI, 1971). Nela são observadas hifas vegetativas sem micélio aéreo; b) zona produtora - apresentando denso micélio suportando hifas aéreas; c) zona de frutificação, onde as estruturas reprodutivas sexuais e assexuais são formadas; d) a zona "aged" (velha) a qual é formada por hifas autolisadas e que ficam no centro da colônia. Embora tais zonas possam ser reconhecidas, há uma diferenciação contínua da periferia para o centro da colônia.

A aparência individual das colônias e a morfologia microscópica das hifas pode ser profundamente alterada por ~~variações~~ na composição do meio, onde ocorre o crescimento. A produção de estruturas especiais, vegetativas ou reprodutivas, a iniciação e abundância de corpos de frutificação, assim como a presença de pigmentação são frequentemente dependentes de fatores nutricionais tais como fontes de nitrogênio e carbono, concentração de nutrientes e pH do meio. Além disso, a

reprodução sexuada é controlada por hormônios endógenos específicos. O crescimento do fungo e a produção de esporos podem ser afetados por várias substâncias tais como compostos orgânicos voláteis, fungicidas, antibióticos e inibidores metabólicos, que em concentrações adequadas, modificam o crescimento e desenvolvimento do fungo (para maiores detalhes ver revisão de *RICHMOND*, 1975).

Assim, com tantas variáveis alterando fenotipicamente a morfologia de colônias e de seus elementos constituintes, não é surpreendente que a presença de material genético em duplicata possa alterar o metabolismo do fungo e, conseqüentemente, das estruturas que dele dependem. Devido à importância que as aberrações cromossômicas representam para estudos de morfogênese, em fungos e em outros eucariotos, estudos mais acurados são, cada vez mais, necessários.

3.2.3. Na conidiogênese

A iniciação da conidiação em linhagens selvagens de *Aspergillus nidulans* possui uma série de possíveis caminhos a serem seguidos; ou permanece com crescimento puramente micelial, ou pode concentrar-se na reprodução sexual ou ainda pode conidiar. Muitos mutantes e variantes analisados apresentam, em excesso, uma dessas alternativas, com a inevitável redução das demais (*CLUTTERBUCK*, 1977). O ponto de de-

cisão para o início da conidiação parece estar em torno de 20 horas de crescimento a 36°C, tanto para conídios incubados em ágar quanto para micélio crescido em meio de cultura líquido (AXEROLD, 1972; AXEROLD e col., 1973). Antes desse tempo, nenhum estímulo produz conidiação, mas após o período de 20 horas o micélio já é competente para receber estímulo e iniciar o processo. Entretanto, GEALT e AXEROLD (1974) isolaram um mutante com competência precoce para conidiar, sendo que mutantes similares foram isolados por CLUTTERBUCK (não publicado). A exposição a certos gases estimula, eficientemente, a conidiação, mas a ausência de fontes de carbono ou nitrogênio pode permitir a conidiação em culturas submersas (SAXENA e SINHA, 1973; MARTINELLI, 1976).

A natureza da competência é ainda desconhecida, mas GEALT e AXEROLD (1974) mostraram que sua aquisição é acompanhada por uma redução significativa de níveis de nitrato reductase e protease extracelular, enzimas estas que não têm conexão óbvia com a conidiação. Outras substâncias parecem estar envolvidas com o início da conidiação como a adenosina 3' - 5' monofosfato cíclico (CLUTTERBUCK, 1975), a adenil ciclase que relaciona-se com conidiação prematura em *Neurospora* (TERENZI e col., 1976). A adição de adenil ciclase em *A. nidulans* resultou, entretanto, em inibição da conidiação (CLUTTERBUCK, não publicado). Já PASTUSHOK e AXEROLD (1976) sugerem que um controle genético endógeno é que determina o iní

cio da conidiação.

ZONNEVELD (1974) examinou diversos mutantes que apresentavam variação na produção de cleistotécio, e cujas taxas eram inversamente proporcionais à conidiação, fato este relacionado à metabolização do glucano em glucanase durante a reprodução sexual.

CLUTTERBUCK (1969a), MARTINELLI e CLUTTERBUCK (1971), e ZONNEVELD (1974) investigaram mutantes defectivos em vários estágios da conidiação. Com relação a esses mutantes, uma sinópsse atualizada e completa encontra-se na recente revisão de BIAGI (1977).

Em linhas gerais, a diferenciação da estrutura conidial inicia-se a partir de uma hifa especial, a célula podal, a qual desenvolve-se como um eixo, em geral longo, espesso e pigmentado, o qual termina por uma dilatação, que no caso do *Aspergillus nidulans* é uma vesícula globosa característica (RAPER e FENNEL, 1973). Dessa vesícula surgem os brotos e, após mitoses sucessivas dos núcleos da vesícula, os núcleos originados migram para os esterígmata primários, os quais dão origem aos esterígmata secundários. Desse modo, o núcleo contido no esteríigma secundário provém de divisão do núcleo do esteríigma primário. Os conídios são formados a partir dos esterígmata secundários, através de divisões sucessivas de um único núcleo. Os conídios formados são esféricos e verdes, no

caso de linhagens selvagens, e formam longas cadeias paralelas, sendo que cada cabeça conidial pode apresentar cerca de 100 cadeias (ROPER, 1971). Assim os conidióforos e vesículas são multinucleados enquanto os esterígmias e conídios são uninucleados (PONTECORVO e col., 1953; CLUTTERBUCK, 1969a; MARTINELLI, 1976). Entretanto, foi detectada a presença de conídios binucleados em uma linhagem de *A. nidulans* (PIZZIRANI, 1977).

Quanto à genética da conidiação, MARTINELLI e CLUTTERBUCK (1971), analisando um grande número de mutantes, tentaram classificá-los de acordo com o estágio do desenvolvimento afetado basicamente, e a partir daí estimaram o número de loci envolvidos na conidiação, sendo esse número em torno de 300 a 500 genes. A grande maioria dos mutantes defectivos na conidiação também apresentou anomalias no desenvolvimento hifal. Entretanto, a exclusão de todos os mutantes de crescimento lento reduziu o número de loci estimados para a conidiação em 45 a 150 (CLUTTERBUCK, 1977). A maioria desses loci parece estar relacionada com processos muito complexos envolvendo a escolha inicial do tipo de desenvolvimento a ser seguido pelo fungo. Além disso, muitos dos mutantes analisados são oligosporogênicos, às vezes temperatura sensíveis, e parece que as funções de muitos dos loci envolvidos são apenas requeridas durante o crescimento em altas temperaturas.

Na coleção de mutantes de CLUTTERBUCK (1969a,

1970, 1972, 1973, 1975), uma grande variedade de bloqueios es tá presente: desde mutantes que são inábeis para iniciar a co nidiação, até aqueles que chegam a produzir conidióforos mas a formação de vesícula é bloqueada. Da análise de todos eles, o autor concluiu que apenas dois fenótipos foram encontrados resultando de mutação em um locus simples. Um deles é o locus "bristle", que origina mutantes com conidióforo muito mais longo do que o normal, falhando na diferenciação de vesículas e estruturas derivadas. O outro locus é o "abacus" e os mutantes originados produzem estruturas em forma de varas que são interpretadas como esterígmas secundários repetitivos. Mutantes similares já foram isolados em outras espécies de *Aspergillus* e outros fungos (YUILL e YUILL, 1938; RAPER e FENNEL, 1953; VUJICIC e col., 1973). Tanto o locus "bristle" quanto o "abacus" podem ser classificados como morfogenéticos ou "táticos" (CLUTTERBUCK, 1977).

Um fato interessante foi observado por CLUTTERBUCK (1970) o qual relacionou a presença de translocação, cujo ponto de quebra foi detectado estar muito próximo do locus *brlA*, originando fenótipo variegado, com coexistência de estruturas normais e anômalas, levando à suspeita da ocorrência de variação por efeito de posição. Enquanto a detecção da cromatina em fungos é dificultada pelo reduzido tamanho do núcleo, as implicações de variação por efeito de posição são relacionadas à presença de cromatina inativa capaz de esten-

der sua inativação à regiões adjacentes e isto, junto com a demonstração da presença de histonas em *Aspergillus nidulans* (FELDEN e col., 1976) vem confirmar a estrutura cromossômica eucariótica e complexa neste fungo (CLUTTERBUCK, 1977). O isolamento de histonas já havia sido confirmado em *Neurospora*, anteriormente (HSIANG e COLE, 1973).

As enzimas envolvidas na diferenciação e desenvolvimento da estrutura conidial são a laccase ou *p*-diphenol oxidase (CLUTTERBUCK, 1973), relacionada à coloração dos conídios, e a cresolase (CLUTTERBUCK, 1973), responsável pela pigmentação de conidióforos e esterígmas.

Uma série de fatores influem na formação, desenvolvimento e coloração de conídios e conidióforos: a) temperatura (KILBEY, 1963; TRINCI, 1969; CLUTTERBUCK, 1969a, 1970b; AXEROLD, 1972; MARTINELLI, 1972, 1976); b) pH (KILBEY, 1963; CLUTTERBUCK, 1972; MARTINELLI, 1972); c) elementos essenciais (KILBEY, 1963; AGNIHOTRI, 1967; SAXENA e SINHA, 1973); d) fontes de carbono e nitrogênio (MARTINELLI, 1972, 1976); e) glicose (TRINCI, 1969; CLUTTERBUCK, 1970b; AXEROLD, 1972); f) cloreto de potássio (CLUTTERBUCK, 1970b); g) aminoácidos e vitaminas (MARTINELLI, 1972).

3.2.4. Na germinação de conídios

Embora o fenômeno da germinação, em linhagens instáveis apresentando duplicações, tenha sido pouco averiguado, pois um dos raros trabalhos (*CASE e ROPER, 1978*) relata que conídios portando duplicações apresentam diâmetro maior do que os haplóides normais no início da germinação; muitas informações gerais já existem sobre o assunto em *Aspergillus nidulans*.

A germinação de conídios em *A. nidulans* exhibe sincronia parcial (*BAINBRIDGE, 1971*) e este sistema oferece um grande número de vantagens no estudo de processos do controle genético do desenvolvimento. Segundo *BAINBRIDGE (1971)*, durante o processo da germinação ocorre primeiro um aumento em peso seco (120 minutos) de vários constituintes, aumento este detectado nos seguintes intervalos: RNA (30 minutos); nitrogênio (30 minutos); proteínas (150 minutos) e DNA (180 minutos), sendo que pausas entre os aumentos de RNA, DNA e proteínas foram observadas. A emergência do tubo germinal foi observada após 210 minutos depois de inoculação em meio líquido e com 360 minutos, 98% dos esporos apresentavam tubos de germinação. O conteúdo de DNA por núcleo aumentou de duas vezes em relação ao normal, mas em estágios mais avançados da germinação ele foi apenas 10% maior. Quanto ao número de núcleos foram constatados esporos contendo 2, 4 e 8 núcleos em

intervalos crescentes de tempo (FIDDY e TRINCI, 1976). Altas concentrações de esporos inoculados, para teste de germinação, resultaram em auto-inibição da germinação (TRINCI e WHITTAKER, 1968; BAINBRIDGE, 1971; SCOTT e col., 1972).

Os processos da germinação têm sido estudados sob o ponto de vista bioquímico, em *Aspergillus nidulans*, por HOLLOMAN (1970) e BAINBRIDGE (1971). Já a ultra estrutura de conídios dormentes e germinando tem sido descrita por vários autores, entre os quais HESS e STOCKS (1969), BORDER e TRINCI (1970), FLORANCE e col. (1972), OLIVER, (1972) e SMITH e col. (1977).

Estudos comparativos da germinação de conídios em outras espécies de *Aspergillus* e em outros fungos têm sido desenvolvidos em: *Penicillium griseofulvum* (FLETCHER e MORTON, 1970), onde verificou-se que os conídios têm necessidade absoluta de glicose para iniciar a germinação e, grande densidade de esporos além da remoção de dióxido de carbono do meio, inibem a germinação; *Geotrichum candidum* (PARK e ROBINSON, 1970), no qual são correlacionadas mudanças na forma das mitocôndrias durante a germinação com mudanças na esporulação e ainda, suas implicações com os nutrientes do meio; *Claviceps purpurea* (COOKE e MITCHELL, 1970), onde se estudou a relação entre a fisiologia e uso de carboidratos durante as fases de dormência e de germinação de esclerócios; *Aspergillus fumigatus* (RUSSEL e col., 1975, 1977) onde se estudou a sensibilidade

ao antibiótico polieno durante a germinação e também o metabolismo dos esteróides.

Mutantes para germinação têm sido isolados após mutagênese e filtração em esporos germinados a 45°C. Tais mutantes crescem bem a 25°C, 30°C e 37°C, mas desenvolvem-se muito pouco a 45°C. Uma variedade de fenótipos tem sido observada entre esporos germinando. Baseado em experimentos envolvendo a transferência de placas de 37°C para 45°C, após germinação, os mutantes foram classificados em dois grupos: temperatura sensíveis para crescimento e para germinação (BAINBRIDGE, 1972). Com o uso de NTG, MARTINELLI (1972) isolou vários mutantes, sendo a maioria oligosporogênicos. O grau da expressividade do fenótipo do mutante pode ser alterado por: a) cruzamento com outros mutantes ou tipos selvagens; b) variação nas fontes de carbono e nitrogênio; c) temperatura e pH; d) adição de variedade de vitaminas ou aminoácidos ao meio. A esporulação dos tipos selvagens é alterada da mesma forma, por variações ambientais. Embora muitos mutantes segregem como um gene simples, a progênie resultante de cruzamentos exibe vários graus de expressividade. Muitos mutantes complementam entre si e com outros mutantes morfológicos em *A. nidulans* para formar estruturas conidiais normais; alguns mutantes mostraram-se oligosporogênicos e invasivos, sendo a ca-

racterística, aparentemente dominante, e outros auxotróficos, relacionados a outras características, com efeito pleiotrófico (MARTINELLI, 1972).

Através de ensaios, utilizando diversos fungos, pode-se verificar que muitos fatores, tais como a luz, temperatura e certas drogas, afetam a germinação. Assim, fungicidas, antibióticos e inibidores metabólicos, em concentrações adequadas, modificam o crescimento e desenvolvimento do fungo. Alguns compostos agem na germinação de esporos para produzir tubos de germinação distorcidos. Outros atingem a morfologia de hifas em desenvolvimento. Captan e dodine previnem a germinação e outros fungicidas sistêmicos, como benomil, não inibem a germinação, mas induzem efeitos morfológicos nas hifas em desenvolvimento. Certos antibióticos, atuando especificamente ao nível de síntese de parede, trazem modificações nos tubos de germinação e hifas (para maiores detalhes ver a revisão de RICHMOND, 1975).

Os critérios utilizados para detectar conídios germinando baseiam-se, principalmente, na emergência do tubo de germinação (TURIAN, 1966). Entretanto, muitos outros processos ocorrem antes que essa característica possa ser evidenciada. Assim há, de início, um aumento no tamanho do esporo, aumento esse relacionado com elevação de temperatura. Durante esse primeiro estágio ocorrem mudanças envolvendo deposição isotópica e uniforme na parede da célula (SMITH e col., 1976).

Quando o esporo atinge o tamanho máximo a síntese da parede torna-se polarizada às regiões onde ocorrerá a emergência do tubo de germinação (BARTNICKI-GARCIA, 1973). Estudos em *Aspergillus niger* mostraram que em conídios incubados a 44°C ou à temperaturas ligeiramente mais baixas e na presença de CO₂ (ANDERSON e SMITH, 1972; KUBOYE e col., 1976) ocorre uma dilatação maciça nos conídios e inibição da formação do tubo germinal. Mudanças na ultraestrutura dos conídios foram observadas, relacionadas ao aumento no número de núcleos e modificação ao nível da parede.

Assim, os complexos processos da germinação podem ser vistos como uma integração de numerosos eventos biológicos, resultantes de uma competência genética para ativar modificações físico-químicas específicas, as quais promovem os estímulos internos que regulam a atividade celular (SMITH e col., 1977).

3.2.5. No tamanho dos conídios

Aspectos relacionados à citologia em linhagens instáveis e seus derivados são raros e dificultados pelo tamanho reduzido dos núcleos e cromossomos (PONTECORVO e col., 1953; ELLIOT, 1960). Ao contrário, em outros microrganismos eucarióticos a detecção de aberrações cromossômicas é possibilitada através de técnicas microscópicas adequadas. Assim, en

tre eucariotos portadores de genomas pequenos como a *Neurospora* é impossível a detecção até de mutações de pontos, através de métodos citogenéticos (PERKINS e BARRY, 1977). Em *A. nidulans*, alterações quantitativas do material genético têm sido detectadas geneticamente, mas os indícios dessas alterações são possibilitados pela presença de marcadores específicos ou por alterações morfológicas e no desenvolvimento.

Apesar das dificuldades que são comuns para estudos citológicos em fungos, em geral, foi McCLINTOCK (1945) quem chamou a atenção, pela primeira vez, para a utilidade e importância de estudos genéticos e um conhecimento melhor do núcleo e de seu conteúdo nesses organismos. Foram testados, inclusive, métodos de coloração e fases da meiose foram acompanhadas em *Neurospora crassa*.

Os primeiros ensaios citológicos no gênero *Aspergillus* foram realizados por YUILL (1950), quando foi verificada a correlação existente entre o tamanho do conídio e o número de núcleos. Assim o autor verificou que quando os conídios são uninucleados seus diâmetros não excedem a 4 μ (micra), enquanto nos conídios uninucleados os diâmetros são em geral, superiores a 5 μ . O mesmo autor descreveu a natureza uninuclear dos conídios em *Aspergillus nidulans*, embora se conheçam hoje linhagens que podem apresentar menores (WEIJER e WEISBERG, 1966) e maiores (PIZZIRANI, 1977) porcentagens de

conídios binucleados.

Tanto em conídios haplóides quanto em diplóides há manutenção da proporção DNA/citoplasma (*ISHITANI e col.*, 1956) e a regulação do caráter conídios uninucleados depende do tempo da cessação do crescimento, sendo que o volume celular é proporcional à ploidia do conteúdo em DNA (*HEAGY e ROOPER*, 1952; *PONTECORVO e col.*, 1953; *CLUTTERBUCK*, 1969). Já nas hifas cenocíticas o volume celular é independente da ploidia, mas o número de núcleos por unidade de volume não é (*CLUTTERBUCK*, 1969b). Observou-se também que existe correlação entre a divisão nuclear e a septação (*CLUTTERBUCK*, 1970a), assim como é sincrônica a divisão nuclear em esporos germinando (*ROSENBERGER e KESSEL*, 1967).

Quanto ao número de cromossomos *ELLIOT* (1960) observou, em fases meióticas, a ocorrência de oito bivalentes: três grandes, dois médios, dois pequenos e um muito pequeno. Descreveu ainda o caráter binucleado dos ascósporos e discutiu a adequação das melhores técnicas para coloração de núcleos de conídios. *DANTAS D'ARCE* (1972), através de estudos de letais recessivos e frequência de aneuplóides chegou à conclusão de que o tamanho dos cromossomos seria, na ordem decrescente: I, VIII, III, VII, IV, VI e V e, *PIZZIRANI* (1977) confirmou, através da análise do diâmetro de conídios e núcleos de dissômicos que a ordem decrescente do tamanho dos cromossomos envolvidos é, III, IV e VI. Apesar desses resulta-

dos, são ainda fragmentários os dados sobre mapeamento citológico em *A. nidulans*.

WEISER e WEISBERGER (1966) estudaram os ciclos juvenil e de maturação em *A. nidulans*, mostrando com detalhes as modificações que ocorrem sincronicamente no núcleo. Em 1972, OLIVER, utilizando técnicas de microscopia eletrônica apresentou uma série de informações relativas à ultraestrutura de conídios e estrutura conidial (ver revisões recentes de SMITH, 1977; SMITH e col., 1977).

Quanto às técnicas mais adequadas para coloração de hifas e conídios ROBINOW e CATEN (1969) realizaram um exaustivo estudo comparativo entre diversos métodos, além de analisarem o comportamento dos conídios na mitose, fato este revisto por FULLER (1976), utilizando a microscopia eletrônica.

Paralelamente, as alterações provocadas pela presença de duplicações têm sido até agora, observadas apenas macroscopicamente: assim a forma "enrugada" das colônias e as taxas reduzidas de crescimento e conidiação têm sido relacionadas, quase sempre, à presença de duplicações (NGA e ROOPER, 1968); já as alterações, ao nível celular, relacionadas à presença de segmentos cromossômicos em duplicata, têm sido pouco averiguadas. Entretanto alguns trabalhos têm relatado e correlacionado a ocorrência de conídios maiores em linha-

gens portadoras de duplicação, quando comparados à linhagens haplóides padrões. São concordantes os resultados obtidos, recentemente, por *PAES DE BARROS (1977)* e *CASE e ROPER (1978)* ao analisarem linhagens com duplicação. Os resultados obtidos parecem favorecer a investigação de relações quantitativas entre citoplasma e núcleo, em outras fases do crescimento, para se tentar detectar quando e quanto a presença de material genético duplicado pode afetar a diferenciação, metabolismo e comportamento em linhagens com duplicações e outras aberrações cromossômicas.

PIZZIRANI (1977) e *GABRIELLI (1978)* ao analisarem dissômicos verificaram também que os seus conteúdos são maiores em relação às linhagens haplóides tomadas como controle, o que vem confirmar, ainda mais, que a presença de duplicações, seja de segmentos ou de cromossomos acarreta variabilidade, a qual em muitos casos, pode ser detectada citologicamente. A utilização de novos métodos, como o de isolamento de núcleos em *A. nidulans* (*GEALT e col., 1975*), a determinação direta do conteúdo em DNA (*HEAGY e ROPER, 1952*) ou ainda a utilização de métodos citofotométricos que têm dado ótimos resultados para mixomicetos (*COLLINS e col., 1978*) seriam de grande importância para estudos da variação do conteúdo nuclear em linhagens com duplicações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens utilizadas

a) Linhagem A

Possui cófídios de coloração verde e apresenta duplicação cromossômica de um segmento do grupo de ligação I translocada para o grupo de ligação II (NGA e ROPER, 1968). A constituição genética da linhagem A está representada na Figura 1.

Grupos de ligação	Marcadores genéticos
I	$proA_1$ $pabaA_6$ yA_2 + +
II	+ adE_{20} biA_1

Figura 1 - Marcadores genéticos da linhagem A.

b) Linhagem MSE (Master Strain E)

Apresenta conídios de coloração branca e marcadores genéticos nos 8 grupos de ligação (McCULLY e FORBES, 1965), como se observa na Figura 2.

Grupos de ligação	Marcadores genéticos
I	suA_1 adE_{20} yA_2 adE_{20}
II	wA_3
III	$galA_1$
IV	$pyroA_4$
V	$lacA_{303}$
VI	ΔP_3
VII	$nicB_8$
VIII	$riboB_2$

Figura 2 - Marcadores genéticos da linhagem MSE.

c) Linhagem *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂

Possui conídios amarelos e sua constituição genética é apresentada na Figura 3.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos
I

Figura 3 - Marcadores genéticos da linhagem *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂.

Nas Figuras 1, 2 e 3 os centrômeros estão designados por o. Os fenótipos dos marcadores genéticos são encontrados no ítem 4.1.1. As posições dos marcadores genéticos não estão em escala no mapa.

d) Variantes deteriorados *V*₅, *V*₉, *V*₁₆, *V*₂₀, *V*₃₆ e *V*₄₆

Foram todos obtidos, espontaneamente da linhagem A, apresentando fenótipo "crinkled", alterações na conidiação e coloração e genótipo *proA*₁; *pabaA*₆, além da presença de um determinante de deterioração para cada caso (*V*₅, *V*₉, *V*₁₆, *V*₂₀, *V*₃₆ e *V*₄₆).

As três primeiras linhagens são originadas do Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra; os variantes *V*₅, *V*₉, *V*₁₆ e *V*₂₀ foram obtidos por AZEVEDO e ROPER (1970) e os variantes *V*₃₆ e *V*₄₆ por MENEZES

(1974) e PAES DE BARROS (1977), respectivamente.

4.1.1. Marcadores genéticos e fenótipos das marcas utilizadas

Marcador	f e n ó t i p o
<i>adE₂₀</i>	Requisito para adenina.
<i>facA₃₀₃</i>	Incapacidade de crescer em meio contendo acetato como <u>única</u> fonte de carbono.
<i>galA₁</i>	Incapacidade de crescer em meio contendo galactose como <u>única</u> fonte de carbono.
<i>nicB₈</i>	Requisito para ácido nicotínico
<i>pabaA₆</i>	Requisito para ácido <i>p</i> -aminoben-zóico.
<i>proA₁</i>	Requisito para prolina.
<i>pyroA₄</i>	Requisito para piridoxina.
<i>riboB₂</i>	Requisito para riboflavina.
<i>sB₃</i>	Requisito para tiosulfato.
<i>suA₁ adE₂₀</i>	Supressor do mutante <i>adE₂₀</i> .
<i>yA₂</i>	Conídios amarelos.
<i>wA₃</i>	Conídios brancos.

4.2. Meios de cultura e soluções utilizadas

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

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Glicose	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1.000 ml

pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%.

4.2.2. Meio completo sólido (*PONTECORVO e col., 1953*)

Adicionou-se ao meio mínimo:

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

pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%.

Quando se fez necessário, utilizou-se meio com

pleto líquido, preparado segundo os itens 4.2.1. e 4.2.2., exceto o ágar. Distribuiu-se em frascos (2,5 ml cada) e autoclavou-se.

4.2.3. Solução de vitaminas

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

A solução foi aquecida em banho-maria por 15 minutos e guardada, em frasco escuro, no refrigerador a 4°C, sob clorofórmio.

4.2.4. Solução de ácido nucléico de leveduras

- a) Ácido nucléico de leveduras - 2 g em 15 ml de solução 1 N de HCl.
- b) Ácido nucléico de leveduras - 2 g em 15 ml de solução 1 N de NaOH.

Ambas as soluções foram aquecidas a 100°C durante 20 minutos, misturadas e o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 4%. Filtrou-se e completou-se o volume para 40 ml, sen-

do a seguir conservada em refrigerador a 4°C sob clorofórmio.

4.2.5. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo

Ao meio mínimo líquido (item 4.2.1., sem o ágar) adicionou-se 2% de meio completo líquido e distribuiu-se 2,5 ml por tubo e autoclavou-se.

4.2.6. Meio mínimo de galactose

Preparado da mesma maneira que o meio mínimo (item 4.2.1.), sendo substituída a glicose por galactose como fonte de carbono.

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

Acetato de amônio	12,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
NaCl	2,0 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Ágar	15,0 g
Água destilada	1.000 ml
pH ajustado para 6,1 com NaOH 4%.	

4.2.8. Suplementos adicionados ao meio mínimo

Preparou-se o estoque de suplementos adicionando-se cada um deles em água destilada esterilizada. As soluções foram aquecidas em banho-maria por 15 minutos e conservadas em refrigerador a 4°C.

Solução estoque (100 ml de H ₂ O)		Quantidade adicionada por placa (20 ml de meio de cultura)	Concentração final no meio de cultura
Adenina	500,0 mg	0,1 ml	25,00 µg/ml
Ácido nicotínico	10,0 mg	0,1 ml	0,50 µg/ml
Ácido p-aminobenzóico	5,0 mg	0,1 ml	0,25 µg/ml
Biotina	4,0 mg	0,1 ml	0,20 µg/ml
Metionina	1,0 g	0,1 ml	50,00 µg/ml
Piridoxina	5,0 mg	0,1 ml	0,25 µg/ml
Prolina	1,0 g	0,1 ml	50,00 µg/ml
Riboflavina	10,0 mg	0,1 ml	0,50 µg/ml
Tiossulfato de sódio	2,0 g	0,1 ml	100,00 µg/ml

4.2.9. Solução salina (0,85%)

Preparou-se uma solução de 8,5 g de cloreto de sódio em 1.000 ml de água destilada. Colocou-se 9 ml da solução em frascos, autoclavou-se e conservou-se à temperatura ambiente.

4.2.10. Solução de tween "80" - (0,1% - V/V)

Preparou-se uma solução de 0,1 ml de tween 80 em 100 ml de água destilada. Distribuiu-se em tubos de ensaio (2,5 ml cada), autoclavou-se e conservou-se à temperatura ambiente.

4.2.11. Solução de cloroneb - 2% (Du Pont, 65% de P.A.) (1,4-dicloro - 2,5-dimetoxil benzeno)

Preparou-se uma solução com 1 g de cloroneb em 50 ml de água destilada, a qual foi aquecida em banho-maria por 15 minutos e conservada no refrigerador à 4°C.

4.2.12. Solução de albumina 5%

Preparou-se uma solução com 5 ml de clara de ovo em 100 ml de água destilada. Filtrou-se e conservou-se em refrigerador utilizando-se frasco escuro.

4.2.13. Solução fosfato pH 6,9

Solução A

NaH ₂ PO ₄	27,80 g
Água destilada	1.000 ml

Solução B

Na_2HPO_4 53,65 g
Água destilada 1.000 ml

Adicionou-se 45 ml da solução A em 55 ml da solução B e completou-se para 200 ml com água destilada. As soluções A e B foram sempre conservadas em refrigerador e a solução fosfato foi preparada sempre no momento de uso.

4.2.14. Solução Helly

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

Conservou-se a solução em frasco escuro à temperatura ambiente.

4.2.15. Formol neutro

Adicionou-se uma parte de carbonato de cálcio em três partes de formalina.

Agitou-se a solução, esporadicamente durante dez dias, conservando-a à temperatura ambiente.

4.2.16. Solução estoque de GIEMSA

Diluiu-se uma parte de GIEMSA em 66 partes de glicerina a 60°C e, após o resfriamento, misturou-se com 66 partes de metanol. A solução foi mantida à temperatura ambiente.

4.2.17. Meios de análise

Para a análise genética das colônias utilizaram-se placas de Petri contendo meio completo (MC), meio mínimo (MM), meio mínimo suplementado com todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento (M + T), meio mínimo de galactose suplementado com todos os requisitos (GAL), meio mínimo de acetato suplementado com todos os requisitos (AC) e meio mínimo suplementado com todos os requisitos, exceto aquele em análise (M + T - ribo, por exemplo). Para a transferência de colônias utilizou-se um replicador contendo 26 pontos (AZEVEDO e col., 1976).

4.3. Equipamentos para microscopia e fotografia

Para as medições pretendidas utilizaram-se os microscópios: a) Wild (Heerbrugg) M 20-34983 e ocular micrométrica Carl Zeiss 4892628 (8x); b) Baush Lomb LK4 640 com ocu-

lar micrométrica Ernest Leitz Wetzlar (6x).

Para as microfotografias utilizaram-se: os microscópios: a) Zeiss West Germany, câmera Carl Zeiss C 35 10x e objetivas 6,3x e 16x; b) Foto microscópio Zeiss e objetiva 100 x 1,25 x 3,2. O filme utilizado para as microfotografias foi o Kodak Panatomic-X.

4.4. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e as soluções foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 120°C, exceto nos casos assinalados. A temperatura de incubação foi de 37°C, exceto nos experimentos onde se fez necessária sua variação para 30°C e 40°C.

4.5. Obtenção espontânea e manutenção dos variantes deteriorados e heterocarióticos

Confídios provenientes de colônias da linhagem A, com 72 horas de incubação, foram inoculados no centro de placas de Petri contendo meio completo e mantidos em estufa a 37°C, durante 7 dias. A seguir contaram-se os setores obtidos e analisou-se a relação de posição entre os mesmos dividindo-se cada placa em quadrantes numerados, sendo o quadrante 1 fixo para setores amarelos. Fez-se também a conta-

gem de setores gêmeos.

Os variantes deteriorados obtidos foram isolados em placas individuais através de inoculação de ponto, pela transferência de pedaços de ágar contendo micélio ou por diluição e semeadura. Após purificação foram estocados em tubos contendo meio completo inclinado e uma amostra de cada variante foi mantida em placa contendo meio completo, através de repiques periódicos. Devido à grande instabilidade do material em estudo, muitos dos variantes obtidos não se mantiveram como tais e não puderam ser analisados.

Os setores heterocarióticos, devido sua rara ocorrência e extrema dificuldade na manutenção e transferência para novo meio de cultura, foram analisados citológica e geneticamente logo após sua obtenção. Mantiveram-se em estoque apenas os conídios viáveis, perdendo-se os letais. À posteriori, com a utilização de técnica adequada (ítem 4.9.) foi possível, analisar-se também alguns heterocarióticos apresentando conídios com letalidade. Mesmo nesses casos não foi possível a manutenção de letais em estoque, senão na forma de diploides balanceados.

4.6. Ação da temperatura na obtenção de setores na linhagem A

Conídios provenientes de colônias da linhagem A,

com 72 horas de incubação foram inoculados em placas de Petri e incubados em diferentes temperaturas. As placas colocadas às temperaturas de 30°C ou 37°C foram mantidas na estufa por 7 dias e aquelas incubadas a 40°C foram mantidas por 10 dias. Após esse período, procedeu-se à contagem do número de setores por placas por tratamento. Observou-se também a relação de posição dos setores nos quadrantes numerados, assim como a ocorrência de setores gêmeos.

Tal experimento foi realizado em duas etapas. Na primeira utilizou-se número desigual de repetições para as diferentes temperaturas de incubação; na segunda o número de repetições foi igual e o delineamento foi inteiramente casualizado.

4.7. Taxa de crescimento das colônias

Conídios das linhagens A, MSE, *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂ e dos variantes deteriorados obtidos foram inoculados no centro de placas de Petri contendo meio completo. Foram efetuadas 10 repetições por linhagem e medições foram realizadas diariamente, durante 7 dias, utilizando-se de uma régua milimetrada para medir o diâmetro de cada colônia. As placas foram incubadas a 37°C.

4.8. Medidas microscópicas

4.8.1. Medidas da estrutura conidial

As linhagens envolvidas no presente trabalho foram inoculadas por estria, nos quatro bordos de lâminulas esterilizadas colocadas sobre meio completo em placas de Petri (BIAGI, 1977). Após 72 horas de incubação essas lâminulas foram retiradas (com auxílio de uma pinça flambada em álcool), colocadas invertidas sobre lâmina contendo uma gota de água e observadas ao microscópio. Efetuaram-se 20 medições ao acaso, com o auxílio da ocular micrométrica (Ernest Leitz Wetzlar St, 6x) e objetiva de 43x, das seguintes partes da estrutura conidial.

Pedúnculo (p): altura (ap) e diâmetro (dp).

Vesícula (v): altura (av).

Conidióforo (c): altura total ($ac = ap + av$).

A Figura 4 indica os locais onde efetuaram-se as medidas.

Baseando-se nas observações microscópicas das linhagens originais e variantes deteriorados e heterocarióticos fizeram-se desenhos esquemáticos das estruturas conidiais de alguns deles, e em certos casos fotografias dos campos mais representativos foram obtidas.

Figura 4 - Esquema da estrutura conidial em *A. nidulans* indicando os locais de medições.

4.8.2. Observação de algumas etapas da conidiogênese

Utilizando-se a mesma técnica descrita no item 4.8.1. fizeram-se observações com intervalos de tempo de 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas para algumas das linhagens e variantes envolvidos no presente trabalho. Para tanto, seis lamínulas esterilizadas foram inoculadas em placas contendo meio completo. Uma lamínula foi retirada, por linhagem, a cada intervalo de tempo e levada ao microscópio. Procedeu-se então, à inspeção dos bordos de cada lamínula (utilizando-se objetiva de 43x e ocular de 10x) e desenhos esquemáticos das principais estruturas observadas foram realizados.

4.8.3. Diâmetro de conídios, núcleos e porcentagens de conídios uni, bi e trinucleados

Conídios de todas as linhagens e variantes deteriorados e heterocarióticos envolvidos no presente trabalho, além dos diplóides resultantes de cruzamentos entre os mesmos e a linhagem testadora MSE, foram inoculados em placas de Petri contendo meio completo (para os haplóides) e meio mínimo (para os diplóides). Após três dias de incubação a 37°C fizeram-se preparações citológicas dos conídios, seguindo-se o método descrito por *ROBINOW e CATEN (1969)*, modificado por *PAES DE BARROS (1977)*.

Utilizando-se uma alça de níquel cromo, conídios foram colocados sobre lamínula, à qual adicionou-se uma gota da solução de albumina; homogeneizou-se essa suspensão com o auxílio de outra lamínula e estas foram deixadas secar, separadamente. A seguir, o material foi fixado em 5 ml da solução de Helly, acrescida de 0,3 ml de formol neutro durante 15 minutos. Após esse período, as lamínulas foram passadas para álcool etílico 70% e então hidrolisadas em ácido clorídrico 1 N a 63°C durante 20 minutos. Posteriormente, lavaram-se as lamínulas duas vezes, em diferentes frascos contendo água destilada. A coloração foi feita colocando-se 5 ml da solução fosfato (pH 6,9) e 9 gotas do corante GIEMSA. O tempo de coloração variou para cada linhagem, aumentando-se de 30 a 60 minutos para as linhagens haplóides e haplóides com

duplicação (incluindo os variantes deteriorados), respectivamente. Para as linhagens diplóides, em geral, usou-se cerca de 40 a 50 minutos para a coloração.

A seguir, as lamínulas foram lavadas em solução fosfato e colocadas, invertidas, sobre lâminas contendo uma gota do tampão fosfato e então observadas ao microscópio. No caso de uso não imediato, foram guardadas em placas fechadas contendo papel de filtro umedecido em tampão e conservadas em refrigerador.

Fizeram-se medidas, ao acaso, do diâmetro de 25 conídios e de seus respectivos núcleos (para cada linhagem e variante utilizado). Para tais medidas utilizou-se ocular micrométrica com charriot (Carl Zeiss, 8x) e objetiva de imersão. Contaram-se ainda os números de conídios uni, bi e trinucleados em 8 campos, ao acaso.

Os diplóides utilizados resultaram do cruzamento das linhagens A, *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂ e variantes deteriorados e heterocarióticos com a linhagem MSE. Desses, também, 25 conídios e núcleos foram medidos, por tratamento.

4.8.4. Medida da taxa de germinação dos conídios

4.8.4.1. Em meio completo líquido

Alíquotas conhecidas de uma suspensão de coní-

dios (cerca de 10^6 conídios por ml) de cada linhagem utilizada foram colocadas em tubos contendo 2,5 ml de meio completo líquido. Após agitação, cada tubo foi incubado a 37°C e amostras foram retiradas com intervalos de 4, 8 e 12 horas de germinação. Retirou-se 0,1 ml de cada amostra nos diferentes intervalos de tempo e ao microscópio contou-se o número de conídios germinando (G) e não germinando (N/G). O critério utilizado foi a presença de tubo de germinação para a separação das duas classes. Não se levou em conta diferenças iniciais entre tamanho de conídios germinando e não germinando. Utilizaram-se ocular de 10x e objetiva de 43x para a contagem em 8 campos, ao acaso.

4.8.4.2. Em blocos de meio completo, entre lâmina e lamínula: técnica especial para conídios letais

Sobre uma lâmina esterilizada (contida no interior de uma placa de Petri) depositou-se um bloco de meio completo. Inoculou-se nesse bloco 5 "cabeças" conidiais, manipuladas sob lupa e com o auxílio de uma finíssima pipeta Pasteur distendida no fogo (item 4.9.). Cada "cabeça" foi inoculada separadamente das demais.

A seguir, colocou-se uma lamínula esterilizada sobre esse bloco, com o auxílio de pinça flambada. Todo o con

junto foi incubado a 37°C durante 12 horas e, após este período, observado ao microscópio com objetiva de 43x e ocular de 10x. Foram contados em 8 campos, ao acaso, conídios germinando (G) e não germinando (N/G). Esta técnica foi adaptada e escolhida, principalmente, com o objetivo de se acompanhar a germinação de conídios provenientes de setores heterocarióticos, os quais apresentam em alguns casos conídios verdes (viáveis) e amarelos (letais). A técnica descrita acima foi utilizada para ambos os tipos de conídios, separadamente.

Para as linhagens A, MSE, *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂, variantes deteriorados e alguns variantes heterocarióticos utilizou-se também a técnica de germinação em bloco de meio completo, porém não houve "manipulação" de cabeças conidiais sob lupa e sim fizeram-se inoculações por estrias, de cada linhagem, na superfície do bloco de meio. Teve-se o cuidado de inocular-se o menor número possível de conídios (TRINCI e WHITTAKER, 1968; BAINBRIDGE, 1971; SCOTT e col., 1972) evitando-se a auto-inibição da germinação.

4.9. Manipulação de conídios, apresentando letalidade, em setores heterocarióticos

Sempre que surgiram os setores heterocarióticos, aliás muito raros, estes foram analisados rapidamente devido à dificuldade de manutenção e repicagem para novos meios.

De cada setor raspou-se uma pequena área com auxílio de uma alça de níquel cromo e fez-se uma suspensão de conídios em 9 ml de salina. Após agitação semeou-se 0,1 ml de uma diluição apropriada dessa suspensão em placas contendo meio completo. Após 72 horas de incubação contaram-se as colônias. Como entre os setores heterocarióticos ocorreram dois tipos distintos: setores menores que apresentaram conídios amarelos e verdes viáveis e, setores maiores que apresentaram conídios verdes viáveis e amarelos letais, foi necessária a utilização de duas metodologias específicas para os dois casos. Em se tratando daqueles setores possuidores de conídios viáveis verdes e amarelos, procedeu-se como nos casos normais de purificação, estocagem, análise genética e citológica, já descritos e a descrever. Os ensaios foram realizados sempre, em separado, tanto para conídios verdes quanto para conídios amarelos.

Entretanto, para aqueles que apresentaram letalidade para um dos tipos de conídios, foi desenvolvida uma técnica especial. Para tanto, os setores portadores de letalidade foram observados sob lupa, e com o auxílio de uma alça de vidro de ponta muito fina (obtida pela distensão de uma pipeta ao fogo) foram sendo "pescadas", uma a uma, as "cabeças" de conídios amarelos e, separadamente, as verdes. A partir dessa "manipulação" inicial as "cabeças" foram transferidas para os meios específicos atendendo-se a cada finalidade do presente trabalho.

4.9.1. Medida da germinação de conídios viáveis e letais

Efetuada de acordo com a técnica descrita no item 4.8.4.2., utilizando-se apenas as "cabeças" de conídios verdes e amarelas obtidas através de "pescagem" sob lupa (item 4.9.).

4.9.2. Contagem do número de conídios amarelos e verdes

Constatada a presença de letalidade, através de semeadura de suspensão de conídios provenientes de setores heterocarióticos, retirou-se uma pequena amostra de conídios (mistura de amarelos e verdes) e fez-se a coloração dos mesmos utilizando-se a técnica descrita no item 4.8.3. A seguir os conídios, já corados, foram observados ao microscópio (com ocular 15x e objetiva de imersão) e separados em dois grupos: claros (citoplasma pouco corado) e escuros (citoplasma mais corado). Os claros correspondem aos conídios amarelos e os escuros aos verdes (*PIZZIRANI, comunicação pessoal*). Desse modo foi possível contar em 8 campos, ao acaso, o número de conídios claros (amarelos) e escuros (verdes), já que através de semeadura e contagem de colônias, isso foi impossível. Fotografias foram obtidas dos campos analisados.

4.9.3. Diâmetro de núcleos e conídios amarelos e verdes

Para cada variante, mediram-se, ao acaso, os diâmetros de 25 conídios amarelos e 25 conídios verdes e seus respectivos núcleos. A técnica usada encontra-se no item 4.8.3. e a diferenciação entre os dois tipos foi possível segundo a técnica descrita no item 4.9.2. Também os diplóides, obtidos do cruzamento de conídios amarelos (letais) e verdes com a linhagem MSE, através das técnicas especiais 4.9. e 4.9.4, tiveram 25 conídios e respectivos núcleos medidos nos seus diâmetros. Para tais medições utilizou-se objetiva de imersão e ocular micrométrica (Carl Zeiss, 8x) e dotada de charriot. Contaram-se ainda o número de conídios uni, bi e trinucleados.

4.9.4. Análise genética

Para esse tipo de setor, apresentando letalidade em um dos tipos de conídios, utilizou-se a técnica de manipulação das "cabeças" dos conídios, sob lupa (item 4.9.), as quais foram transferidas para tubo de ensaio contendo meio mínimo mais, 2% de meio completo. O mesmo procedimento foi feito para a linhagem testadora MSE e de ambas as linhagens procurou-se colocar o mesmo número de "cabeças" (10 a 20). Prepararam-se dois tubos, uma para análise mitótica e outro para

análise meiôtica. Após agitação cuidadosa, os tubos foram incubados a 37°C. A formação da película demorou cerca de 7 a 10 dias. Após esse período utilizaram-se as técnicas usuais de análise genética para *Aspergillus nidulans* (descritas nos itens 4.10. e seguintes).

As técnicas indicadas nos itens 4.9., 4.9.1., 4.9.2., 4.9.3. e 4.9.4. foram aplicadas nos casos especiais dos setores heterocarióticos H₈, H₉, H₁₅ e H₁₆, tanto para os conídios amarelos quanto para os verdes.

4.10. Técnicas de análise genética geral

4.10.1. Obtenção do heterocário

Utilizando-se o método descrito por *PONTECORVO e col. (1953)* foram feitos os cruzamentos entre cada variante (deteriorado e heterocariótico) e a linhagem testadora, *MSE*. Para tanto, conídios de duas linhagens, requerendo diferentes fatores de crescimento, foram colocados juntos e em igual proporção em tubos contendo meio mínimo mais 2% de meio completo, o que permitiu germinação inicial. Após 3 a 4 dias de incubção a 37°C formou-se uma película que foi transferida para meio mínimo sólido e colocada dividida nos quatro quadrantes de placa. Isso foi feito para que se pudessem formar os setores heterocarióticos. No caso de cruzamentos entre os va-

riantes deteriorados e a linhagem *MSE* daqueles que apresentavam conidiação escassa procurou-se colocar a maior quantidade de material, inclusive o micélio.

4.10.2. Análise através do ciclo parassexual

A análise mitótica foi feita segundo o método de *ROPER (1952)* e utilizando o ciclo parassexual. Da união de núcleos haplóides pode-se obter diplóides, os quais crescem em meio mínimo, sendo esse fato de rara ocorrência (1 diplóide em 10^7 conídios).

O material crescido em meio mínimo foi analisado, quanto à diploidia, através de medidas microscópicas de cadeias de cinco conídios em lisol (1:10) e utilizando-se uma ocular micrométrica (Ernest Leitz Wetzlar St 6x). Outros critérios usados para a detecção dos diplóides foram: a cor da colônia e sua capacidade de crescer em meio mínimo.

Procedeu-se em seguida, à haploidização dos diplóides obtidos utilizando-se uma solução de cloroneb (2%), um fungicida que permite o crescimento de setores haplóides segregantes e não o de diplóides (*AZEVEDO e PACHECO SANTANA, 1975*). Essa haploidização ocorre através de não disjunções sucessivas que culminam com a volta ao estado haplóide (*KÄFFER, 1961*). A técnica consistiu em adicionar-se 2,5 ml da solução de clo-

roned a 200 ml de meio completo. A seguir, os diplóides foram inoculados em quatro pontos das placas e incubados a 37°C durante 7 a 10 dias, quando surgiram setores haplóides de coloração bem conspícua. Esses setores foram então purificados, por estria, em meio completo e após 72 horas foram transferidos um a um, para 26 pontos fixos em placa, contendo meio completo. Essa placa, após três dias de incubação a 37°C foi utilizada como placa mestra (P.M.), a qual foi replicada para as placas de análise através de um replicador de níquel cromo. Leituras foram feitas com 24, 48 e 72 horas de crescimento.

4.10.3. Análise através do ciclo sexual

A análise meiótica é baseada no ciclo sexual de *A. nidulans* e foi realizada de acordo com o método de *PONTÉCORVO e col. (1953)*. A análise baseia-se na ocorrência de cleistotécios híbridos, contendo ascósporos segregantes, os quais resultam da meiose dos zigotos formados pela cariogamia de núcleos geneticamente diferentes. Da união de igual número de conídios de duas linhagens envolvidas no cruzamento e, que foram colocadas em meio mínimo mais 2% de meio completo, obteve-se, após 72 a 96 horas de incubação, uma película que foi transferida para placa contendo meio mínimo. Nesse meio, a película foi dividida em quatro pedaços dispostos de maneira equidistante e a placa foi vedada com fita celulósica

e incubada a 37°C durante 7 a 10 dias. Após esse período, sob lupa, os maiores e médios cleistotécios (*BARACHO e col., 1970*) foram transferidos para meio mínimo sólido e "rolados" para a eliminação de células de Hülle e confídios aderentes. A seguir foram transferidos, com o auxílio de alça de níquel cromo, para frascos contendo 9 ml de solução salina, onde foram esmagados contra a parede com a própria alça, e finalmente misturados à solução. Dessa forma, de vários cleistotécios observados, 5 a 6 foram escolhidos, os quais, após purificação e esmagamento, foram analisados. Para tanto, semeou-se 0,1 ml de cada suspensão de cleistotécio em placas contendo meio completo, as quais foram incubadas a 37°C durante 72 horas. As suspensões restantes foram guardadas em refrigerador. Utilizaram-se para análise apenas os cleistotécios híbridos, sendo que os autofecundados foram descartados. Do cleistotécio escolhido foram feitas várias placas, com diluições apropriadas, em meio completo e incubados durante 72 horas. Após esse período contaram-se os segregantes normais e deteriorados e cada tipo foi repicado, separadamente, para placas contendo meio completo com 26 pontos, cada uma. Após incubação de 72 horas essas placas foram replicadas para placas de análise com o auxílio do replicador de 26 pontos. Leituras foram feitas com 24, 48 e 72 horas.

4.10.4. Testes de alelismo

Para se verificar se os variantes obtidos no presente trabalho eram alelos ou não de variantes obtidos por outros autores, escolheram-se aqueles cuja localização foi detectada nos mesmos grupos de ligação. Para tanto, cruzamentos específicos foram feitos entre conídios provenientes de duas colônias possuidoras de diferentes requerimentos nutricionais. Através da análise de ascósporos resultantes do ciclo sexual (item 4.10.3.) verificou-se a ocorrência de alelismo ou não entre os variantes ensaiados, pela contagem de proporção entre colônias normais e deterioradas resultantes. Nesses testes foram usados variantes deteriorados e/ou seus segregantes obtidos no presente trabalho (V₄₉, V₅₀, V_{50.1}, V₅₁, V₅₂) e variantes e/ou segregantes obtidos por outros autores: AZEVEDO e ROPER, 1970 (V₅, V₉, V₁₆ e V₂₀); MENEZES, 1974 (V₃₆) e PAES DE BARROS, 1977 (V₄₆).

4.11. Análise estatística

Devido à diversidade de tipos de resultados pretendidos, os seguintes testes estatísticos foram aplicados, indicando-se suas finalidades:

- a) Para se medir diferenças na instabilidade da linhagem A frente à variação de tempera-

tura, utilizou-se o teste não paramétrico de *FRIEDMAN*, (*STEFFL e TORRIE*, 1960) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\chi^2_r = \frac{12}{bt(t+1)} \sum_i r_i^2 - 3b(t+1),$$

onde:

b = número de repetições.

t = número de tratamentos.

12 = cte

3 = cte

$\sum_i r_i^2$ = soma, ao quadrado, do total de ordenamentos.

b) As análises da variância para os caracteres: diâmetro de colônias, diâmetros de conídios e núcleos (haplóides e diplóides), alturas do pedúnculo, vesícula e conidióforo, e diâmetro do pedúnculo foram realizadas segundo um esquema em classificação hierárquica (*SNEDECOR e COCHRAN*, 1972), mostrado a seguir:

F.V.	G.L.	Q.M.	F.
Entre linhagens	p - 1	Q ₂	Q ₂ /Q ₁
Dentro de linhagens	p(n - 1)	Q ₁	
pn - 1			

sendo:

p = número de tratamentos (linhagens).

n = número de observações por tratamento.

Em seguida os diversos tratamentos foram comparados com as testemunhas através do teste de *DUNNET* (*STEEL e TORRIE, 1960; DUNNET, 1964*).

c) Para a análise da segregação meiótica dos segregantes resultantes de cruzamentos entre os variantes e linhagens controles com a linhagem *MSE* utilizou-se o teste do χ^2 .

d) O valor de recombinação entre os segregantes normais e recombinantes, na análise meiótica foi calculado segundo a fórmula:

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

onde:

C = valor de ligação.

R = número de colônias recombinantes.

T = número total de colônias analisadas.

Ainda para os valores de recombinação calcularam-se os respectivos desvios padrões, segundo a fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{p(1-p)}{N}},$$

onde:

p = frequência de recombinantes.

N = número total de ascósporos analisados.

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção espontânea de setores, análise de seu número e posição em diferentes temperaturas

Para este ítem os resultados estão divididos de acordo com a cronologia dos ensaios realizados e serão usadas em todas as tabelas as abreviaturas: A = amarelo; V = verde; D = deteriorado e H = heterocariótico.

Experimento a) Os resultados obtidos nessa primeira parte são o fruto de especulações iniciais sobre diferenças de produção de setores, quando se utilizava, ocasionalmente, a parte inferior do incubador e eram obtidos setores em número muito maior do que quando se utilizava a prateleira superior. A partir daí, a linhagem A foi incubada em três diferentes temperaturas, utilizando-se incubadores diversos, e o número de repetições, por tratamento, foi desigual. A Tabela 2 apresenta o número e porcentagem de setores assim obtidos, assim como o número de setores gêmeos. Nesse primeiro ensaio, os resultados não foram analisados estatisticamente.

Tabela 2 - Número e frequência de setores obtidos da linhagem A de *A. nidulans* em diferentes temperaturas (Exp. a).

Setores	T r a t a m e n t o s			Total
	30°C	37°C	40°C	
A	22 (0,511)*	428 (0,717)	190 (0,931)	640
V	20 (0,465)	73 (0,122)	7 (0,034)	100
D	1 (0,023)	74 (0,124)	5 (0,025)	80
H	0 (0,000)	22 (0,037)	2 (0,010)	24
Total	43	597	204	844
Nº de colônias analisadas	35	298	40	373
Média de setores/placa	1,23	2,00	5,10	2,26
Nº de setores:				
Gêmeos	1	15	21	37
Trigêmeos	0	0	10	10

*O primeiro valor indica o número e entre parênteses está a frequência.

Quanto à posição de setores obtidos nos quadrantes numerados em placas inoculadas com a linhagem A e crescidos em diferentes temperaturas, a Tabela 3 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 3 - Número e posição dos setores em relação aos quadrantes em diferentes temperaturas. (Exp. a).

S e t o r e s	T r a t a m e n t o s														
	30°C					37°C					40°C				
	Quadrantes				To- tal	Quadrantes				To- tal	Quadrantes				To- tal
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4	
A	15	2	4	2	23	236	50	55	55	396	75	74	54	38	241
V	12	3	3	1	19	28	8	12	14	62	1	1	4	3	9
D	1	0	0	0	1	23	19	14	17	73	1	1	4	2	8
H	0	0	0	0	0	4	8	2	2	16	0	0	0	2	2
Total	28	5	7	3	43	291	85	83	88	547	77	76	62	45	260

Experimento b) Utilizou-se, nessa segunda etapa, número igual de repetições por tratamento e delineamento inteiramente casualizado, cujos resultados e análise estatística estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Número e frequência de setores obtidos da linhagem A de *Aspergillus nidulans* em diferentes temperaturas. (Exp. b).

Setores	T r a t a m e n t o s			Total	Teste de <i>FRIEDMAN</i>
	30°C	37°C	40°C		
A	18 (0,439) ^o	55 (0,647)	141 (0,887)	214	44,40**
V	19 (0,463)	18 (0,212)	12 (0,075)	49	0,81 n.s.
D	2 (0,049)	7 (0,082)	6 (0,038)	15	0,70 n.s.
H	2 (0,049)	5 (0,059)	0 (0,000)	7	0,23 n.s.
Total	41	85	159	285	36,04**
Nº de colônias analisadas	40	40	40	120	
Média de seto- res/placa	1,02	2,12	3,97	2,38	
Nº de setores:					
Gêmeos	2	15	23	40	
Trigêmeos	0	0	12	12	

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

o = O primeiro valor refere-se ao número e a frequência está entre parênteses.

A Tabela 5 apresenta os resultados da contagem do número e posição de setores nas placas divididas em quadrantes nos diversos tratamentos.

Tabela 5 - Número e posição dos setores em relação ao quadrantes em diferentes temperaturas. (Exp. b).

S e t o r e s	T r a t a m e n t o s														
	30°C					37°C					40°C				
	Quadrantes				To- tal	Quadrantes				To- tal	Quadrantes				To- tal
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4	
A	15	0	0	0	15	50	20	12	16	98	57	18	15	27	117
V	14	4	2	1	21	3	1	3	3	10	3	2	4	5	14
D	1	0	0	2	3	2	3	4	3	12	0	0	3	2	5
H	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	4	2	0	2	8
Total	31	4	2	3	40	55	25	19	22	121	64	22	22	36	144

Com o objetivo de se verificar possíveis relações de vizinhança entre os setores obtidos, principalmente devido aos problemas levantados por AZEVEDO e ROPER (1970) e AZEVEDO (1971) foram feitas 18 inoculações da linhagem A em meio completo, para cada tratamento (30°C, 37°C e 40°C) e os resultados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Número, posição e relação de vizinhança de setores originados da linhagem A incubada em diferentes temperaturas.

Repetições	Tratamentos															
	30°C								37°C							
	Quadrantes								Quadrantes							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	A	-	-	-	1A	-	-	2A	1A	1(A+D)	-	1A	1A	2A	-	3A
2	-	-	-	-	1V	-	-	-	-	1A	-	1A	1A	1A	3A	2A
3	-	-	-	-	1V	-	-	-	-	1A	-	1A	1A	1A	1A	1(A+V+A)
4	2A	-	1V	-	2A	-	-	-	-	2A	-	2A	2A	2A	1A	1(A+D+V)
5	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	1A	-	-	1V	-	-	-	10	-	2A	-	-	2A	2(A+D)	3(A+D)	3A
7	10	-	-	-	1H	-	-	-	-	1H	-	-	2A	1(A+V)	-	1(A+V+H)
8	10	-	-	-	1A	1V	-	1V	1A	2A	2A	1A	2A	1(A+D)	3A	3A
9	1A	1V	-	-	2A	-	-	1V	2A	2A	-	2A	1A	1(A+D)	-	-
10	-	-	-	-	1A	-	-	-	1A	1A	-	-	1A	1A	2A	2A
11	20	-	-	-	1A	-	-	-	1A	1(A+H)	-	-	1A	1A	2A	10
12	10	-	-	-	1A	-	-	-	1A	1A	-	-	2A	-	-	10
13	1V	-	-	-	1A	1A	-	-	1A	1A	-	-	2A	2A	2A+V	1V
14	1A	-	-	10	1(A+D)	-	-	10	-	-	-	-	2A	2A	1A	10
15	1(V+D)	-	-	-	1A	-	-	-	1A	1(A+V)	-	-	1A	1A	1A	2A
16	1A	-	-	-	2A	-	-	-	2A	-	-	-	1A	-	-	1(A+V)
17	1A	-	1A	10	1A	-	-	1A	1A	-	-	1A	1A	-	1A	1A
18	1V	-	-	1(V+D)	-	-	-	-	-	-	-	-	1(A+D+V)	-	10	2A
Total setores	A 8	0	1	0	A 17	4	2	5	6	A 30	17	20	26			
por quadrante	V 3	1	1	2	V 3	2	2	2	1	V 1	1	2	4			
	D 7	0	0	3	D 1	0	2	0	0	0 2	2	3	3			
	H 0	0	0	0	H 1	1	1	0	0	H 0	0	0	1			
Relação de vizinhança entre setores gêmeos ("Twin Spots")																
	A/A = 0				A/A = 0					A/A = 3			A/A = 6			
	A/V = 0				A/V = 0					A/V = 2			A/V = 6			
	A/D = 0				A/D = 0					A/D = 1			A/D = 9			
	A/H = 0				A/H = 0					A/H = 1			A/H = 1			
	V/V = 0				V/V = 0					V/V = 0			V/V = 0			
	V/D = 2				V/D = 0					V/D = 0			V/D = 2			
	V/H = 0				V/H = 0					V/H = 0			V/H = 1			
	D/D = 0				D/D = 0					D/D = 0			D/D = 0			
	D/H = 0				D/H = 0					D/H = 0			D/H = 0			
	H/H = 0				H/H = 0					H/H = 0			H/H = 0			

Na Tabela 6 foram usados os seguintes símbolos:

$\widehat{(A + D)}$, por exemplo = setores vizinhos e gêmeos.

$A + D$, por exemplo = setores vizinhos, porém não gêmeos.

A Figura 5 mostra os valores representativos das médias de tipos e total de setores por tratamento e as Figuras 6 e 7 apresentam as fotografias de 2 séries de placas representativas do ensaio descrito na Tabela 4.

Figura 5 - Média de duas repetições para a frequência de tipos de setores obtidos da linhagem A crescida em diferentes temperaturas.

Figura 6 - Produção de setores em diferentes temperaturas.

Figura 7 - Comparação da produção de setores nas temperaturas de 30°C e 40°C .

5.2. Características dos variantes obtidos espontaneamente e isolados para análise

5.2.1. Variantes deteriorados

Setores com morfologia alterada e coloração diferencial foram escolhidos através de inspeção visual. Foram identificados e isolados, inicialmente, cerca de 20 variantes deteriorados. Destes, entretanto, apenas seis e dois derivativos de 1ª. ordem puderam ser mantidos e utilizados no presente trabalho. Os variantes obtidos puderam ser classificados, de início, nos seguintes grupos:

- a) Variantes muito instáveis: V_{47} e V_{48} , inclusive não tendo sido possível mantê-los, como tais, até o final da parte experimental.
- b) Variante muito estável: V_{49} , do qual não se detectou qualquer setor em todo o experimento.
- c) Variantes tão instáveis quanto à linhagem A original: V_{50} , V_{51} e V_{52} . Os seus derivativos de 1ª. ordem $V_{50,1}$ e $V_{51,1}$ foram muito estáveis, não produzindo qualquer setor.

Os variantes e seus derivativos de 1ª. ordem foram numerados de acordo com a nomenclatura seguida por AZEVEDO

e ROPER (1970).

As características de morfologia das colônias, coloração do micélio e conídios, conidiação, origem e tipos de setores produzidos estão sumarizadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Características gerais dos variantes deteriorados selecionados, todos com genótipo *proA₁* e *pabaA₆*.

Variante	Morfologia	Origem	Tipos de setores produzidos
V ₄₇	Micélio avermelhado, com escassa conidiação; colônia "crinkled", muito instável; conídios amarelos.	A	Amarelos
V ₄₈	Micélio avermelhado, conidiação escassa; "crinkled"; muito instável; conídios amarelos.	A	Amarelos
V ₄₉	Micélio amarelo claro; conidiação média; colônias pouco enrugadas e de bordos irregulares; conídios amarelados; estável; cleistotecial.	A	Nenhum
V ₅₀	Micélio submerso claro; grande quantidade de micélio aéreo; colônias de aparência "fluffy", brancas e "crinkled"; conidiação escassa e lenta (após 72 horas); conídios verdes; instável; apresenta duas fases evolutivas bem distintas, na diferenciação: micelial (até 48 h) e conidial (após 72 h); cleistotecial (grande produção de cleistotécios).	A	"Fluffy"
V _{50.1}	Determinante de 1ª. ordem, isolado com setor de V ₅₀ e apresentando todas as características do V ₅₀ . Entretanto a aparência das colônias é mais "fluffy" e os conídios formados são de coloração amarela; estável.	V ₅₀	Nenhum

- Continua -

Tabela 7 - (Continuação).

Variante	Morfologia	Origem	Tipos de setores produzidos
V ₅₁	Micélio marrom claro; conidiação média; colônias mais "crinkled" que a linhagem A original; conídios verdes; instável.	A	Amarelos Verdes Deteriorados
V _{51.1}	Determinante de 1a. ordem derivado de V ₅₁ ; colônias amarelas, de aspecto normal; conidiação intensa; conídios amarelos; estável.	V ₅₁	Nenhum
V ₅₂	Micélio marrom esverdeado; colônias "crinkled"; conidiação média; conídios verdes; cleistotecial; instável.	A	Amarelos Verdes Deteriorados

As Figuras 8 e 9 mostram: as linhagens *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂ e A originais (8) e os variantes deteriorados derivados da linhagem A (9).

5.2.2. Variantes heterocarióticos

Quanto à morfologia, todos os setores heterocarióticos apresentaram o mesmo aspecto: coloração verde amarela devida à presença de conídios verdes e amarelos misturados. Entretanto, quando uma alíquota de uma suspensão de conídios foi semeada em meio completo pode ocorrer um dos seguintes casos: a) colônias amarelas e verdes, com ambos os tipos de co-

Figura 8 - Linhagens *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂ (à direita) e A (à esquerda).

V₅₀

V_{50.1}

Figura 9 - Variantes deteriorados derivados espontaneamente a partir da linhagem A.

nídeos viáveis; b) colônias verdes com confídios verdes viáveis e amarelos letais; c) colônias amarelas com confídios amarelos viáveis e verdes letais; d) tanto confídios verdes quanto amarelos letais.

No decorrer do presente trabalho foram obtidos setores heterocarióticos dos tipos a) e b), os quais foram numerados de H_1 até H_{16} . A Tabela 8 mostra os tipos de setores heterocarióticos obtidos e o número de colônias amarelas e verdes resultantes de semeadura em meio completo ou de coloração e observação ao microscópio. Como controle foi usado o resultado do cruzamento entre a linhagem A (original) e um segregante $pyroA_4$; yA_2 obtido de cruzamento entre as linhagens A e MSE.

A Figura 10 mostra setor heterocariótico típico.

5.3. Medida da taxa de crescimento das colônias

A Tabela 9 mostra as médias obtidas para o diâmetro de colônias das linhagens $proA_1$; $pabaA_6$; yA_2 , MSE, A e seus derivados deteriorados. Essas medidas representam a média de 10 repetições efetuadas durante 7 dias. As análises de variância para os valores obtidos no 1º e 5º dias de incubação estão na Tabela 10, e as comparações entre cada varian-

Tabela 8 - Tipos de setores heterocarióticos e seus produtos, resultantes de sementeira em meio completo ou observação ao microscópio.

Setor	Colônias (semeadura)			Relação Amarela/Verde viabilidade	Conídios (microscópio)		
	Amare- las	Ver- des	total		Amare- los	Ver- des	Total
H ₁	75	91	166	1:1			
H ₂	401	203	604	2:1			
H ₃	144	880	1024	1:6			
H ₄	128	131	259	1:1			
H ₅	-	169	169	0:1			
H ₆	-	359	359	0:1			
H ₇	-	404	404	0:1			
H ₁₀	-	331	331	0:1			
H ₁₁	-	141	141	0:1			
H ₁₂	-	665	665	0:1			
H ₁₃	-	323	323	0:1			
H ₁₄	-	364	364	0:1			
H ₈	-	182	182	0:1	77	335	412
H ₉	-	272	272	0:1	85	508	593
H ₁₅	-	524	524	0:1	88	497	585
H ₁₆	-	588	588	0:1	97	422	519
Segregante x A pyroA ₄ ; yA ₂	240	40	280	6:1

Figura 10 - Linhagem A apresentando setores heterocarióticos e melhorados.

te com as linhagens testemunhas, obtidas através do teste de Dunnet, estão na Tabela 11. Testes estatísticos foram aplicados apenas para os valores obtidos no 1º e 5º dias porque seria interessante conhecer o comportamento de cada linhagem e variante na "largada" inicial, assim como a evolução do crescimento na placa num período onde ainda diferenças pudessem ser evidenciadas entre os tratamentos. O número de setores produzidos por linhagem e variante está indicado na Tabela 9 e a representação gráfica das médias obtidas para os 7 dias de crescimento está na Figura 11.

Tabela 9 - Média do crescimento em cm de 10 colônias das linhagens A, MSE, *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂ e dos variantes deteriorados originados da linhagem A.

Variante	Média crescimento em cm							Nº de setores produzidos
	1	2	3	4	5	6	7	
V ₄₇	1,00	2,80	4,80	7,00	8,20	8,40	8,80	10
V ₄₈	1,10	2,09	4,68	6,41	8,20	8,54	8,57	9
V ₄₉	1,35	2,83	4,95	7,00	8,68	8,89	8,90	0
V ₅₀	0,60	1,91	2,84	4,68	6,68	7,71	8,44	11
V _{50.1}	0,85	2,47	4,64	6,74	7,59	8,25	8,74	0
V ₅₁	0,89	2,22	3,76	5,28	6,88	8,14	8,70	8
V _{51.1}	0,77	2,43	4,03	6,03	7,59	8,32	8,80	0
V ₅₂	0,94	2,23	3,32	4,62	6,40	7,63	8,25	7
A	0,70	1,91	2,83	3,95	5,01	5,91	6,48	12
<i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂	1,09	2,49	3,77	5,69	7,88	8,32	8,88	0
MSE	0,58	2,44	4,00	5,83	7,64	8,48	8,84	0

.100.

Tabela 10 - Análise de variância para os valores médios obtidos para o 1º e 5º dias de crescimento de colônias de linhagens originais e variantes deteriorados.

Dias de cresci- mento	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.	C.V.
1º	Tratamento	10	6,9405	0,6941	105,800**	
	Resíduo	99	0,6494	0,0065		8,84%
	Total	109	7,5900			
5º	Tratamento	10	88,4030	8,8403	208,793**	
	Resíduo	99	4,1920	0,0423		2,77%
	Total	109	92,5950			

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 11 - Comparação entre tratamentos e as testemunhas pelo teste de Dunnet com relação aos valores médios obtidos para o 1º e 5º dias de crescimento.

Tratamentos	1º dia			5º dia		
	a ⁰	b	c	a ⁰	b	c
V ₄₇	**	**	**	**	**	**
V ₄₈	**	**	**	**	**	**
V ₄₉	**	n.s.	**	**	n.s.	**
V ₅₀	**	**	n.s.	**	**	**
V _{50,1}	**	**	**	**	**	n.s.
V ₅₁	**	**	**	**	**	**
V _{51,1}	**	**	**	**	**	**
V ₅₂	**	**	**	**	**	**

DMS = 0,101 (5%)
0,122 (1%)

DMS = 0,258 (5%)
0,310 (1%)

Na Tabela 11 as testemunhas utilizadas foram:

a⁰ = linhagem A

b = linhagem *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂

c = linhagem MSE

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 11 - Representação gráfica das médias dos diâmetros de colônias com 1 a 7 dias de crescimento. Linhagens A, MSE, proA₁; pabaA₆; yA₂ e variantes deterioradas da linhagem A.

5.4. Medidas microscópicas

5.4.1. De estruturas conidiais

Tanto dos variantes deteriorados quanto dos heterocarióticos foram realizadas medições de algumas das estruturas conidiais. Assim mediram-se: altura e diâmetro do pedúnculo (ap e dp); altura da vesícula (av); altura total do conidióforo ($ac = ap + av$). As mesmas medições foram efetuadas para as linhagens A , MSE e $proA_1$; $pabaA_6$; yA_2 . Em todos os casos 20 medições, ao acaso, foram realizadas para cada elemento da estrutura conidial, utilizando-se sempre material crescido durante 72 horas.

5.4.2. De variantes deteriorados

As Tabelas 12 a 14 mostram os resultados das medições efetuadas, indicando-se os valores médios obtidos e respectivos desvios padrões (Tabela 12) e as análises de variância para as medidas efetuadas em cada estrutura analisada (Tabela 13). Nessas tabelas não estão assinalados os valores de medições para o deteriorado V_{50} e seu derivativo de 1ª ordem $V_{50,1}$. Isto porque esses variantes apresentam estruturas conidiais anômalas: sem célula podal, pedúnculo ou vesícula.

Tabela 12 - Média ($\hat{m}$) de 20 medidas em micra (μ) e respectivos desvios padrões (s) de estruturas conidiais dos variantes deteriorados e das linhagens A, MSE e *proA*₁; *pabaA*₆; *uA*₂.

Variantes deteriorados	Média de 20 medidas em micra (μ)							
	Pedúnculo				Vesícula		Conidióforo	
	altura (ap)		diâmetro (dp)		altura (av)		altura total ac = ap + av	
	$\hat{m}$	s	$\hat{m}$	s	$\hat{m}$	s	$\hat{m}$	s
V ₄₇	69,20±17,525		4,00±0,000		9,50±1,100		78,70±17,903	
V ₄₈	81,20±30,973		3,95±0,224		9,90±1,020		91,10±31,632	
V ₄₉	80,90±27,472		5,00±0,324		12,10±2,382		93,00±28,838	
V ₅₁	98,10±32,298		5,85±0,745		13,80±2,238		111,90±33,090	
V _{51.1}	72,00±23,486		6,00±0,000		9,90±0,447		81,90±23,713	
V ₅₂	78,60±12,072		4,00±0,000		10,00±0,000		88,60±12,072	
A	80,50±27,833		5,45±0,510		10,10±0,447		90,60±27,948	
<i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>uA</i> ₂	79,60±17,419		4,05±0,394		11,50±1,701		91,00±18,336	
MSE	61,10±11,742		4,65±0,489		10,00±0,000		71,10±11,742	

Tabela 13 - Análise de variância para os valores médios obtidos de altura e diâmetro do pedúnculo; altura da vesícula e altura do conidióforo em variantes deteriorados.

	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.	C.V.
a) Altura do pedúnculo	Tratamento	8	16616,178	2077,022	3,75**	
	Resíduo	171	94574,400	553,067		30,18%
	Total	179	111190,578			
b) Diâmetro do pedúnculo	Tratamento	8	111,712	13,964	91,87**	
	Resíduo	171	25,950	0,152		8,17%
	Total	179	137,662			
c) Altura da vesícula	Tratamento	8	633,245	79,156	55,08**	
	Resíduo	171	310,400	1,437		11,15%
	Total	179	322,845			
d) Altura do conidióforo	Tratamento	8	20480,980	2560,122	4,42**	
	Resíduo	171	99007,799	578,993		27,15%
	Total	179	119488,778			

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

As comparações entre os variantes deteriorados e linhagens originais, através das medições efetuadas, foram realizadas através do teste de Dunnet, cujos resultados estão na Tabela 14.

5.4.3. De setores heterocarióticos

A Tabela 15 apresenta os resultados das médias e desvios padrões respectivos obtidos para os setores heterocarióticos e linhagens originais. As análises de variância para as medições efetuadas em cada elemento analisado estão apresentadas na Tabela 16. Para as comparações entre os setores heterocarióticos e as linhagens originais utilizou-se o teste de Dunnet, cujo resultado está na Tabela 17. As medições foram realizadas para alguns dos setores obtidos e não para todos devido ao grande número de medidas implicadas e também à homogeneidade de comportamento dos setores analisados. Devido ao fato desses setores apresentarem, após semeadura em meio completo, viabilidade diferencial para conídios amarelos e verdes, apenas as colônias resultantes da germinação de conídios viáveis foram analisadas e, em separado. Além disso, como não foi possível a germinação de conídios letais (item 5.4.8.3.) nenhuma medida de estruturas conidiais, nesses casos, foi efetuada.

Tabela 14 - Comparação entre os tratamentos e as testemunhas pelo teste de Dunnet para os valores médios de altura e diâmetro do pedúnculo; altura da vesícula e altura do conidióforo em variantes deteriorados.

Tratamentos	Pedúnculo						Vesícula			Conidióforo		
	altura			diâmetro			altura			altura		
	a ⁰	b	c	a ⁰	b	c	a ⁰	b	c	a ⁰	b	c
V ₄₇	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
V ₄₈	n.s.	n.s.	*	**	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	*
V ₄₉	n.s.	n.s.	*	**	**	*	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	*
V ₅₁	n.s.	n.s.	**	**	**	**	**	**	**	*	*	**
V _{51,1}	n.s.	n.s.	n.s.	**	**	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
V ₅₂	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
DMS = 19,693(5%) DMS = 0,326(5%) DMS = 1,004(5%) DMS = 20,149(5%)												
23,713(1%) 0,393(1%) 1,209(1%) 24,264(1%)												

a⁰ = linhagem A

b = linhagem *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂

c = linhagem MSE

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 15 - Média de 20 medidas em micra ($\hat{m}$) e seus respectivos desvios padrões (s) de estruturas conidiais de componentes de setores heterocarióticos e das linhagens A, MSE e $proA_1$; $pabaA_6$; yA_2 .

Setores heterocarióticos		Média de 20 medidas em micra (μ)							
		Pedúnculo				Vesícula		Conidióforo	
		altura (ap)		diâmetro (dp)		altura(av)		altura total ac = ap + av	
		$\hat{m}$	s	$\hat{m}$	s	$\hat{m}$	s	$\hat{m}$	s
H_1	A	75,70±23,272		4,70±0,470		10,10±1,021		85,80±23,565	
	V	71,80±11,945		3,88±0,338		10,10±1,774		81,90±11,956	
H_2	A	72,30±29,617		4,80±0,410		10,00±0,000		82,30±29,617	
	V	85,60±29,348		4,95±0,224		10,70±1,342		96,30±29,586	
H_3	A	59,90±14,704		4,05±0,224		9,70±0,979		69,60±15,087	
	V	78,20±20,794		4,00±0,000		9,60±1,231		87,80±21,637	
H_5	V	45,00±21,730		4,65±0,489		9,20±1,196		54,20±22,505	
H_6	V	55,00±23,129		4,00±0,000		9,80±1,281		64,80±24,025	
H_7	V	62,70±21,592		4,85±0,366		9,70±0,979		72,40±22,030	
A		80,50±27,853		5,45±0,510		10,10±0,447		90,60±27,948	
$proA_1$; $pabaA_6$; yA_2		79,60±17,419		4,05±0,394		11,50±1,701		91,00±18,336	
MSE		61,10±11,742		4,65±0,489		10,00±0,000		71,10±11,742	

A = Amarelo

V = Verde

Tabela 16 - Análise de variância para os valores obtidos da medição de altura e diâmetro do pedúnculo, altura da vesícula e altura do conidióforo de componentes de setores heterocarióticos.

	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.	C.V.
a) Altura do pedúnculo	Tratamento	11	32506,200	2955,109	6,16**	
	Resíduo	228	109453,200	480,058		31,78%
	Total	239	141959,400			
b) Diâmetro do pedúnculo	Tratamento	11	50,400	4,582	31,66**	
	Resíduo	228	33,000	0,145		8,36%
	Total	239	83,400			
c) Altura da vesícula	Tratamento	11	75,383	6,853	5,28**	
	Resíduo	228	296,200	1,299		11,35%
	Total	239	371,583			
d) Altura do conidióforo	Tratamento	11	36722,600	3338,418	7,98**	
	Resíduo	228	95384,000	418,351		25,91%
	Total	239	132106,600			

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 17 - Comparação entre os tratamentos e as testemunhas pelo teste de Dunnet para os valores médios de altura e diâmetro do pedúnculo, altura da vesícula e altura do conidióforo de componentes de setores heterocarióticos.

Tratamentos		Pedúnculo						Vesícula			Conidióforo		
		altura (ap)			diâmetro(dp)			altura (av)			altura (ac)		
		a ⁰	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
H ₁	A	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	V	n.s.	n.s.	n.s.	**	**	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
H ₂	A	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	V	n.s.	n.s.	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**
H ₃	A	*	*	n.s.	**	**	**	n.s.	**	n.s.	*	**	n.s.
	V	n.s.	n.s.	n.s.	**	**	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
H ₅	V	**	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	**	n.s.
H ₆	V	**	**	n.s.	**	**	**	n.s.	**	n.s.	**	**	n.s.
H ₇	V	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	*	*	n.s.
		DMS= 19,234(5%)			DMS= 0,334(5%)			DMS= 1,001(5%)			DMS= 17,955(5%)		
		22,795(1%)			0,396(1%)			1,186(1%)			21,293(1%)		

a⁰ = linhagem A

b = linhagem *proA₁; pabaA₆; yA₂*

c = linhagem MSE

A = Amarelo

V = Verde

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

5.4.4. Alterações na estrutura conidial detectadas através de análise microscópica

Através da inspeção microscópica dos bordos de lamínulas após 72 horas de crescimento em meio completo (item 4.8.1.) foi possível, através de comparação com as linhagens originais, a detecção de alterações nas estruturas conidiais de alguns variantes deteriorados e heterocarióticos. A Tabela 18 mostra um sumário das características microscópicas de variantes deteriorados e das linhagens originais. Ao lado de cada descrição está um desenho esquemático, contendo uma síntese das principais alterações observadas em todos os campos analisados (ocular 10x e objetiva 43x). Para alguns casos especiais, e quando foi possível, incluíram-se microfotografias.

Quanto aos setores heterocarióticos notou-se uma similaridade nas suas estruturas conidiais. Assim, em lugar de apresentar todos foram escolhidos alguns que pudessem ser representativos. Foram escolhidos: um variante que apresentou proporção 1:1 para viabilidade entre conídios amarelos e verdes e outro que apresentou, 0:1. A Tabela 19 mostra as características e esquemas das estruturas observadas nos setores escolhidos.

Tabela 18 - Características microscópicas dos variantes deteriorados e das linhagens A, MSE e *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂ (crescidos durante 72 horas).

Variantes	Características	
V ₄₇	Hifas transparentes e estruturas conidiais mais escuras; conídios amarelos e abundantes, estruturas conidiais contendo: célula podal, pedúnculo, vesícula e duas camadas de esterigmas.
V ₄₈	Hifas claras e conidióforos mais escuros; conídios amarelos e abundantes; muitos conidióforos e apresentando célula podal, pedúnculo reto, na maioria das vezes, vesícula e 2 camadas de esterigmas.
V ₄₉	Hifas transparentes e conidióforos marrons; conídios amarelados e em número médio; estrutura conidial com ou sem célula podal, com conidióforos tortuosos ou não e vesícula. Presença de grande quantidade de células de Hülle. Conidióforos septado ou não e apresentando poucos esterigmas, em alguns casos.

Tabela 18 - Continuação.

Variantes	Características	
V ₅₀	Conidiação tardia; com 72 horas observam-se quase que apenas hifas transparentes em grande quantidade; quando presente, a estrutura conidial é anômala: os esterigmas saem diretamente das hifas, faltando célula podal, pedúnculo e vesícula. Hifas claras intercaladas com formações globosas; conídios verdes.
V _{50.1}	Grande quantidade de hifas transparentes; conídios amarelos; intenso micélio aéreo; estruturas conidiais anômalas semelhantes às do V ₅₀ .

Fase micelial (48 hs.) do V₅₀ (10x; 6,3x).

Fase conidial (+ 72 hs.) do V₅₀, apresentando estru_turas conidiais anômalas (10x; 16x).

Tabela 18 - Continuação.

Varian- tes	Características	
V ₅₁	<p>Hifas e conidióforos claros; conídios verdes, arredondados; conidióforo com pedúnculos muitos longos, <u>nor</u>mais ou muito curtos. Conidióforo septado ou não; <u>gran</u>de quantidade de células de Hülle. Estruturas conidiais anômalas, entre as normais: sem pedúnculo, vesícula ou célula podal.</p>	
V _{51.1}	<p>Hifas transparentes; conidióforo escuro, estruturas conidiais normais; conidiação intensa; conídios amarelos.</p>	

Tabela 18 - Continuação.

Varian- tes	Características	
V ₅₂	Hifas claras, tortuosas, <u>gr</u> o <u>s</u> as e muito ramificadas; conidióforo claro e tortuoso, contendo célula podal, pedú <u>n</u> culo, vesícula e duas camadas de esterigmas. Conidiófo <u>r</u> o septado e presença de células de Hülle. Presença de conídios germinando na própria estrutura conidial. Ocor <u>r</u> ência de conidióforo normal entre os anômalos. Hifas mu <u>i</u> to ramificadas. Vesícula com poucas fileiras de esterigmas.
A	Hifas claras e ramificadas; conidióforo normal, sem septos, nem ramificação, conídios verdes e arredondados.

Tabela 18 - Continuação.

Variantes	Características	
MSE	Hifas muito finas, transparentes e tortuosas; conidióforo de cor marrom, não septado e normal; conídios brancos, arredondados, muito pequenos, porém em grande número.
<i>proA₁;</i> <i>pabaA₆;</i> <i>yA₂</i>	Hifas claras; transparentes; conidióforo mais escuro e normal; parede grossa; conídios amarelos em abundância; presença de célula podal; <u>co</u> nidióforos de comprimento uniforme, em geral.

Tabela 19 - Características microscópicas de alguns variantes heterocarióticos.

Varian- tes	Características
H ₁ amarelo	Hifas claras,ramificadas; co nídios amarelos redondos; co nidióforos normais,sem septa ção.
H ₁ verde	Hifas transparentes; conidió foros escuros e normais. Pre sença de célula de Hülle; co nídios verdes. Conidióforos saindo próximos, uns aos ou tros.
H ₅ verde	Hifas transparentes; coní dios verdes arredondados; co nidióforos de vários tama nhos, não septados; mesma hi fa originando vários conidió foros.

5.4.5. Observação de algumas etapas da conidiogênese

Com o objetivo de se acompanhar algumas fases da conidiação em variantes deteriorados, heterocarióticos e linhagens originais, foram analisados os crescimentos em lamínula sobre meio completo com intervalos de 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas. Tais observações foram realizadas para alguns dos variantes envolvidos. Para cada intervalo de tempo utilizou-se uma lamínula por tratamento; da observação microscópica das amostras fizeram-se desenhos esquemáticos representativos. Os resultados de tais observações estão esquematicamente colocados na Figura 12, cuja apresentação foi inspirada em *SMITH e col. (1977)*.

5.4.6. Diâmetro de conídios e seus núcleos; número de núcleos

5.4.6.1. Em variantes deteriorados

A Tabela 20 mostra os valores médios ($\bar{m}$) e os respectivos desvios padrões (s) dos diâmetros de 25 conídios haplóides e de seus núcleos para os variantes deteriorados e linhagens A, *MSE proA₁; pabaA₆; yA₂*. Os resultados da análise de variância dos dados apresentados na Tabela 20 estão colocados na Tabela 21. Para a comparação entre os diâmetros de conídios e núcleos de variantes deteriorados e linhagens

I - A	IV - H ₂ Amarelo
II - V ₄₉	V - MSE
III - H ₂ Verde	VI - V ₅₀

Figura 12 - O "relógio" da conidiogênese para alguns dos variantes deteriorados (V₄₉ e V₅₀), heterocarióticos (H₂ A e V) e linhagens originais (A e MSE).

originais utilizou-se o teste de Dunnet, cujo resultado está apresentado na Tabela 22. As porcentagens de conídios uni, bi e trinucleados nesses variantes e linhagens originais estão estimadas na Tabela 23.

Do cruzamento de variantes deteriorados com a linhagem *MSE*, assim como das linhagens *A* e *proA₁*; *pabaA₆*; *yA₂* também com a *MSE* obtiveram-se diplóides através do ciclo parassexual e destes, foram medidos 25 conídios e respectivos núcleos, por tratamento.

Os valores médios e respectivos desvios padrões dessas medições estão apresentados na Tabela 24, assim como a análise de variância que pode ser observada na Tabela 25. As comparações entre tratamentos e testemunhas pelo teste de Dunnet acham-se na Tabela 26 e as porcentagens de conídios uni, bi e trinucleados estão estimados na Tabela 27.

5.4.6.2. Em setores heterocarióticos

De setores heterocarióticos foram medidos os diâmetros de conídios e núcleos haplóides amarelos e verdes, separadamente. No caso de letalidade de um dos componentes apenas os conídios viáveis foram medidos. Entretanto, através de técnica especial, foi possível a medição de conídios e núcleos de alguns letais (ítems 5.4.8. e 5.4.8.2.).

Tabela 20 - Valores médios ($\bar{m}$) e respectivos desvios padrões (s) de 25 conídios haplóides e de seus núcleos nas variantes deteriorados e linhagens A, MSE e *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂.

Variantes deteriorados	Diâmetro em micra (μ)			
	Conídio		Núcleo	
	$\bar{m}$	s	$\bar{m}$	s
V ₄₇	2,82 ± 0,216		1,09 ± 0,117	
V ₄₈	3,01 ± 0,176		1,22 ± 0,132	
V ₄₉	3,20 ± 0,311		1,25 ± 0,122	
V ₅₀	3,51 ± 0,285		1,28 ± 0,111	
V _{50.1}	3,10 ± 0,242		1,14 ± 0,106	
V ₅₁	3,12 ± 0,230		1,23 ± 0,126	
V _{51.1}	2,92 ± 0,163		0,98 ± 0,086	
V ₅₂	3,43 ± 0,452		1,19 ± 0,166	
A	3,17 ± 0,230		1,34 ± 0,125	
<i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂	2,98 ± 0,208		1,14 ± 0,094	
MSE	2,82 ± 0,172		1,14 ± 0,119	

Tabela 21 - Análise da variância da medida de diâmetro de conídios e núcleos haplóides de variantes deteriorados e linhagens originais.

	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.	C.V.
a) Diâmetro do conídio	Tratamento	10	12,656	1,266	2,86**	21,46%
	Resíduo	264	116,911	0,443		
	Total	274	129,568			
b) Diâmetro do núcleo	Tratamento	10	52,786	5,278	363,87**	10,12%
	Resíduo	264	3,829	0,014		
	Total	274	56,616			

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 22 - Comparação entre os tratamentos e as testemunhas pelo teste de Dunnet, para os valores obtidos de diâmetros de conídios e núcleos haplóides de variantes deteriorados.

Tratamentos	Ø Conídios			Ø Núcleos		
	a ⁰	b	c	a ⁰	b	c
V ₄₇	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.
V ₄₈	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.
V ₄₉	n.s.	n.s.	n.s.	*	**	**
V ₅₀	n.s.	*	**	n.s.	**	**
V _{50.1}	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.
V ₅₁	n.s.	n.s.	n.s.	*	*	*
V _{51.1}	n.s.	n.s.	n.s.	**	**	**
V ₅₂	n.s.	n.s.	**	**	n.s.	n.s.
DMS = 0,51 (5%)				DMS = 0,09 (5%)		
0,61 (1%)				0,11 (1%)		

a⁰ = linhagem A

b = linhagem *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂

c = linhagem MSE

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 23 - Frequência de confídios haplóides uni, bi e trinucleados em variantes deteriorados e linhagens originais.

Variantes deteriorados	Frequência de núcleos			Número de confídios analisados
	1	2	3	
V ₄₇	100,00	0,00	0,00	459
V ₄₈	100,00	0,00	0,00	469
V ₄₉	100,00	0,00	0,00	446
V ₅₀	94,58	5,42	0,00	424
V _{50,1}	99,21	0,79	0,00	477
V ₅₁	99,59	0,41	0,00	730
V _{51,1}	100,00	0,00	0,00	496
V ₅₂	100,00	0,00	0,00	550
A	100,00	0,00	0,00	526
<i>proA₁;pabaA₆;yA₂</i>	99,18	0,82	0,00	464
MSE	99,80	0,20	0,00	491

Tabela 24 - Valores médios ($\hat{m}$) e respectivos desvios padrões (s) de confídios diplóides e de seus núcleos, resultantes do cruzamento de variantes deteriorados, linhagem A e *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂ com a linhagem MSE.

Diplóides	Diâmetro em micra (μ)			
	Confídio		Núcleo	
	$\hat{m}$	s	$\hat{m}$	s
<i>V</i> ₄₇ // MSE	3,99	± 0,263	1,52	± 0,098
<i>V</i> ₄₈ // MSE	3,80	± 0,347	1,36	± 0,095
<i>V</i> ₄₉ // MSE	3,91	± 0,255	1,36	± 0,106
<i>V</i> ₅₀ // MSE	3,93	± 0,187	1,42	± 0,088
<i>V</i> _{50.1} // MSE	4,00	± 0,666	1,59	± 0,160
<i>V</i> ₅₁ // MSE	3,99	± 0,325	1,59	± 0,154
<i>V</i> _{51.1} // MSE	4,01	± 0,325	1,62	± 0,325
<i>V</i> ₅₂ // MSE	4,01	± 0,742	1,58	± 0,165
<i>A</i> // MSE	4,06	± 0,272	1,62	± 0,087
<i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂ // MSE	3,71	± 0,246	1,34	± 0,085

Tabela 25 - Análise de variância para as medidas de diâmetro de confídios diplóides resultantes do cruzamento de variantes deteriorados e linhagens originais com a linhagem MSE.

	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.	C.V.
a) Diâmetro do confídio	Tratamento	9	3,879	0,431	2,10 n.s.	
	Resíduo	240	49,320	0,205		11,45%
	Total	249	53,320			
b) Diâmetro do núcleo	Tratamento	9	3,382	0,376	2,32 n.s.	
	Resíduo	240	3,883	0,162		26,78%
	Total	249	7,265			

n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 26 - Comparação entre os tratamentos e as testemunhas pelo teste de Dunnet, para os valores de diâmetro de confídios e núcleos diplóides de variantes deteriorados.

Tratamentos	Ø Confídios		Ø Núcleos	
	a ₁ ⁰	b ₁	a ₁ ⁰	b ₁
V ₄₇	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
V ₄₈	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
V ₄₉	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
V ₅₀	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
V _{50.1}	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
V ₅₁	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
V _{51.1}	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
V ₅₂	n.s.	**	n.s.	n.s.
DMS = 0,35 (5%) 0,42 (1%)		DMS = 0,31 (5%) 0,37 (1%)		

a_1^0 = Diplóide resultante do cruzamento A//MSE.

b_1 = Diplóide resultante do cruzamento *proA₁; pabaA₆; yA₂*//MSE.

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 27 - Frequência dos confídios uni, bi e trinucleados nas linhagens diplóides..

Diplóides	Frequência de núcleos			Número de confídios analisados
	1	2	3	
V ₄₇ // MSE	100,00	0,00	0,00	708
V ₄₈ // MSE	98,82	1,18	0,00	425
V ₄₉ // MSE	100,00	0,00	0,00	267
V ₅₀ // MSE	99,12	0,88	0,00	340
V _{50.1} // MSE	99,54	0,23	0,23	444
V ₅₁ // MSE	99,67	0,33	0,00	301
V _{51.1} // MSE	100,00	0,00	0,00	572
V ₅₂ // MSE	99,04	0,72	0,24	418
A// MSE	100,00	0,00	0,00	338
proA ₁ ; pabaA ₆ ; yA ₂ // MSE	100,00	0,00	0,00	602

A Tabela 28 apresenta os valores médios obtidos para os diâmetros de conídios e núcleos de setores heterocarióticos e linhagens originais envolvidas. Nas Tabelas 29 e 30 estão as análises de variância e teste de Dunnet aplicados aos valores obtidos para medidas de diâmetro de conídios e núcleos, respectivamente. Já na Tabela 31 estão as frequências obtidas para conídios uni, bi e trinucleados.

5.4.7. Medida da taxa de germinação em conídios

Para se avaliar o comportamento dos variantes deteriorados e heterocarióticos quanto à capacidade e tempo de germinação utilizaram-se dois métodos. (ítems 4.8.4.1 e 4.8.4.2., descritos anteriormente).

5.4.7.1. Germinação em blocos de meio completo, entre lâmina e lamínula

Este método foi utilizado para se avaliar a capacidade de germinação das linhagens e variantes envolvidos após um período longo (12 horas) de crescimento e compará-la com as linhagens duplicada e não duplicada. As Tabelas 32 e 33 mostram os resultados obtidos para a germinação de variantes deteriorados e heterocarióticos, respectivamente. Em ambas estão também assinaladas as taxas obtidas para as linhagens controle. Para os variantes V_{50} e $V_{50.1}$ que apresentam

Tabela 28 - Valores médios ($\hat{m}$) dos diâmetros de confídios haplóides e de seus núcleos e respectivos desvios padrões (s) em setores heterocarióticos e linhagens A, MSE e *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂.

Variantes heterocarióticas		Diâmetro em micra (μ)			
		Confídio		Núcleo	
		$\hat{m}$	s	$\hat{m}$	s
H ₁	A	3,03	± 0,211	1,16	± 0,111
	V	3,10	± 0,204	1,15	± 0,131
H ₂	A	2,81	± 0,163	1,05	± 0,108
	V	3,15	± 0,202	1,22	± 0,114
H ₃	A	3,07	± 0,171	1,27	± 0,134
	V	3,09	± 0,334	1,23	± 0,095
H ₄	A	3,07	± 0,194	1,21	± 0,170
	V	3,06	± 0,175	1,24	± 0,104
H ₅	V	3,07	± 0,187	1,19	± 0,085
H ₆	V	3,13	± 0,138	1,19	± 0,094
H ₇	V	3,10	± 0,222	1,23	± 0,110
A		3,17	± 0,230	1,34	± 0,125
<i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂		2,82	± 0,172	1,14	± 0,119
MSE		2,98	± 0,208	1,14	± 0,094

A = Amarelo

V = Verde

Tabela 29 - Análise da variância dos valores obtidos para diâmetro de confídios e núcleos em setores heterocarióticos e linhagens originais.

	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.	C.V.
a) Diâmetro do confídio	Tratamento	13	3,844	0,296	7,02**	
	Resíduo	336	14,186	0,0421		6,73%
	Total	349	18,029			
b) Diâmetro do núcleo	Tratamento	13	1,536	0,118	8,95**	
	Resíduo	336	4,522	0,0135		9,51%
	Total	349	6,063			

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 30 - Comparação entre os tratamentos e as testemunhas pelo teste de Dunnet para os valores de diâmetro de confídios e núcleos haplóides de setores hetero_carióticos.

Trata- mentos		Ø Confídios			Ø Núcleos		
		a ⁰	b	c	a	b	c
H ₁	A	n.s.	**	*	**	n.s.	n.s.
	V	n.s.	**	*	**	n.s.	n.s.
H ₂	A	**	n.s.	n.s.	**	*	*
	V	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	n.s.
H ₃	A	n.s.	**	n.s.	n.s.	**	**
	V	n.s.	**	n.s.	**	*	*
H ₄	A	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	n.s.
	V	n.s.	**	n.s.	**	**	**
H ₅	V	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	n.s.
H ₆	V	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	n.s.
H ₇	V	n.s.	**	n.s.	**	*	*
DMS = 0,161 (5%) 0,194 (1%)				DMS = 0,090 (5%) 0,108 (1%)			

a⁰ = Linhagem A
 b = Linhagem *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂
 c = Linhagem MSE

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 31 - Frequência de confídios uni, bi e trinucleados em setores heterocarióticos e linhagens originais.

Setores heterocarióticos		Frequência de núcleos			Número de confídios analisados
		1	2	3	
H ₁	A	100,00	0,00	0,00	581
	V	100,00	0,00	0,00	485
H ₂	A	100,00	0,00	0,00	910
	V	100,00	0,00	0,00	549
H ₃	A	100,00	0,00	0,00	488
	V	100,00	0,00	0,00	461
H ₄	A	100,00	0,00	0,00	595
	V	100,00	0,00	0,00	586
H ₅	V	100,00	0,00	0,00	492
H ₆	V	100,00	0,00	0,00	696
H ₇	V	100,00	0,00	0,00	434
A		100,00	0,00	0,00	526
<i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂		99,18	0,82	0,00	464
MSE		99,80	0,20	0,00	491

duas fases distintas: a) micelial, livre de conídios até 48 horas de crescimento; b) conidial, com formação de conídios após 72 horas de incubação, fizeram-se medidas da taxa de germinação nas duas fases.

As Figuras 13 e 14 referem-se às Tabelas 32 e 33, respectivamente.

5.4.7.2. Germinação em meio completo líquido

Este método foi utilizado para se estimar o tempo e a capacidade de germinação iniciais tanto para os variantes envolvidos no presente trabalho quanto para as linhagens portadoras ou não de duplicação. Além disso, permitiu o acompanhamento da germinação em intervalos de tempo determinados. Nesse caso os conídios foram inoçulados, por tratamento, em meio completo líquido e amostras foram analisadas, ao microscópio, em intervalos de 4, 8 e 12 horas.

As Tabelas 34 e 35 mostram o número e a porcentagem de conídios germinando nos tempos de 4, 8 e 12 horas, tanto para variantes deteriorados (Tabela 34) quanto para heterocarióticos (Tabela 35). Em ambos os casos foram avaliadas as taxas de germinação nas linhagens controle. As Figuras 15 e 16 mostram a representação gráfica dos resultados apresentados nas Tabelas 34 e 35, respectivamente.

Tabela 32 - Número e porcentagem de conídios germinando (G) e não germinando (N/G) de variantes deteriorados e linhagens A, MSE e *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂, em blocos de meio completo.

Variantes deteriorados	Tempo de germinação - 12 horas				Total de conídios analisados
	Conídios germinando		Conídios não germinando		
	N	%	N	%	
V ₄₇	342	96,88	11	3,12	353
V ₄₈	469	93,24	34	6,76	503
V ₄₉	259	84,92	46	15,08	305
V ₅₀ - Conidial	274	93,52	19	6,48	293
- Micelial	0	0,00	0	0,00	0
V _{50,1} - Conidial	323	80,75	77	19,25	400
- Micelial	0	0,00	0	0,00	0
V ₅₁	288	55,07	235	44,93	523
V _{51,1}	260	97,01	8	2,99	268
V ₅₂	345	88,46	45	11,54	390
A	228	90,48	24	9,52	252
proA ₁ ; pabaA ₆ ; yA ₂	251	97,67	6	2,33	257
MSE	309	83,51	61	16,49	370

Tabela 33 - Número e porcentagem de conídios germinando (G) e não germinando (N/G), de setores heterocarióticos e linhagens A, *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂ e MSE, em blocos de meio completo entre lâminas e lamínula.

Setores heterocarióticos		Tempo de germinação - 12 horas				Total de conídios analisados
		Conídios germinando		Conídios não germinando		
		N	%	N	%	
H ₁	A	271	78,55	74	21,45	345
	V	188	98,95	2	1,05	190
H ₂	A	322	91,74	29	8,26	351
	V	468	90,87	47	9,13	515
H ₃	A	329	96,76	11	3,24	340
	V	363	97,32	10	2,68	373
H ₄	A	543	82,65	114	17,35	657
	V	459	93,67	31	6,33	490
H ₅	V	333	99,11	3	0,89	336
H ₆	V	221	97,79	5	2,21	226
H ₇	V	391	97,02	12	2,98	403
A		228	90,48	24	9,52	252
proA ₁ ; pabaA ₆ ; yA ₂		251	97,67	6	2,33	257
MSE		309	83,51	61	16,49	370

A = Amarelo

V = Verde

Figura 13 - Representação gráfica da porcentagem de germinação de conídios de variantes deteriorados e linhagens A, MSE e *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂ em blocos de meio completo durante 12 horas.

*Para os variantes V₅₀ e V_{50.1} estão assinalados apenas os valores obtidos na fase conidial.

Figura 14 - Representação gráfica da porcentagem de germinação de conídios de setores heterocarióticos e linhagens A, MSE e *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂ em blocos de meio completo durante 12 horas.

Tabela 34 - Número e porcentagem de conídios germinando em meio completo líquido com 4, 8 e 12 horas para variantes deteriorados e linhagens A, MSE e *proA₁;pabaA₆;yA₂*.

Variantes deteriorados	Tempo de germinação								
	4 horas			8 horas			12 horas		
	N	%	Total conídios	N	%	Total conídios	N	%	Total conídios
V ₄₇	38	33,93	112	57	43,18	132	69	53,91	128
V ₄₈	47	36,72	128	68	51,91	131	98	70,00	140
V ₄₉	41	34,17	120	70	56,91	123	75	68,81	109
V ₅₀ - Conidial	31	21,83	142	33	21,02	157	29	24,37	119
- Micelial	0	0,00	0	0	0,00	0	0	0,00	0
V _{50.1} -Conidial	63	62,38	101	79	77,45	102	81	89,01	91
-Micelial	0	0,00	0	0	0,00	0	0	0,00	0
V ₅₁	90	55,56	162	99	58,58	169	118	61,46	192
V _{51.1}	42	30,00	140	73	54,48	134	78	53,42	146
V ₅₂	64	54,24	118	77	64,71	119	79	84,95	93
A	30	17,24	174	64	30,48	210	98	48,28	203
<i>proA₁;pabaA₆;yA₂</i>	58	32,40	179	78	55,71	140	108	71,05	152
MSE	6	2,37	253	22	8,18	269	30	12,66	237

Tabela 35 - Número e porcentagem de confídios germinando em meio completo líquido com 4, 8 e 12 horas para setores heterocarióticos e linhagens A, MSE e *proA₁*; *pabaA₆*; *yA₂*.

Variantes heterocarióticas		Tempo de germinação								
		4 horas			8 horas			12 horas		
		N	%	Total confídios	N	%	Total confídios	N	%	Total confídios
H ₁	A	45	37,50	120	54	39,42	137	79	53,02	149
	V	59	44,70	132	78	54,55	143	112	70,89	158
H ₂	A	38	30,89	123	50	35,97	139	79	51,97	152
	V	45	34,61	130	115	66,86	172	171	93,96	182
H ₃	A	34	31,19	109	47	39,17	120	95	73,64	129
	V	45	38,13	118	56	40,88	137	103	75,73	136
H ₄	A	58	38,93	149	73	45,06	162	87	55,06	158
	V	63	42,00	150	81	50,94	159	89	57,42	155
H ₅	V	42	28,38	148	59	37,58	157	71	47,65	149
H ₆	V	32	19,63	163	55	32,35	170	67	37,64	178
H ₇	V	57	40,14	142	78	51,66	151	117	73,12	160
A		30	17,24	174	64	30,48	210	98	48,28	203
<i>proA₁</i> ; <i>pabaA₆</i> ; <i>yA₂</i>		58	32,40	179	78	55,71	140	108	71,05	152
MSE		6	2,37	253	22	8,18	269	30	12,66	237

A = Amarelo

V = Verde

Figura 15 - Germinação de conídios de variantes deteriorados e linhagens originais em meio completo líquido em diferentes tempos de incubação.

Figura 16 - Germinação de conídios de setores heterocarióticos e das linhagens originais em meio completo líquido em diferentes tempos de incubação.

5.4.8. Manipulação de conídios apresentando letalidade em setores heterocarióticos

Utilizando-se a técnica especialmente desenvolvida (ítem 4.9.) para a análise de conídios letais em setores heterocarióticos, pode-se obter para esse tipo de variante dados relativos à: frequência de conídios amarelos e verdes através de análise microscópica, diâmetro de conídios e núcleos de haplóides e diplóides, taxa de germinação e análises mitótica e meiótica. Para facilitar a apresentação dos resultados os dados obtidos serão separados por assunto.

5.4.8.1. Frequência de conídios amarelos (letais) e verdes

Através da coloração diferencial de conídios amarelos e verdes pelo método HCl - Giemsa foi possível a contagem do número de conídios letais e viáveis em heterocarióticos onde, através de semeadura prévia, foi detectada a ocorrência de inviabilidade de conídios. Desse modo foi possível uma avaliação da proporção de tipos de conídios presentes em cada setor analisado. A Tabela 36 apresenta o número e porcentagem de conídios amarelos (letais) e verdes para alguns dos setores, onde foi possível a aplicação da técnica especial. A Figura 17 apresenta um campo microscópico (objetiva 100 x 1,25 x 3,2) contendo conídios amarelos letais (claros) e verdes viáveis (mais escuros) do setor heterocariótico H₈.

Tabela 36 - Número e frequência de colônias e conídios amarelos (letais) e verdes (viáveis) em setores heterocarióticos, através de semeadura e observação microscópica.

Setor Heterocariótico	Colônias (semeadura)					Conídios (microscópio)				
	Amarelas		Verdes		Total	Amarelos		Verdes		Total
	N	%	N	%		N	%	N	%	
H ₆	0	0,00	665	100,00	665	77	18,69	335	81,31	412
H ₉	0	0,00	323	100,00	323	85	14,33	508	85,67	593
H ₁₅	0	0,00	524	100,00	524	88	15,04	497	84,96	585
H ₁₆	0	0,00	588	100,00	588	97	18,69	422	81,31	519

Figura 17 - Conídios amarelos (claros) e verdes (escuros) do H₈ (objetiva 100 x 1,25 x 3,2).

5.4.8.2. Valores médios dos diâmetros de confídios e núcleos letais e não letais em setores heterocarióticos

A Tabela 37 apresenta os valores médios obtidos para diâmetro de confídios e núcleos, de 25 medidas ao acaso, em lâminas preparadas pelo método HCl - Giemsa. As medidas foram realizadas separadamente para confídios amarelos (letais) e verdes (viáveis), embora ambos estivessem contidos na mesma amostragem. A Tabela 38 apresenta a análise da variância para os valores obtidos, e na Tabela 39 estão apresentadas as comparações entre os tratamentos e as testemunhas pelo teste de Dunnet.

A Tabela 40 apresenta os valores obtidos da medida do diâmetro de confídios e núcleos diplóides obtidos do cruzamento entre os confídios amarelos (letais) e verdes (viáveis) de setores heterocarióticos com a linhagem MSE. Os diplóides foram obtidos através de técnica especial (ítems 4.9. e 4.9.4.). A Tabela 41 apresenta a análise da variância dos dados contidos na Tabela 40 e as comparações entre os diâmetros de confídios e núcleos de setores heterocarióticos e linhagens originais, pelo teste de Dunnet encontram-se na Tabela 42.

Tabela 37 - Valores médios ($\bar{m}$) de diâmetros de 25 confídios e núcleos haplóides e seus respectivos desvios padrões (s) em setores heterocarióticos e linhagens originais.

Setores heterocarióticos		Diâmetro em micra (μ)			
		Confídio		Núcleo	
		$\bar{m}$	s	$\bar{m}$	s
H ₈	A	2,52 ± 0,057		0,95 ± 0,058	
	V	3,19 ± 0,168		1,21 ± 0,074	
H ₉	A	2,60 ± 0,116		1,00 ± 0,073	
	V	3,36 ± 0,166		1,25 ± 0,080	
H ₁₅	A	2,57 ± 0,106		1,02 ± 0,062	
	V	3,30 ± 0,181		1,22 ± 0,053	
H ₁₆	A	2,55 ± 0,104		1,01 ± 0,065	
	V	3,37 ± 0,176		1,24 ± 0,041	
A		3,17 ± 0,230		1,34 ± 0,125	
<i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂		2,98 ± 0,208		1,14 ± 0,094	

A = Amarelo

V = Verde

Tabela 38 - Análise da variância para os valores obtidos da medição de 25 conídios e núcleos haplóides de setores heterocarióticos.

	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.	C.V.
a) Diâmetro do conídio	Tratamentos	9	29,723	3,303	130,22**	
	Resíduos	240	6,100	0,0254		5,38%
	Total	249	35,823			
b) Diâmetro do núcleo	Tratamentos	9	3,989	0,443	75,68**	
	Resíduos	240	1,406	0,0058		7,6%
	Total	249	5,396			

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 39 - Comparação entre os controles e as testemunhas pelo teste de Dunnet para conídios e núcleos haplóides de setores heterocarióticos.

Tratamentos		Ø Conídios		Ø Núcleos	
		a ⁰	b	a	b
H ₈	A	**	**	**	**
	V	n.s.	**	**	*
H ₉	A	**	**	**	**
	V	**	**	**	**
H ₁₅	A	**	**	**	**
	V	*	**	**	**
H ₁₆	A	**	**	**	**
	V	**	**	**	**
		DMS = 0,123 (5%) 0,1470 (1%)		DMS = 0,059 (5%) 0,071 (1%)	

a⁰ = Linhagem A

b = Linhagem *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 40 - Valores médios ($\hat{m}$) do diâmetro de 25 conídios e núcleos diplóides e respectivos desvios padrões (s) em heterocarióticos cruzados com a linhagem MSE.

Setores heterocarióticos		Diâmetro em micra (μ)			
		Conídio		Núcleo	
		$\hat{m}$	s	$\hat{m}$	s
H ₈	A// MSE	3,88 ± 0,319		1,42 ± 0,113	
	V// MSE	4,01 ± 0,250		1,52 ± 0,099	
H ₉	A// MSE	3,82 ± 0,243		1,40 ± 0,078	
	V// MSE	3,96 ± 0,151		1,48 ± 0,112	
H ₁₅	A// MSE	3,91 ± 0,205		1,41 ± 0,086	
	V// MSE	3,91 ± 0,174		1,44 ± 0,092	
H ₁₆	A// MSE	3,68 ± 0,241		1,31 ± 0,115	
	V// MSE	3,78 ± 0,233		1,36 ± 0,088	
A// MSE		4,06 ± 0,272		1,62 ± 0,089	
proA ₁ ; pabaA ₆ ; yA ₂ // MSE		3,71 ± 0,246		1,34 ± 0,085	

Tabela 41 - Análise da variância para os valores obtidos da medição de confídios e núcleos diplóides obtidos do cruzamento entre setores heterocarióticos e linhagem MSE.

	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.	C.V.
a) Diâmetro do confídio	Tratamento	9	3,911	0,434	7,75**	
	Resíduo	240	13,522	0,056		6,10%
	Total	249	17,433			
b) Diâmetro do núcleo	Tratamento	9	2,063	0,229	25,44**	
	Resíduo	240	2,132	0,009		6,60%
	Total	249	4,195			

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 42 - Comparação entre os tratamentos e as testemunhas, pelo teste de Dunnet, para valores de diâmetro de confídios e núcleos diplóides em heterocarióticos.

Tratamentos	Ø Confídios		Ø Núcleos	
	a_1^0	b_1	a_1	b_1
H ₈ A// MSE	n.s.	n.s.	**	*
V// MSE	n.s.	**	**	**
H ₉ A// MSE	*	n.s.	**	**
V// MSE	n.s.	**	**	**
H ₁₅ A// MSE	n.s.	*	**	n.s.
V// MSE	n.s.	*	**	**
H ₁₆ A// MSE	**	n.s.	**	n.s.
V// MSE	**	n.s.	**	n.s.
DMS = 0,183 (5%)		DMS = 0,073 (5%)		
0,258 (1%)		0,087 (1%)		

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade.
 ** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.
 n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

a_1^0 = Diplóide resultante do cruzamento A// MSE.

b_1 = Diplóide resultante do cruzamento *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂// MSE.

5.4.8.3. Germinação de conídios viáveis e letais em setores heterocarióticos

Devido à existência de conídios letais e viáveis num mesmo setor, foi necessário cuidado especial para a análise da germinação desses conídios. Para tanto, utilizou-se a técnica descrita no item 4.9. para coleta de conídios amarelos e verdes, separadamente. A técnica usada para a germinação foi a descrita no item 4.9.1., utilizando-se blocos de meio completo, entre lâmina e lamínula, para facilitar a inoculação e acompanhamento da germinação ao microscópio. Os resultados obtidos para 12 horas de germinação estão apresentados na Tabela 43. A Figura 18 mostra a representação gráfica dos resultados apresentados na Tabela 43. As análises genéticas realizadas através de cruzamentos entre conídios letais e viáveis com a linhagem MSE, utilizando os ciclos sexual e parassexual, serão apresentadas no item 5.5., apesar do emprego de técnica especial.

5.5. Análise genética

Para melhor compreensão os resultados serão apresentados, em separado, para variantes deteriorados e para setores heterocarióticos. Em ambos os casos, as técnicas utilizadas para a obtenção dos heterocários, análises mitóticas e meióticas foram aquelas rotineiras para *A. nidulans*

Tabela 43 - Conídios viáveis e letais de setores heterocarióticos germinando em blocos de meio completo entre lâmina e lamínula.

Setores heterocarióticos		12 horas de germinação				Total
		Conídios germinando		Conídios não germinando		
		N	%	N	%	
H ₈	A	8	1,66	472	98,34	480
	V	239	76,85	72	23,15	311
H ₉	A	36	14,17	218	85,83	254
	V	269	90,27	29	9,73	298
H ₁₅	A	21	6,12	322	93,88	343
	V	174	74,04	61	25,96	235
H ₁₆	A	33	10,00	297	90,00	330
	V	62	23,13	206	76,86	268
A		228	90,48	24	9,52	252
proA ₁ ;pabaA ₆ ;yA ₂		251	97,67	6	2,33	257
MSE		309	83,51	61	16,49	370

Figura 18 - Representação gráfica da porcentagem de germinação de confídios letais e não letais de setores heterocarióticos e das linhagens controle (12 horas).

elas descritas nos itens 4.10., 4.10.1., 4.10.2. e 4.10.3. Para heterocarióticos, para os quais foi possível o mapeamento de letais, os resultados serão apresentados aqui como um sub-ítem.

5.5.1. Para variantes deteriorados

Do cruzamento de cada um dos variantes deteriorados utilizados e de seus determinantes de 1ª. ordem com a linhagem *MSE* foram obtidos diplóides, através do ciclo parassexual (*ROPER, 1952*), dos quais após haploidização surgiram setores que analisados nos meios específicos forneceram os resultados apresentados na Tabela 44.

Através de análise, utilizando-se o ciclo sexual (*PONTECORVO, 1953*) obtiveram-se valores de recombinação entre os determinantes de deterioração e os marcadores genéticos conhecidos. As Tabelas 45 a 52 apresentam os resultados obtidos para as análises meióticas entre os variantes deteriorados e a linhagem *MSE*, com relação ao grupo ou grupos de ligação detectados através da análise mitótica (Tabela 44).

Através da contagem do número e tipos de colônias segregantes resultantes dos cruzamentos entre variantes deteriorados e linhagem *MSE* obtiveram-se os valores para segregação meiótica dentro da proporção esperada 1 normal: 1 dete

Tabela 44 - Análises mitóticas resultantes dos cruzamentos entre os variantes deteriorados, provenientes da linhagem A, e a linhagem MSE.

Marcadores genéticos	Grupos de ligação	Variantes deteriorados// MSE															
		V ₄₇		V ₄₈		V ₄₉		V ₅₀		V _{50.1}		V ₅₁		V _{51.1}		V ₅₂	
		N	O	N	O	N	O	N	O	N	O	N	O	N	O	N	O
<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	I	23	0	30	0	21	0	21	20	15	0	36	0	26	0	15	2
<i>pro paba</i>		0	0	0	0	5	0	3	0	0	0	13	0	0	0	10	3
<i>w</i> ⁺	II	11	0	5	0	2	0	0	0	3	0	15	0	2	0	0	0
<i>w</i>		12	0	25	0	24	0	24	20	12	0	34	0	24	0	25	5
<i>gal</i> ⁺	III	16	0	25	0	10	0	20	13	10	0	27	0	14	0	0	5
<i>gal</i>		7	0	5	0	16	0	4	7	5	0	22	0	12	0	25	0
<i>pyro</i> ⁺	IV	13	0	26	0	11	0	14	15	9	0	29	0	11	0	13	3
<i>pyro</i>		10	0	4	0	15	0	10	5	6	0	20	0	15	0	12	2
<i>fac</i> ⁺	V	12	0	29	0	19	0	19	19	11	0	29	0	16	0	12	2
<i>fac</i>		11	0	1	0	7	0	5	1	4	0	20	0	10	0	13	3
<i>s</i> ⁺	VI	8	0	30	0	0	0	10	10	12	0	24	0	22	0	6	0
<i>s</i>		15	0	0	0	26	0	14	10	3	0	25	0	4	0	19	5
<i>nic</i> ⁺	VII	13	0	5	0	15	0	12	10	11	0	24	0	14	0	5	0
<i>nic</i>		10	0	25	0	11	0	12	10	4	0	25	0	12	0	20	5
<i>ribo</i> ⁺	VIII	10	0	30	0	23	0	0	20	5	0	0	0	9	0	7	1
<i>ribo</i>		13	0	0	0	3	0	24	0	10	0	49	0	17	0	18	4
Total		23	0	30	0	26	0	24	20	15	0	49	0	26	0	25	5
Localização provável no grupo de ligação		I*		I*		VI		VIII		I		VIII		I		III	

*Resultados não conclusivos

N = Normal

O = Deteriorado

Tabela 45 - Análise meiótica do variante deteriorado V₄₇.

Variante V ₄₇ X MSE*					
Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Colônias		Valor de re-combinação	s
		normais	deterioradas		
I	<i>pro</i> ⁺	31	15	36,58	± 5,32%
	<i>pro</i>	15	21		
	<i>paba</i> ⁺	27	20	54,17	± 5,87%
	<i>paba</i>	19	6		
III	<i>gal</i> ⁺	12	23	20,83	± 4,55%
	<i>gal</i>	34	3		
V	<i>fac</i> ⁺	14	19	29,17	± 5,36%
	<i>fac</i>	32	7		

*Embora a análise mitótica indicasse ligação apenas para o grupo I, a análise meiótica mostrou ligação com os marcadores *galA*₁ e *facA*₃₀₃.

Tabela 46 - Análise meiótica do variante deteriorado V₄₈.

Variante V ₄₈ X MSE					
Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Colônias		Valor de re-combinação	s
		normais	deterioradas		
I	<i>pro</i> ⁺	34	28	45,08 ± 5,86%	
	<i>pro</i>	27	33		
	<i>paba</i> ⁺	20	34	63,72 ± 4,76%	
	<i>paba</i>	31	17		

Tabela 47 - Análise meiótica do variante V₄₉ X MSE.

Variante V ₄₉ X MSE					
Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Valor de re-combinação	s
		normais	deterioradas		
VI	Δ^+	33	15	52,38 ± 5,45%	
	Δ	25	11		

Tabela 48 - Análise meiótica do variante **deteriorado** V_{50} X MSE.

Variante V ₅₀ X MSE					
Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Valor de re-combinação	s
		normais	deterioradas		
VIII	<i>ribo</i> ⁺	22	35	33,73 ±	5,19%
	<i>ribo</i>	20	6		

Tabela 49 - Análise meiótica do determinante de 1a. ordem $V_{50.1}$ X MSE.

Variante V _{50.1} X MSE					
Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Valor de re-combinação	s
		normais	deterioradas		
I	pro ⁺	27	21	42,27 ±	5,02%
	pro	20	29		
	paba ⁺	26	27	49,48 ±	5,07%
	paba	21	23		

Tabela 50 - Análise meiótica do variante V_{51} X MSE.

Variante V ₅₁ X MSE					
Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Valor de re-combinação	s
		normais	deterioradas		
VIII	<i>ribo</i> ⁺	29	52	35,13 ±	3,92%
	<i>ribo</i>	44	23		

Tabela 51 - Análise meiótica do determinante de 1a. ordem
 $V_{51,1} \times MSE$.

Variante $V_{51,1} \times MSE$					
Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Colônias		Valor de re- combinação	s
		normais	deterioradas		
I	<i>pro</i> ⁺	20	20	49,50 ±	4,97%
	<i>pro</i>	30	31		
	<i>paba</i> ⁺	21	23	52,47 ±	4,97%
	<i>paba</i>	30	27		

Tabela 52 - Análise meiótica do variante deteriorado $V_{52} \times MSE$.

Variante $V_{52} \times MSE$					
Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Colônias		Valor de ligação	s
		normais	deterioradas		
III	<i>gal</i> ⁺	15	31	33,66 ±	3,33%
	<i>gal</i>	36	19		

riorado. Foi realizada análise estatística para a verificação do nível de significância de cada resultado (Tabela 53). Devido ao fato dos variantes V_{47} , V_{48} e VV_{52} apresentarem-se com valores de X^2 muito elevados para a proporção esperada de 1:1, fizeram-se novos testes para as proporções 3:1 e 2:1, cujos resultados também estão contidos na Tabela 53.

5.5.2. Para setores heterocarióticos

5.5.2.1. Utilizando as técnicas convencionais

As análises mitóticas e meióticas para os setores heterocarióticos foram realizadas, em separado, tanto para conídios verdes quanto para amarelos. As técnicas utilizadas foram aquelas descritas nos itens 4.10., 4.10.1., 4.10.2 e 4.10.3. Os resultados para as análises mitóticas estão apresentados, para os variantes H_1 , H_2 , H_3 e H_4 (separadamente para conídios amarelos e verdes) e H_5 , H_6 e H_7 na Tabela 54. As Tabelas 55 a 57 apresentam os resultados das análises meióticas para alguns dos setores heterocarióticos contidos na Tabela 54, com relação aos marcadores $proA_1$ e $pabaA_6$ (grupo de ligação I). Para esses resultados efetuaram-se análises estatísticas para a verificação do nível de significância. Já na Tabela 58 estão os resultados para o número de segregantes meióticos obtidos e respectivos valores para o teste de X^2 .

.161.

Tabela 53 - Segregação meiótica de cruzamentos envolvendo variantes deteriorados originados da linhagem A X MSE.

Cruzamentos	Segregantes		Total	Proporção esperada	X ²
	normais	deteriorados			
V ₄₇ X MSE	308	157	465	1:1	49,08**
				3:1	19,04**
				2:1	0,04 n.s.
V ₄₈ X MSE	416	116	532	1:1	169,17**
				3:1	2,89 n.s.
V ₄₉ X MSE	222	221	443	1:1	0,00 n.s.
V ₅₀ X MSE	756	605	1.361	1:1	16,75**
V _{50.1} X MSE	232	220	452	1:1	0,32 n.s.
V ₅₁ X MSE	334	367	701	1:1	1,55 n.s.
V _{51.1} X MSE	123	122	245	1:1	0,00 n.s.
V ₅₂ X MSE	297	187	484	1:1	25,00**
				3:1	48,00**
				2:1	6,12 n.s.

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 54 - Análises mitóticas resultantes dos cruzamentos entre conídios de setores heterocarióticos, provenientes da linhagem A, e a linhagem MSE.

Marcadores genéticos	Grupos de ligação	Variantes heterocarióticos// MSE										
		H ₁		H ₂		H ₃		H ₄		H ₅	H ₆	H ₇
		A	V	A	V	A	V	A	V	V	V	V
<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺ <i>pro</i> <i>paba</i>	I	30 10	47 5	27 10	43 1	22 1	21 1	19 6	25 1	29 12	42 0	34 25
<i>w</i> ⁺ <i>w</i>	II	14 26	11 31	15 22	0 44	0 23	6 16	4 21	2 24	1 40	0 42	22 37
<i>gal</i> ⁺ <i>gal</i>	III	20 20	25 27	14 23	26 18	13 10	12 10	12 13	13 13	24 17	22 20	31 28
<i>pyro</i> ⁺ <i>pyro</i>	IV	22 18	28 24	30 7	21 23	13 10	10 12	11 14	12 14	12 29	20 22	34 25
<i>lac</i> ⁺ <i>lac</i>	V	18 22	28 24	29 8	21 23	11 12	14 8	12 13	14 12	28 13	28 14	42 17
<i>s</i> ⁺ <i>s</i>	VI	14 26	25 27	25 12	21 23	12 11	11 11	10 15	13 13	22 19	21 21	32 27
<i>níc</i> ⁺ <i>níc</i>	VII	24 16	29 23	18 19	25 19	12 11	10 12	13 12	13 13	21 20	22 20	29 30
<i>ribo</i> ⁺ <i>ribo</i>	VIII	26 14	49 3	20 17	18 26	15 8	11 11	11 14	10 16	15 26	27 15	33 26
Total		40	52	37	44	23	22	25	26	41	42	59

A = Amarelos

V = Verdes

Tabela 55 - Análise meiótica do cruzamento entre componentes do H₃ x MSE.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Componentes H ₃ x MSE			
		Colônias			
		Amarelas	χ^2	Verdes	χ^2
I	<i>pro</i> ⁺	44	2,46 n.s.	89	58,70**
	<i>pro</i>	60		12	
	<i>paba</i> ⁺	46	1,38 n.s.	93	71,53**
	<i>paba</i>	58		8	

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 56 - Análise meiótica do cruzamento entre componentes do H₄ x MSE.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Componentes H ₄ x MSE			
		Colônias			
		Amarelas	χ^2	Verdes	χ^2
I	<i>pro</i> ⁺	33	3,77 n.s.	48	0,62 n.s.
	<i>pro</i>	19		56	
	<i>paba</i> ⁺	32	2,77 n.s.	50	0,15 n.s.
	<i>paba</i>	20		54	

n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 57 - Análises meióticas dos componentes dos setores H₅, H₆ e H₇ X MSE.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	H ₅ X MSE		H ₆ X MSE		H ₇ X MSE	
		Colônias		Colônias		Colônias	
		Ver-des	χ^2	Ver-des	χ^2	Ver-des	χ^2
I	<i>pro</i> ⁺	42		45		48	
	<i>pro</i>	37	0,32 n.s.	35	1,25 n.s.	33	2,77 n.s.
	<i>paba</i> ⁺	40		43		51	
	<i>paba</i>	39	0,01 n.s.	37	0,45 n.s.	50	5,44*

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

n.s* = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 58 - Segregação meiótica de cruzamentos envolvendo com-
ponentes de setores heterocarióticos originados da
linhagem A X linhagem MSE.

Cruzamentos		Segregantes			Total	Proporção esperada	χ^2
		brancos	amarelos	verdes			
H ₁	V X MSE	237	130	136	503	2:1:1	1,82 n.s.
	A X MSE	419	378	-	797	1:1	2,11 n.s.
H ₂	V X MSE	206	186	180	568	2:1:1	45,23**
	A X MSE	257	281	-	538	1:1	1,07 n.s.
H ₃	V X MSE	209	130	64	403	2:1:1	22,18**
	A X MSE	300	237	-	537	1:1	7,39**
o							
H ₅	V X MSE	340	197	166	703	2:1:1	3,49 n.s.
H ₆	V X MSE	467	339	294	1.100	2:1:1	28,73**
H ₇	V X MSE	355	185	176	716	2:1:1	0,28 n.s.

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

A = Amarelo.

V = Verde.

o = Os valores para segregação meiótica do H₄ não estão aí represen-
tados.

Com relação aos heterocarióticos, apresentando letalidade e, para os quais através de técnica especial (item 4.9.) foi possível a obtenção de diplóides (item 4.9.4.), os resultados obtidos para as análises mitótica e meiótica estão apresentados no item 5.5.2.2., em separado.

Na Tabela 57 estão colocados, em conjunto, os resultados das análises meióticas dos cruzamentos $H_5 \times MSE$, $H_6 \times MSE$ e $H_7 \times MSE$, onde os setores heterocarióticos envolvidos apresentam apenas conídios verdes viáveis.

5.5.2.2. Análise genética de conídios letais e não letais de setores heterocarióticos (utilizando-se técnica especial)

As análises genéticas através do ciclo parassexual e sexual foram conduzidas com o objetivo de se tentar localizar a causa da letalidade entre alguns conídios de setores heterocarióticos. A obtenção dos conídios foi feita segundo a técnica especial descrita no item 4.9., tanto para os conídios verdes e amarelos de heterocarióticos, quanto para a linhagem *MSE*. A obtenção do heterocariótico e demais passos das análises mitótica e meiótica seguiram a rotina para *Aspergillus nidulans*.

Entretanto, devido às dificuldades do método, não foi possível a conclusão das análises mitótica e meiótica

para todos os 4 setores heterocarióticos utilizados (H_8 , H_9 , H_{15} e H_{16}). Os setores H_8 e H_{15} tiveram seus diplóides facilmente haploidizáveis com o uso de cloroneb, mas os setores H_9 e H_{16} não apresentaram formação de setores em qualquer dos diplóides ensaiados. Assim a Tabela 59 apresenta os resultados das análises mitóticas dos setores H_8 e H_{15} , incluindo diplóides provenientes do cruzamento de confídios amarelos e verdes, separadamente, com a linhagem MSE.

Com relação à análise meiótica foram ensaiados apenas os marcadores *proA₁* e *pabaA₆*, localizados no grupo de ligação I, envolvido na duplicação. Resultados foram obtidos apenas para alguns dos setores ensaiados, pois em alguns casos obtiveram-se, sempre, cleistotécios autofecundados. Devido à homogeneidade dos resultados obtidos, estes não serão apresentados em Tabelas pois, na maioria dos casos a segregação alélica para os marcadores *proA₁* e *pabaA₆* de colônias brancas, amarelas e verdes resultou na proporção esperada de 1:1. Entretanto, no caso especial do H_8 Amarelo X MSE, valores significativos ao nível de 1% de probabilidade foram observados para a segregação entre os alelos alternativos de *proA₁* e *pabaA₆* entre colônias amarelas e brancas. Também para o H_9 amarelo X MSE as proporções observadas não foram as esperadas resultando num valor de χ^2 significativo ao nível de 1% de probabilidade, para colônias amarelas.

A segregação meiótica obtida do cruzamento en-

Tabela 59 - Análises mitóticas, resultantes dos cruzamentos entre os componentes dos setores heterocarióticos através de seus conídios amarelos (letais) e verdes com a linhagem MSE.

Marcadores genéticos	Grupos de ligação	Setores heterocarióticos// MSE *			
		H ₈ A	H ₈ V	H ₁₅ A	H ₁₅ V
<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	I	18	9	15	14
<i>pro</i> <i>paba</i>		7	13	2	6
<i>w</i> ⁺	II	0	0	0	0
<i>w</i>		25	22	17	20
<i>gal</i> ⁺	III	23	14	10	11
<i>gal</i>		2	8	7	9
<i>pyro</i> ⁺	IV	11	9	13	16
<i>pyro</i>		14	13	4	4
<i>fac</i> ⁺	V	18	13	10	13
<i>fac</i>		7	9	7	7
<i>s</i> ⁺	VI	16	7	9	8
<i>s</i>		9	15	8	12
<i>nic</i> ⁺	VII	12	10	13	11
<i>nic</i>		13	12	4	9
<i>ribo</i> ⁺	VIII	13	10	7	14
<i>ribo</i>		12	12	10	6
Total de colônias		25	22	17	20

* = Os diplóides de H₉// MSE e H₁₆// MSE não apresentaram setores para a análise mitótica.

tre confídios amarelos (letais) e verdes de cada setor hetero-cariótico com a linhagem *MSE* está representada na Tabela 60 estando também representadas as proporções esperadas para os segregantes e respectivos valores para o teste de X^2 .

5.6. Testes de alelismo

Através de cruzamentos entre os variantes detereriorados utilizados no presente trabalho e diversos variantes obtidos por outros autores foi possível, em alguns casos com-provar-se se dois diferentes variantes eram alelos para o mesmo locus. A Tabela 61 apresenta os variantes e segre-gantes utilizados para os testes de alelismo e os respectivos grupos de ligação onde foram localizados. Da contagem do nú-mero e tipo de segregantes obtidos de tais cruzamentos resul-taram os dados contidos na Tabela 62.

Os resultados indicam pois, não serem alelos quaisquer dos variantes ensaiados, considerando-se apenas os variantes testadores utilizados. Para os variantes V_{47} e V_{48} , localizados no grupo de ligação I, através de análise mitótica, não foi possível proceder-se ao teste de alelismo, já que não se mantiveram em estoque até o final desse trabalho, devido à grande instabilidade apresentada.

Tabela 60 - Segregação meiótica de cruzamentos envolvendo com
 ponentes de setores heterocáriticos H_8 , H_9 e
 H_{15} X MSE.^o

Cruzamentos		Segregantes			Total	Proporção esperada	χ^2
		brancos	amarelos	verdes			
H_8	A X MSE	119	121	-	240	1:1	0,02 n.s.
	V X MSE	91	50	38	179	2:1:1	1,66 n.s.
H_9	A X MSE	132	129	-	261	1:1	0,03 n.s.
	V X MSE	179	92	81	352	2:1:1	1,25 n.s.
H_{15}	A X MSE	140	137	-	277	1:1	0,03 n.s.
	V X MSE	69	33	30	132	2:1:1	0,41 n.s.

n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

o = Para o H_{16} X MSE todos os cleistotécios obtidos foram autofe-
 cundados.

Tabela 61 - Variantes e segregantes utilizados nos testes de alelismo: sua localização nos grupos de ligação.

Grupo de ligação		V a r i a n t e s
I	V _{50.1}	X V ₃₆ (seg. <i>gal⁻ nic⁻ ribo⁻</i>)
	V _{51.1}	X V ₄₆ (seg. <i>Δ⁻ w</i>)
III	V ₅₂ (seg. <i>gal⁻ nic⁻ ribo⁻</i>)	X V ₉
VI	V ₄₉ (seg. <i>gal⁻ nic⁻</i>)	X V ₁₆
VIII	V ₅₀	X V ₂₀ (seg. <i>pyro⁻ w</i>)
	V ₅₁	X V ₂₀ (seg. <i>pyro⁻ w</i>)

Tabela 62 - Segregação meiótica obtida do cruzamento entre variantes deteriorados.

Cruzamentos	Segregantes		Total	Proporção N:D	χ^2
	normais	deteriorados			
V _{50.1} X V ₃₆	62	183	245	1:3	0,006 ns
V _{51.1} X V ₄₆	54	164	228	1:3	0,339 ns
V ₅₂ X V ₉	65	192	257	1:3	0,006 ns
V ₄₉ X V ₁₆	62	181	243	1:3	0,017 ns
V ₅₀ X V ₂₀	51	153	204	1:3	0,000 ns
V ₅₁ X V ₂₀ *					

n.s. = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

* = Em várias tentativas só foram obtidos cleistotécios autofecundados.

6. DISCUSSÃO

Devido à quantidade e variabilidade de resultados apresentados no item 5, a discussão será orientada acompanhando, na medida do possível, tais resultados. Para tanto, será subdividida em sub-ítems.

6.1. Ação da temperatura na instabilidade em *A. nidulans*

Com a elevação da temperatura (30°, 37° e 40°C) observou-se aumento tanto na frequência média total de setores, quanto na de setores amarelos, em particular (Tabelas 2 e 4, Figuras 5, 6 e 7). Quanto aos setores verdes, pode-se observar decréscimo de sua frequência com o aumento da temperatura (Tabelas 2 e 4, Figura 5), entretanto os testes não paramétricos utilizados para análise estatística não evidenciaram tal fato. Muitos dos trabalhos congêneres apesar da não utilização de testes estatísticos, mostram a ação da tempera-

tura e outros agentes físicos ou químicos sobre o aumento ou diminuição de setores (COOKE e col., 1970; ROPER e col., 1972; MENEZES, 1974; LIEBER, 1976; BONATELLI JR. e AZEVEDO, 1977; MAJERFELD e ROPER, 1978a). Setores deteriorados e heterocarióticos foram de rara ocorrência, especialmente a 30°C.

Aumento de setores amarelos em linhagens com duplicação foi também obtido com utilização de diversos agentes físicos e químicos (COOKE e col., 1970; PALMER e ROPER, 1970; LIEBER, 1976; MAJERFELD e ROPER, 1978a). Do mesmo modo, alterações nas frequências de setores verdes foram também obtidas através de uso de luz ultra-violeta (ROPER e col., 1972; MENEZES, 1974) e outros agentes (MAJERFELD e ROPER, 1978a). Tanto no presente trabalho como nos demais citados parece ter ocorrido deleção preferencial de um dos segmentos envolvidos na duplicação ou mecanismos de reparo diferencial. A temperatura não alterou as frequências de setores deteriorados como foi verificado por MENEZES (1974) ao utilizar DNA exógeno. Desse modo, a variação da temperatura parece alterar as frequências de deleção ou reparo, mas não às de transposição ou de novas duplicações.

A instabilidade que ocorre em *A. nidulans* pode ser comparada a casos similares em outros organismos. Assim em vegetais superiores tais como *Portulaca* (FABERGÉ e BEALE, 1942), *Antirrhinum majus* (HARRISON e FINCHAM, 1964), *Nicotiana* (SAND, 1957) foi verificado que a instabilidade de genes para

pigmentação e, conseqüentemente formação de setores, foi afetada pelo aumento da temperatura. Em milho ocorrem vários tipos de instabilidade influenciados por diferenças de temperatura, além de outros fatores (RHOADES, 1941; PETERSON, 1952, 1976; WILLIAMS e BRINK, 1972). Similarmente em *Drosophila* (MÜLLER, 1928; HOUSE, 1955) observou-se efeito da temperatura sobre a frequência de letais e mosaicismos. Em todos esses casos a temperatura parece influenciar a expressão gênica através de perda de material cromossômico e mutação.

Embora ainda controvertidas, as hipóteses existentes sobre instabilidade em *A. nidulans* sugerem que fenômenos como reparo no escuro (ROPER e col., 1972), presença de genes e drogas estabilizadores (AZEVEDO, 1975; BONATELLI JR. e AZEVEDO, 1977), fatores citoplasmáticos (ARLETT e col., 1962), supressão gênica (BALL, 1967), mutações que afetam a sensibilidade à luz ultra-violeta (JANSEN, 1967; MAJERFELD e ROPER, 1978b), erros iniciais de cópia do material genético (BURR e col., 1971; BIRKETT e ROPER, 1977), entre outros, refletem a complexidade do fenômeno.

Poder-se-ia também correlacionar as deleções preferenciais observadas no presente trabalho com a presença de enzimas de "reparo" atuando em diferentes sítios, de acordo com a temperatura utilizada. Assim, a 40°C essas enzimas atuariam preferencialmente no sítio de ligação do segmento translocado (II) aumentando a frequência de setores amarelos; a 30°C atua

ção no sítio homólogo (I) aumentaria o número de setores verdes, em relação ao observado em temperaturas mais elevadas.

Outra possível explicação seria a ocorrência de velocidades diferentes de cópia para os segmentos envolvidos na duplicação tal que, em altas temperaturas o segmento original seria mais rapidamente copiado produzindo maior número de setores amarelos; em baixas temperaturas a velocidade de replicação do segmento original seria diminuída, permitindo expressão fenotípica do segmento translocado para o grupo de ligação II.

Apesar de especulativas, todas as explicações sugeridas para o fenômeno da instabilidade têm servido para incentivar sua elucidação, sendo de fundamental importância para a compreensão de problemas similares em outros eucariotos. Seria interessante que maior número de linhagens com duplicação fosse analisada e comparada e também que, uma investigação ao nível molecular fosse realizada nas regiões onde ocorrem as deleções.

Quanto à localização de setores em quadrantes, verificou-se um aumento considerável de setores gêmeos ("twin spots") com a elevação da temperatura (Tabelas 2, 4 e 6, Figuras 6 e 7). Para a esperada ocorrência de setores melhorados ao lado de deteriorados (AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO,

1971) observou-se que à temperatura de 30°C ocorreram 2 casos, a 37°C um caso foi verificado, mas a 40°C, 11 setores gêmeos foram computados, além de outras combinações entre setores (Tabela 6). Esse aumento significativo constatado no presente trabalho, poderia ser uma decorrência lógica do aumento total de setores a 40°C (Tabelas 2 e 4) e de deleções e transposições dos segmentos excisados para novos sítios através de velocidades diferentes das enzimas envolvidas.

Similarmente ao que foi descrito em *Drosophila* (STERN, 1936) e em *Antirrhinum majus* (HARRISON e CARPENTER, 1977) a ocorrência de setores gêmeos foi correlacionada à permuta mitótica a qual em *A. nidulans* pode ser também induzida por luz ultra-violeta (WOOD e KÄFFER, 1967).

Como certas linhagens de *A. nidulans* apresentam-se heterozigóticas para os genes envolvidos numa duplicação, é provável que mecanismos semelhantes àqueles que ocorrem em tecidos somáticos de organismos superiores possam ser detectados nesse fungo. Além disso, pelos resultados obtidos, pode-se aventar a hipótese de que a temperatura e a luz ultra-violeta, poderiam induzir permuta mitótica nas regiões envolvidas na duplicação. Talvez o uso de temperaturas mais altas e análise genética dos marcadores situados nos segmentos duplicados fornecessem para os setores obtidos, informações precisas sobre a ocorrência de permutação.

6.2. Características dos variantes obtidos

6.2.1. Variantes deteriorados

Os variantes deteriorados obtidos apresentaram, de maneira geral, as mesmas características descritas por outros autores para a linhagem A e seus derivados (AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971; ROSATO, 1973; MENEZES, 1974, entre outros).

Na descrição contida na Tabela 7 e Figura 9, os principais aspectos foram sumarizados, entretanto o variante V₅₀ e seu derivativo V_{50.1}, com característica morfologia enrugada ("crinkled") e intenso micélio aéreo, apresentaram-se como interessante material para estudos de genética do desenvolvimento. Esses variantes possuem conidiação tardia, anormalidades em diversos passos da conidiação, duas fases bem características (micelial, até 48 h e conidial, com mais de 72 horas) e incapacidade de utilizar acetato, como única fonte de carbono, na forma micelial. Para esses e demais variantes obtidos a detecção de anormalidades outras que não a aparência enrugada e alterações nas taxas de crescimento e conidiação, apresenta importante indício de que os efeitos da duplicação e instabilidade decorrente são muito mais amplos do que se pode observar macroscopicamente.

6.2.2. Setores heterocarióticos

Os setores heterocarióticos obtidos apresentaram-se de duas maneiras: setores com confídios amarelos e verdes viáveis e setores com inviabilidade de confídios amarelos. (Tabela 8, Figura 10). Setores semelhantes foram descritos por *ROPER e NGA (1969)*. Outras combinações, tais como confídios verdes letais, ou ambos os confídios com letalidade não foram obtidas no presente trabalho. Entretanto, *FAVRAUD (comunicação pessoal)* isolou heterocarióticos onde confídios verdes apresentaram-se com inviabilidade.

Fato interessante foi que, dentre os setores heterocarióticos obtidos, com ambos os confídios viáveis, verificaram-se diferenças nas suas frequências, o que está de acordo com as observações de *CLUTTERBUCK e ROPER (1966)* sobre a relação entre taxa nuclear no interior de heterocários. Segundo esses autores essa taxa é representada pela relação conidial, a qual pode ser afetada por mutação, migração e seleção, entre outros. Assim, diferentes relações conidiais observadas para os heterocarióticos obtidos, possivelmente, representem diferentes relações nucleares resultantes de deleções diferenciais dos segmentos envolvidos na duplicação.

Raros setores heterocarióticos foram obtidos e analisados geneticamente até hoje e, sobretudo dados citológicos eram praticamente inexistentes. Dificuldades de manu-

tenção e manipulação têm sido as principais causas.

6.3. Alterações nas estruturas conidiais e crescimento das colônias

6.3.1. Em variantes deteriorados

A maioria dos autores tem analisado a instabilidade em *A. nidulans* sob o ponto de vista genético. São citadas, em geral, as características de coloração, morfologia e crescimento diferenciais das colônias. Entretanto, a presença de segmentos em duplicata pode acarretar alterações na formação e funcionamento de estruturas relacionadas tanto à reprodução assexuada quanto sexuada. Dados desse tipo são, entretanto, de rara ocorrência. Com esse objetivo, os variantes obtidos foram analisados e os dados contidos na Tabela 9 mostram que a linhagem A apresenta alteração na taxa de crescimento, confirmando resultados semelhantes de *BAINBRIDGE e ROPER (1966)* e *NGA e ROPER (1968)*. Variantes deteriorados em geral, apresentaram-se com taxas de crescimento melhores do que a linhagem original com duplicação e iguais, superiores ou inferiores à de linhagem sem duplicação. Os resultados mostram (Tabelas 9, 10 e 11, Figura 11) a ocorrência de variabilidade entre os deteriorados, sugerindo-se que possíveis perdas ou transposições do segmento duplicado favoreçam crescimento dos variantes em meio completo.

As diferenças observadas no 1º dia de crescimento não foram mantidas até o 6º dia para muitos dos variantes analisados. Entretanto, diferenças significativas entre variantes e linhagens originais foram detectadas, estatisticamente. O variante V₄₉, apesar de conidiação média, apresentou taxa de crescimento muito eficiente e no 5º dia, já havia tomado toda a placa. Esse dado confirma os de *BIAGI (1977)*, que trabalhando com morfológicos em *A. nidulans*, obtidos por indução de UVL e 8 MOP, não observou correlação entre taxa de conidiação e crescimento. Entretanto, ao contrário dos variantes morfológicos que apresentaram crescimento sempre menor do que a linhagem original não duplicada (*BIAGI, 1977*), os variantes deteriorados analisados no presente trabalho apresentaram-se com taxas de crescimento melhores do que a linhagem, com duplicação. Esses dados fortalecem as hipóteses de que a presença da duplicação, semelhantemente à de mutação, acarreta desequilíbrio na regulação e dosagem gênicas, já que aqueles que perderam a duplicação cresceram como normais.

Quanto às estruturas conidiais as observações citológicas realizadas para variantes deteriorados mostraram uma série de anomalias no desenvolvimento e conidiogênese. Quando comparados com a linhagem *proA₁; pabaA₆; yA₂* (Tabela 18) os variantes V₄₇, V₄₈ e V_{51.1} não mostraram diferenças, apresentando as estruturas conidiais normais de *A. nidulans* (*RAPER e FENNEL, 1973*). Já os variantes V₄₉, V₅₀, V_{50.1}, V₅₁ e V₅₂

apresentaram uma série de alterações (Tabela 18): a) ausência de célula podal (V_{49} , para alguns conidióforos); b) conidióforos septados (V_{49} , V_{51} e V_{52} , entre conidióforos normais); c) ausência total de conidióforo e vesícula (V_{50} e $V_{50.1}$); presença de estruturas globosas intercaladas entre hifas normais (V_{50} e $V_{50.1}$); e) grande quantidade de células de Hülle (V_{49} , V_{51}); f) ausência de pigmentação de conidióforos (V_{51} e V_{52} , entre conidióforos normais); g) grande quantidade de cleistotécio (V_{49} , V_{50} , $V_{50.1}$).

Na linhagem A, entretanto, apesar da presença da duplicação, não se detectaram modificações ao nível microscópico em estruturas conidiais.

A maioria dos mutantes morfológicos, analisados citologicamente em *A. nidulans*, foi obtida através de indução por agentes físicos ou químicos. As anormalidades detectadas em tais mutantes (CLUTTERBUCK, 1969a e b, 1970, 1977; MARTINELLI e CLUTTERBUCK, 1971; BIAGI, 1977) são comparáveis, em muitos dos casos, às aquelas observadas nos variantes deteriorados obtidos espontaneamente no presente trabalho. Assim, mutantes *ivoA* e *ivoB* (CLUTTERBUCK, 1969b, 1973) com conidióforos incolores assemelham-se a alguns conidióforos observados nos variantes V_{51} e V_{52} , onde a produção de cresolase possivelmente foi afetada direta ou indiretamente. Os variantes "fluffy" (V_{50} e $V_{50.1}$) apresentaram características muito complexas, algumas entretanto, semelhantes aos efeitos

produzidos pela série de loci *mo* (BAINBRIDGE, 1963a, b, 1966), onde houve alteração no tempo de conidiação na morfologia das cabeças conidiais e aparência "fluffy". Septação do conidióforo foi observada em alguns mutantes morfológicos por BIAGI (1977), similarmente ao que foi detectado para alguns deteriorados (V_{49} , V_{51} e V_{52}) talvez devido a ausência de bloqueio na septação, quando da formação do conidióforo. Estruturas globosas intercaladas entre hifas normais (V_{50} e $V_{50.1}$) mostraram-se semelhantes aos mutantes com alteração ao nível de parede (BULL, 1970; BIAGI, 1977).

Fato interessante foi que, apenas nos variantes V_{50} e $V_{50.1}$, todas as estruturas conidiais apresentaram-se afetadas e, nos diplóides (resultantes de cruzamentos desses variantes com a linhagem MSE), as estruturas conidiais apresentaram-se normais. Esse fato poderia indicar efeitos pleiotrópicos de gene recessivo. Nos demais variantes, estruturas anômalas foram sempre encontradas do lado de estruturas conidiais normais, indicando possível variação por efeito de posição (CLUTTERBUCK, 1970b) envolvendo translocação. Essa hipótese envolve a possibilidade de "encaixe" de segmentos cromossômicos na região final de grupos de ligação, onde o material genético poderia ser inerte ou redundante, talvez heterocromático, e essa associação entre peças hetero e encromáticas poderia resultar em variação do locus *bristle* (CLUTTERBUCK, 1970b). No presente trabalho, a presença de duplicação, sua

deleção e transposição para novos sítios (*AZEVEDO e ROPER, 1970*), provavelmente heterocromáticos ou palindrômicos, poderia fortalecer as hipóteses anteriormente aventadas, podendo-se inclusive admitir que genes envolvidos em alguma etapa da conidiação estejam localizados na região duplicada, e que sua transposição possa acarretar anomalias diversas.

Quanto às medições efetuadas em alguns elementos da estrutura conidial, pode-se observar (Tabelas 12, 13 e 14) que em variantes deteriorados e linhagens originais existem diferenças significativas com relação, principalmente, à largura do pedúnculo e altura da vesícula. Para a altura do pedúnculo observaram-se diferenças esporádicas para os variantes V_{48} , V_{49} e V_{51} , quando comparadas com a linhagem MSE. Quanto à altura total do conidióforo, apenas o V_{51} mostrou-se significativamente diferente das três testemunhas, apresentando grande variação nas medidas obtidas. Os coeficientes de variação mostraram que as diferenças existentes para altura de vesícula e diâmetro de pedúnculo são menores do que aquelas para alturas de conidióforo e pedúnculo. Esse fato talvez se deva à inexistência de correlação entre presença ou transposição da duplicação e alterações no alongamento, mas sim com a largura do pedúnculo e diferenciação da vesícula. Nesse caso, alterações ao nível de parede poderiam estar associadas (*BULL, 1970*).

6.3.2. Para setores heterocarióticos

Para setores heterocarióticos os mesmos tipos de análise citológica (Tabela 19) não detectaram, na maioria dos casos, alterações nas estruturas conidiais. Do mesmo modo, as medidas efetuadas para as estruturas conidiais indicaram valores médios inferiores, na maioria dos casos, quando comparados com a linhagem A (Tabelas 15, 16 e 17) e iguais, maiores ou menores quando comparados com as linhagens haplóides não duplicadas. Interessante foi a observação feita para os heterocarióticos H₅, H₆ e H₇, apresentando apenas conídios verdes viáveis, nos quais as estruturas conidiais mostraram-se com valores médios para altura de pedúnculo e conidióforo muito menores do que os similares obtidos para conídios amarelos e verdes viáveis. A não constatação de anomalias estruturais na linhagem A poderia corroborar a hipótese de que, se a duplicação é mantida no local de origem, ou se é apenas perdida, passos da conidiogênese não são provavelmente afetados e é possível, nesse caso, que genes envolvidos na conidiação estejam aí localizados. No caso de deteriorados onde novas duplicações ou transposições podem ocorrer, observam-se vários tipos de alterações.

A constatação de diferenças entre componentes de setores heterocarióticos poderia ser explicada, geneticamente, pela ocorrência de excisões de vários tamanhos nos segmentos envolvidos na duplicação (ítem 6.8.2., Figura 21).

Embora para variantes resultantes de linhagens com duplicações, dados semelhantes aos obtidos presentemente sejam praticamente inexistentes, comparações com dados similares em outras linhagens de *Aspergillus* e com outros fungos como a *Neurospora crassa* (MISHA, 1977) são de grande interesse. Aliados a dados genéticos tais resultados sugerem, devido a implicação de poucos genes, (CLUTTERBUCK, 1969a, 1977; BIAGI, 1977) que possam estar atuando efeitos pleitrópicos, supressão, variegação por efeito de posição, além da possibilidade de ocorrência de novas duplicações em tandem e transposições de segmentos contendo genes essenciais a algum passo da conidogênese. Fenômenos relacionados a sítios preferenciais de inserção têm sido discutidos em outros organismos como *Drosophila* (GREEN, 1975), milho (PETERSON, 1968, 1970a, 1976) e mesmo em *Aspergillus* (AZEVEDO e ROPER, 1970) indicando que esse fato talvez possa ter uma importância biológica evolutiva mais geral (NEVERS e SAEDLER, 1977).

Além da presença de aberrações, muitos fatores podem modificar a diferenciação de estruturas **conidiais** e **cleistoteciais**: alterações causadas por traços de elementos no crescimento e morfologia de alguns *Aspergilli* (AGNIHOTRI, 1967); alterações ao nível mitocondrial originando mutantes morfológicos "petites" (ROSATO, 1977), para os quais, entretanto, não foram realizadas análises citológicas.

Maior número de variantes derivados de linha

gens com duplicações poderia ser investigado do ponto de vista citológico e genético. Dados dessa natureza, aliados a estudos de morfogênese, regulação e bioquímica deverão ser talvez nos próximos anos, a chave para a possível elucidação de fenômenos de instabilidade.

6.4. Observações de algumas etapas da conidiogênese

Os resultados apresentados na Figura 12 representam uma tentativa de resumir os principais fatos observados. Assim, com 4 horas de crescimento, conídios germinando foram observados em todos os tratamentos, sendo que em alguns casos detectaram-se tubos de germinação anômalos. Os dados obtidos para início de germinação são concordantes com os obtidos por *BAINBRIDGE (1971)*. Já nos períodos de 8 e 12 horas, apenas crescimento das hifas e ramificações iniciais foram observados, em todos os casos. Entretanto, com 16 horas detectaram-se componentes do setor heterocariótico (H_2 Amarelo) iniciando a conidiogênese precocemente. Dado semelhante foi encontrado por *GEALT e AXEROLD (1974)* para um mutante que apresentava competência para conidiar cerca de 2 horas antes do esperado. Com 20 horas, tempo normal para início da conidiogênese em *A. nidulans* (*AXEROLD, 1972; AXEROLD e col., 1973; PASTUSHOK e AXEROLD, 1976*) notaram-se diferenças entre os variantes utilizados: a linhagem A apresentou emergência dos es-

terífgmas primários, enquanto o variante V₄₉ só apresentou vesícula, sem nenhum esterífgma. O heterocariótico H₂ (Amarelo e Verde), confirmou a conidiação precoce, principalmente o H₂ Amarelo, no qual observaram-se, inclusive, conídios já formados. Já o variante V₅₀ e seu derivativo V_{50.1} não apresentaram qualquer diferenciação até 24 horas de crescimento, enquanto as linhagens A e MSF apresentaram períodos normais de desenvolvimento. Embora incompletos, esses dados poderiam reforçar a hipótese de que a presença da duplicação deve estar relacionada a alterações tanto de estruturas conidiais (Tabela 18) quanto do tempo da conidiogênese, já que se observaram marcantes variações para o início da conidiação entre os variantes analisados. Estudos desse tipo poderiam mostrar, inclusive, quais os passos afetados e quando ocorrem os bloqueios ou desvios, facilitando assim estudos subsequentes da bioquímica e genética dos mutantes.

Comparativamente em *Neurospora*, a conidiação precoce de certos mutantes parece depender de adenil ciclase defectiva e, às vezes, deficiências de cAMP (TERENZI e col., 1976); entretanto, a administração da adenil ciclase em *Aspergillus nidulans* resultou apenas em inibição da conidiação (CLUTTERBUCK, não publicado). Desse modo, o período de tempo requerido para o *A. nidulans* iniciar o desenvolvimento do conidióforo pode ser usado como um índice para a detecção de pequenos defeitos na diferenciação e crescimento. Aliás, os

fatores que precedem e determinam o momento da conidiação são muito controvertidos (*AXEROLD e col.*, 1973; *GEALT e AXEROLD*, 1974; *PATUSHOK e AXEROLD*, 1976) e a presença de duplicações torna muito mais complexo o mecanismo da conidiogênese.

Quanto ao método utilizado para tais observações, mostrou-se bastante eficiente, já que as hifas crescendo de maneira plana sobre a lamínula permitiram acompanhar o desenvolvimento das várias estruturas conidiais.

6.5. Diâmetro de conídios e núcleos

No presente trabalho procurou-se medir o maior número possível de variantes deteriorados e heterocarióticos, além dos respectivos diplóides, com relação ao diâmetro de núcleos e conídios, uma vez que em trabalhos anteriores poucos variantes foram analisados. Para tanto, utilizou-se o método de medição através de ocular micrométrica com charriot, que apesar de ser mais lento, foi o que mais se adaptou às condições existentes de trabalho.

Os resultados obtidos serão discutidos em separado, para variantes deteriorados e setores heterocarióticos.

6.5.1. Para variantes deteriorados

No caso de deteriorados, as médias obtidas para confídios e núcleos haplóides (Tabelas 20 a 22) mostraram que esses variantes apresentaram-se com diâmetros de confídios iguais, maiores ou menores do que a linhagem original com duplicação, mas, em geral, foram maiores do que as linhagens haplóides não duplicadas. No entanto, valores para diâmetro de núcleos apresentaram-se sempre menores do que os da linhagem A. A análise de variância mostrou, entretanto, que tais diferenças foram significativas apenas quando se compararam os diâmetros dos núcleos de tratamentos e testemunhas, indicando que a presença da duplicação (total ou parcial) pode ser detectada microscopicamente. Dados anteriores confirmam tais resultados (PAES DE BARROS, 1977),

Para os diplóides não se detectaram diferenças ao nível de confídios nem de núcleos (Tabelas 24 a 26) quando comparados com os diplóides controles. Nesse caso, baseando-se no fato de que a instabilidade apresentada, pela maioria dos diplóides obtidos, foi maior do que na linhagem A, devem ter ocorrido perdas constantes do segmento duplicado, conduzindo a uma uniformidade de tamanho para confídios e núcleos. Ao lado disso, a presença de segmentos duplicado em diplóides deve ser, provavelmente menos evidenciável do que em haplói-

des.

Da contagem do número de núcleos conidiais, tanto para haplóides (Tabela 23) quanto para diplóides (Tabela 27) verificou-se a presença de conídios binucleados para alguns deteriorados. Assim para o variante V_{50} a frequência de 5,42% de binucleados em 424 conídios observados pode ser correlacionada à presença de diversas alterações na conidiação (Tabela 18). Nesse caso a probabilidade de erros nas divisões mitóticas poderia explicar tais resultados, assim como os obtidos para o $V_{50.1}$ e V_{51} . Para os diplóides (Tabela 27) verificou-se que quase todos apresentaram uma pequena taxa de conídios binucleados. Uma explicação possível para esse fato poderia estar relacionada a um aumento na complexidade das divisões mitóticas, estando presentes segmentos duplicados nos diplóides. Além disso, a manutenção das anomalias de estruturas conidiais nos diplóides, poderia ser responsável pelo aparecimento de conídios binucleados. Esse fato, entretanto, foi averiguado no presente trabalho, apenas para os diplóides $V_{50} // MSE$ e $V_{50.1} // MSE$.

6.5.2. Para setores heterocarióticos

Para setores heterocarióticos, inicialmente, só foi possível a medição de conídios viáveis. Nesse caso, verificaram-se diferenças tanto entre conídios quanto entre nú-

cleos quando se compararam os tratamentos e os controles (Tabelas 28 a 30). Ao contrário do que foi observado para va-
riantes deteriorados (Tabelas 20 a 22), os valores médios para diâmetros de conídios foram sempre menores com relação à linhagem A. Também os núcleos mostraram-se com valores médios inferiores à linhagem com duplicação. Conídios verdes, entretanto, apresentaram-se maiores (inclusive os núcleos) do que os amarelos, em geral. Desse modo, a análise citológica pode, em muitos casos de instabilidade detectar a presença da duplicação (linhagem A e algumas colônias provenientes de co
nídios verdes) ou sua deleção (conídios amarelos). Para hete
rocarióticos não se encontraram conídios binucleados (Tabela 31) o que está de acordo com a hipótese, anteriormente aventa
da, de que a presença de anomalias nas estruturas conidiais estava correlacionada à ocorrência de conídios binucleados. Os heterocarióticos apresentaram-se, em geral, com conídios e estruturas conidiais normais (Tabela 19).

Dados anteriores mostraram que a linhagem portadora de duplicação apresenta diâmetros de núcleos conidiais maiores do que a linhagem não duplicada (PAES DE BARROS, 1977). Além disso, a deleção de segmentos duplicados em variantes melhorados ou a ocorrência de novas duplicações em tandem (nos deteriorados) altera o tamanho nuclear (PAES DE BARROS, 1977; GABRIELLI, 1978). Tais resultados são concordantes com os

obtidos no presente trabalho, indicando que tais alterações ao nível cromossômico podem ser detectadas também, citologicamente, apesar do tamanho reduzido dos cromossomos (ELLIOT, 1960). Paralelamente, núcleos de dissômicos em *A. nidulans* mostraram-se significativamente maiores do que linhagens haplóides e haplóides com duplicação (PIZZIRANI, 1977; GABRIELLI, 1978).

Para setores heterocarióticos não existem parâmetros para comparação, mas os conídios envolvidos são originados por deleções preferenciais ou manutenção da duplicação original, semelhantemente ao que ocorre com os setores melhorados. Nesse caso também, a análise citológica detectou diminuição ou manutenção do diâmetro nuclear.

Quanto à ocorrência de conídios binucleados entre variantes deteriorados, PAES DE BARROS (1977) também verificou o fenômeno, relacionando-o ao não balanceamento cromossômico ou à existência de um outro fator além da duplicação cromossômica. Com base nos dados obtidos no presente trabalho, poder-se-ia correlacionar agora a presença de conídios binucleados à ocorrência de anomalias estruturais na conidiação. Assim a presença da duplicação agiria de maneira indireta no número de núcleos. Quanto à existência de fatores genéticos, PIZZIRANI (1977) encontrou em linhagem MSE e dissômicos dela resultantes, alta frequência de binucleados relacionada à presença de gene simples, embora em *A. nidulans* os conídios sejam, de maneira geral, uninucleados (YUILL, 1950).

Para efeito de esclarecimentos os resultados obtidos, por este e outros autores, para medidas de confídios e núcleos em linhagens com duplicações, estão sumarizados na Tabela 63.

Apesar das diferenças de métodos utilizados e médias obtidas pelos diversos autores, a comprovação da presença de material genético duplicado na linhagem A pode ser constatada, já que em todos os casos o diâmetro médio dos núcleos foi maior na linhagem A em relação às linhagens haplóides consideradas. Apesar das médias obtidas, em todos os casos, para diâmetros de confídios apresentaram-se maiores, as diferenças não foram significativas, indicando que variações muito amplas possam ter contribuído para o aumento da média geral do diâmetro.

Quanto aos variantes deteriorados, verificaram-se diferenças entre todos os autores com relação às médias obtidas, mas a possibilidade de detecção microscópica da manutenção, aumento ou deleção de parte ou todo o segmento duplicado ficou evidenciada, já que os diâmetros dos núcleos, nesses variantes mostraram-se maiores (*PAES DE BARROS, 1977 e GABRIELLI, 1978*) iguais, maiores ou menores (no presente trabalho). Essas diferenças de resultados podem ser atribuídas aos tipos de variantes utilizados (por exemplo o V_8 , que produz muitos dissômicos deve ter realmente o núcleo maior); ao tipo e acuidade do método utilizado (por exemplo, as medidas

Tabela 63 - Comparação entre médias (μ) obtidas para diâmetro de confídios e núcleos em *Aspergillus nidulans* por diversos autores e diferentes métodos.

Linhagens e variantes	Autor e métodos utilizado				
	PAES DE BARROS (1977) Fotografia	PIZZIRANI (1977) Ocular micrométrica	GABRIELLI (1978) Câmara clara	CASE (1978) Ocular micrométrica	Autor (1978) Ocular micrométrica
Haplóides					
MSE		3,24(1,50)*	2,948(0,937)	3,3(-)	2,82(1,14)
<i>proA₁; pabaA₆; yA₂</i>	2,703(0,956)	3,02(1,53)			2,98(1,14)
A	2,953(1,071)	3,60(1,64)		3,9(-)	
V ₈			3,511(1,182)		
V ₄₆	2,968(1,084)				
V ₄₇					2,82(1,09)
V ₄₈					3,01(1,22)
V ₄₉					3,20(1,25)
V ₅₀					3,51(1,28)
V _{50.1}					3,10(1,14)
V ₅₁					3,12(1,23)
V _{51.1}					2,92(0,98)
V ₅₂					3,43(1,19)
Diplóides					
V ₄₆ // MSE	3,293(1,218)				
<i>proA₁; pabaA₆; yA₂</i> // MSE					3,71(1,34)
A// MSE				4,5(-)	4,06(1,62)
V ₄₇ // MSE					3,99(1,52)
V ₄₉ // MSE					3,91(1,36)
V ₅₀ // MSE					3,93(1,42)
V ₅₁ // MSE					3,99(1,59)
V ₅₂ // MSE					4,01(1,58)

* = Os valores, entre parênteses, referem-se aos diâmetros dos núcleos.

apresentadas por *CASE e ROPER (1978)* assemelham-se a outras medidas obtidas por esse autor, quando confídios não foram colorados e se utilizou uma ocular micrométrica de menor precisão); às técnicas de coloração, que podem alterar a forma e tamanho dos confídios e núcleos e finalmente ao número de repetições.

Assim sendo, outros métodos de avaliação do conteúdo nuclear poderiam ser utilizados resultando, talvez, em medições mais precisas das variações ocasionadas pela presença das duplicações. Medidas citofotométricas, por exemplo (como sugerido por *PAES DE BARROS, 1977*) deverão ser efetuadas em trabalhos posteriores.

6.6. Germinação de confídios

6.6.1. Em meio completo sólido

Os resultados obtidos (Tabela 32, Figura 13) para germinação em blocos de meio completo, mostraram que nem todos os variantes deteriorados atingiram os 94 a 98% de germinação esperados após 6 horas de incubação (*BAINBRIDGE, 1971*). Apesar da linhagem A apresentar-se com 90,48% de confídios germinando após 12 horas, apenas os variantes que, provavelmente perderam ou sofreram transposição da duplicação (V_{47} , V_{48} e $V_{51.1}$) mostraram-se mais eficientes e dentro da média esperada para linhagens normais de *A. nidulans*. Alguns deteriora-

dos apresentaram-se com médias inferiores à linhagem A (V_{49} , $V_{50.1}$, V_{51} e V_{52}) e nesses, várias modificações foram observadas ao nível de estruturas conidiais (Tabela 18). Os variantes V_{50} e $V_{50.1}$ não apresentaram conídios germinando na fase micelial (até 48 horas), enquanto que na fase conidial a germinação ocorreu de maneira, mais ou menos satisfatória. Sob esse aspecto, eles constituem-se em excelente material para estudos morfogenéticos, pois permanecem um longo período na fase micelial, sendo este um dos problemas básicos para estudos dessa natureza (SAXENA e SINHA, 1973, 1977).

Com relação à linhagem MSE (Tabela 32) a menor taxa de germinação observada, poderia estar relacionada ao grande número de marcas auxotróficas nela contidas, e estaria de acordo ainda com sua baixa taxa de crescimento inicial (Tabela 9). Correlacionando a taxa de germinação (Tabela 32) com a taxa de crescimento colonial (Tabela 9) podemos verificar que nem sempre ocorreu relação entre menor taxa de germinação e crescimento inicial mais lento. Baseando-se nesses fatos poder-se-ia sugerir que a presença da duplicação causaria alterações na germinação inicial dos conídios, mas não necessariamente no desenvolvimento das hifas.

No caso de heterocarióticos (Tabela 33, Figura 14), os setores H_1 e H_4 amarelos apresentaram-se com taxas de germinação menores do que a linhagem A, sendo que para os demais, os resultados apresentaram-se como o esperado. Em ge-

ral, conídios verdes germinaram melhor do que conídios amarelos, no caso de viabilidade dos dois tipos. Para os heterocarióticos, onde conídios amarelos mostraram-se inviáveis, as taxas de germinação para conídios verdes mostraram-se superiores às da linhagem com duplicação.

Possíveis explicações para tais resultados poderiam relacionar-se a ocorrência de deleções de tamanhos diversos para formar conídios verdes e amarelos. No caso de amarelos, com menor taxa de germinação, poderiam estar presentes, ainda, conídios letais entre os normais, diminuindo assim a porcentagem total de germinação.

6.6.2. Em meio completo líquido

Quando se acompanhou a germinação em meio completo líquido (Tabela 34, Figura 15) os resultados puderam ser relacionados mais facilmente ao crescimento de colônias (Tabela 9), pois a germinação foi acompanhada em intervalos menores de tempo. Com 4 horas todos os variantes deteriorados estavam germinando, exceto o V₅₀ e V_{50.1} miceliais (confirmando dados anteriores). A linhagem A apresenta, provavelmente, bloqueios na fase inicial da germinação ou possui conídios inviáveis, entre normais, o que poderia justificar seu menor crescimento (Tabela 9). A linhagem MSE mostrou pequeno desempenho nas 12 primeiras horas, mas após 24 horas (Tabela 9)

seu crescimento mostrou-se normal, sugerindo que a auxotrofia múltipla pode dificultar a elaboração e utilização dos nutrientes necessários à germinação inicial. Verificou-se ainda que, aqueles variantes que apresentaram-se com problemas na "largada" inicial do crescimento (Tabela 9) também mostraram-se com germinação inicial lenta (Tabela 34).

Para heterocarióticos, os confídios amarelos apresentaram-se com taxas de germinação menores do que confídios verdes (no caso de viabilidade dos dois tipos), similarmente ao que foi observado para germinação em blocos de meio completo.

Tanto para variantes deteriorados como para setores heterocarióticos, as taxas para 12 horas de germinação em meio completo sólido e meio completo líquido não foram coincidentes. Isto porque, avaliações quantitativas devem exigir talvez, maior número de repetições ou condições ambientais mais homogêneas. Entretanto, como o objetivo do ensaio era tentar correlacionar alterações no crescimento com capacidade de germinação em linhagens portadoras de duplicação e seus derivados, os métodos utilizados justificam-se.

Do exposto, algumas considerações podem ser apresentadas: a presença da duplicação parece interferir tanto na germinação quanto no crescimento de colônias da linhagem original; os variantes deteriorados, cuja duplicação é

perdida, parcial ou totalmente, germinam e crescem normalmente; aqueles que a mantêm, ou nos quais as duplicações sofrem transposições ou amplificações, podem apresentar alterações na germinação e crescimento; os setores heterocarióticos apresentam conídeos verdes com melhores taxas de germinação do que os amarelos, isto talvez se relacione com a extensão da deleção sofrida ou com a existência de conídeos letais entre normais.

6.7. Manipulação de conídeos letais em setores heterocarióticos

No presente trabalho foi possível a aplicação de uma técnica especialmente desenvolvida, a qual possibilitou a detecção de alguns fatos extremamente interessantes com relação a setores heterocarióticos. Foi possível, através de "pescagem", a separação de conídeos amarelos (letais) de verdes (viáveis). É uma técnica laboriosa, porém simples, não requerendo o uso de drogas como o pFA (ROPER e NGA, 1969) de alto custo, nem experimentos sofisticados como micromanipulador. Além disso, a seleção é totalmente dirigida pelo operador, que pode escolher o tipo de cabeça conidial a ser "pescada", enquanto no processo de ROPER e NGA (1969) a seleção é, ao acaso, e depende da inibição do crescimento de conídeos verdes pelo pFA, permitindo que os amarelos (letais) possam desenvolver-se, em parte, para formar diplóides com a linha

gem MSE. Naquele trabalho, somente os diplóides foram analisados e, apenas geneticamente. Já com a técnica agora proposta, os próprios confídios letais podem ser manipulados e analisados citologicamente, inclusive. A manutenção dos mesmos, entretanto, só foi possível através de diplóides balanceados.

Os resultados contidos na Tabela 36 mostram que apesar da constatação de 14 a 18% de confídios amarelos, através de análise microscópica, nenhuma colônia amarela resultou da semeadura de suspensão de confídios em meio completo. Resultados semelhantes foram obtidos no clássico trabalho de *ROPER e NGA (1969)* sem contudo a utilização de técnica microscópica. Parece, portanto, evidente que confídios amarelos (letais) coexistem apenas junto de confídios verdes nesses setores. A Figura 17 mostra as diferenças de coloração e tamanho que foram utilizadas para a contagem de cada tipo (*PIZZIRANI, não publicado*). Sob esse aspecto, *ROPER e NGA (1969)* relacionaram ao pequeno tamanho dos cromossomos em *A. nidulans* a impossibilidade de detecção da deleção. No presente trabalho, a técnica empregada permitiu não só a contagem da proporção de confídios viáveis e letais presentes no setor heterocariótico, como também a medição dos diâmetros de confídios e núcleos, possibilitando a detecção da deleção ao nível microscópico.

A Tabela 37 mostra que os valores médios encontrados para confídios e núcleos letais foi sempre significativamente menor (Tabelas 38 e 39) do que os da linhagem A e co-

nídios verdes. Inclusive, os núcleos de confídios amarelos foram menores do que os da linhagem não duplicada, evidenciando o fato da deleção ocorrida ter atingido mais do que a região da duplicação. Nesse caso, tanto os núcleos quanto os confídios letais tiveram seus diâmetros fortemente alterados (Tabelas 38 e 39); os coeficientes de variação obtidos mostraram a homogeneidade das medidas, e do evento observado para os heterocarióticos H_8 , H_9 , H_{15} e H_{16} .

Os diplóides balanceados obtidos (Tabela 40), apresentaram também diferenças estatisticamente significativas (Tabelas 41 e 42) principalmente com relação ao diâmetro dos núcleos. Diplóides resultantes do cruzamento entre confídios amarelos e MSE, apresentaram-se com núcleos menores (hipodiplóides) do que os similares resultantes do cruzamento entre confídios verdes e MSE. Todos os diplóides, entretanto, apresentaram-se com confídios e núcleos menores do que o diplóide $A//MSE$ e menores ou maiores do que o diplóide $proA_1$; $pabaA_6$; $yA_2//MSE$.

Desse modo, o caráter hipohaplóide e hipodiplóide dos núcleos de confídios amarelos pode ser evidenciado citologicamente, quando esses resultados foram comparados com similares em heterocarióticos apresentando confídios amarelos e verdes viáveis (Tabela 28). Além disso, a análise genética efetuada confirmou a ocorrência de deleção no grupo de ligação II (Tabela 59).

Os testes de germinação aplicados em separado, para os dois tipos de conídios, indicaram que o bloqueio é inicial e ocorre nas primeiras fases do desenvolvimento de conídios amarelos, já que em todos os casos observados ocorreram diferenças marcantes nas taxas de germinação de conídios amarelos e verdes. Assim, a Tabela 43 e Figura 18 mostram que para conídios verdes a taxa de germinação esteve em torno de 74 a 90% (com 12 horas) sendo que para o H_{16} a taxa foi bastante baixa (23%) e nesse caso, dados genéticos também não foram obtidos. Já para conídios amarelos a taxa de germinação variou entre 1,6 a 10% indicando que poucos dos conídios existentes no setor heterocariótico conseguem, pelo menos, iniciar a germinação. Nesses, outros bloqueios devem ocorrer posteriormente, desde que nenhuma colônia amarela foi obtida por semeadura em meio completo (Tabela 36).

Possíveis correlações e explicações genéticas para os dados obtidos para setores heterocarióticos com conídios hipohaplóides estão discutidas no item 6.8.2. e Figura 21.

6.8. Análise genética

6.8.1. Análise genética das linhagens deterioradas

Das seis linhagens deterioradas analisadas, todas provenientes da linhagem A com duplicação cromossômica,

duas delas foram extremamente instáveis e quatro foram mais estáveis, sendo que uma delas totalmente estável. A análise genética dessas quatro últimas linhagens (V_{49} , V_{50} , V_{51} e V_{52}) revelou que para todas elas, um único determinante de deterioração estava envolvido em cada caso (V_{49} , V_{50} , V_{51} e V_{52} , respectivamente). Isso pode ser evidenciado tanto pela análise mitótica (Tabela 44) como pela análise meiótica (Tabela 53). Em apenas um caso (V_{52}) a segregação meiótica de 1 normal : 1 deteriorado não foi obtida mas isso pode ser explicado por seleção contra colônias originárias de ascósporos possuindo o determinante de deterioração, fato aliás constatado por outros autores (AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971). Em todas essas quatro linhagens analisadas os determinantes de deterioração localizaram-se em grupos de ligação não envolvidos na aberração cromossômica inicial; portanto, segundo a hipótese de AZEVEDO e ROPER (1970), essas linhagens deterioradas possivelmente resultaram de transposições de duplicações em tandem que ocorreram na duplicação original, para outros grupos de ligação no genoma. Tal fato explica não só a ocorrência desses determinantes de deterioração, como a maior estabilidade das linhagens. Inclusive, a linhagem V_{49} foi totalmente estável (Tabela 9) e seus conídios são amarelos o que indica que o segmento cromossômico contendo o alelo yA_2^+ foi perdido. Isso é confirmado pelo crescimento dessa linhagem que é igual ao da linhagem haplóide e melhor do que o da linhagem com duplicação (Tabelas 9, 10 e 11). A seleção contra seto-

res w^+ no caso da análise mitótica de V_{49} (Tabela 44) talvez ocorreu devido ao fato de que, sendo o diplóide $V_{49} // MSE$ de confídios amarelos, quase que somente setores brancos tenham sido observados e analisados em detrimento de poucos setores haplóides amarelos que são mascarados pelo diplóide também amarelo. Assim, V_{49} deve representar uma linhagem deteriorada que, além de ter sofrido transposição de material genético para o grupo de ligação VI, também perdeu o segmento em duplicata translocado ao grupo de ligação II.

Das três outras linhagens relativamente estáveis (V_{50} , V_{51} e V_{52}) os três determinantes de deterioração foram inequivocamente localizados nos grupos de ligação VIII, VIII e III, respectivamente, e em dois deles (V_{50} e V_{52}) a presença da duplicação original pode ser confirmada pela ausência de setores w^+ na análise mitótica (Tabela 44); no caso de V_{51} setores haplóides w e w^+ foram obtidos (Tabela 44), embora a linhagem tivesse confídios verdes (Tabela 7). Isso talvez seja devido a perda do segmento em duplicata no diplóide $V_{51} // MSE$ quando colocado no meio de haploidização.

As duas linhagens deterioradas extremamente instáveis (V_{47} e V_{48}) analisadas tiveram sua análise genética dificultada pela sua instabilidade. Setores deteriorados iguais ou semelhantes a estes, são bastante comuns a partir da linhagem com duplicação, mas devido sua alta instabilidade não são suscetíveis de uma análise genética mais precisa; possivelmen

te representem casos de duplicações em tandem que ocorrem nos segmentos em duplicata e sejam eles que em uma segunda etapa originam os deteriorados mais estáveis como os analisados anteriormente; devido a essa alta instabilidade, essa primeira etapa nem sempre é detectada (AZEVEDO e ROPER, 1970) e, possivelmente tanto o $V_{4,7}$ como $V_{4,8}$ representem setores semelhantes aos descritos por *NGA e ROPER (1968)* que foram os primeiros setores deteriorados analisados geneticamente e que levaram à hipótese de que eles seriam duplicações em tandem em um dos segmentos em duplicata. De fato, tanto no caso de *NGA e ROPER (1968)* como no presente trabalho os determinantes de deterioração parecem localizar-se nos grupos de ligação envolvidos na duplicação (Tabela 44). As análises meióticas para esses deteriorados (Tabelas 45, 46 e 53) ficaram prejudicadas pela alta instabilidade dos mesmos; as segregações não permitiram concluir sobre a existência de um único determinante de deterioração em cada caso. Além disso, uma ligação genética entre o possível determinante de deterioração e as marcas para galactose e acetato foi detectada no caso de $V_{4,7}$ (Tabela 45). Várias explicações, no caso, são possíveis embora especulativas. Uma delas seria de que durante o processo de análise da linhagem $V_{4,7}$, altamente instável, tivesse ocorrido transposição ou transposições de material genético para os grupos de ligação contendo aqueles genes. No entanto, como essa linhagem devido sua instabilidade foi perdida no processo de estocagem, qualquer tentativa para explicar melhor o fenômeno

seria infrutífera. Mais deteriorados do mesmo tipo deverão ser isolados e derivativos mais estáveis obtidos a partir deles analisados, resultando talvez em conclusões mais definitivas.

Dois derivativos das linhagens deterioradas obtidas foram analisados ($V_{50.1}$ e $V_{51.1}$). Em ambos os casos os confídios dessas linhagens eram amarelos (Tabela 7) indicando perda de parte ou todo o segmento duplicado, o que aliás é corroborado pelo seu maior crescimento (Tabela 9). Em ambos os casos a pequena proporção de setores haplóides amarelos obtidos (Tabela 44) pode ser explicada da mesma forma que para V_{49} , ou seja pela seleção visual contra os mesmos e não devido a presença de aberração cromossômica. Em ambos os casos também ficou evidente a presença de um único determinante de deterioração para cada linhagem ($V_{50.1}$ e $V_{51.1}$) segregando como genes simples e localizados em grupos de ligação diferentes daqueles do determinante original (Tabelas 44 e 53). Duas explicações podem ser mencionadas no caso: na primeira pode-se supor transposição do determinante para outro grupo de ligação como observado por AZEVEDO e ROPER (1970). Uma segunda explicação seria um evento duplo, ou seja, reversão do determinante original e um segundo determinante tendo ocorrido. Esses casos parecem ter sido constatados, embora houvesse indução por agentes mutagênicos no caso (ROSATO, 1973; ROSATO e AZEVEDO, em publicação). Reversões também foram observadas

por *MENEZES e AZEVEDO (1978)*, mas essas em geral são devidas a genes supressores da deterioração.

O resultado das análises genéticas (Tabelas 44 a 52), bem como testes de alelismo com linhagens portadoras de determinantes de deterioração localizados nos mesmos grupos de ligação e já obtidos anteriormente por outros autores (Tabelas 61 e 62), permitiram a construção do mapa genético apresentado na Figura 19. Esse mapa revela importantes aspectos do fenômeno da instabilidade em *A. nidulans* ou seja, de que vários grupos de ligação estão envolvidos, que a alta instabilidade parece estar ligada aos grupos de ligação envolvidos na duplicação, o que reforça a hipótese de que deterioração se origine por transposição de duplicação em tandem e, finalmente que possíveis transposições ocorram como no caso de $V_{50.1}$ e $V_{51.1}$, respectivamente, ambos transpostos para o grupo de ligação I. Esses e outros dados parecem indicar que existem certas regiões do genoma onde os segmentos transpostos se inserem com maior preferência como parece ser o caso da região próxima ao locus $rib\beta_2$ onde, possivelmente, V_{51} está localizado. Nessa região são conhecidos pelo menos 7 determinantes de deterioração dos 51 já analisados (*AZEVEDO, ROSATO, MENEZES, PAES DE BARROS, NIFFINEGGER e SOUZA e FAVRAUD, em publicação*). Também um modelo baseado na hipótese de *NGA e ROPER (1968)* e *AZEVEDO e ROPER (1970)* está representado na Figura 20 para explicar a origem das linhagens deterioradas e

—|— = Marcadores genéticos.

—|— = Ligado a marca correspondente, podendo estar de qualquer lado.

—▲— = Determinantes de deterioração.

Figura 19 - Localização dos determinantes de deterioração nos grupos de ligação em *A. nidulans*.

seus derivativos, analisados no presente trabalho.

Fato interessante foi que com relação ao grupo de ligação VI, novamente o determinante de deterioração mapeado nesse grupo não mostrou ligação com o marcador $\Delta B3$, confirmando resultados de outros autores, que até o presente não obtiveram qualquer determinante de deterioração ligado àquela marca. Como no grupo de ligação VI existem outros marcadores (CLUTTERBUCK, 1974) sugere-se que esses sejam ensaiados para ligação com os determinantes de deterioração até agora obtidos e localizados naquele grupo de ligação.

6.8.2. Análise genética de componentes de setores heterocarióticos

Dos quatro tipos visualmente possíveis de setores heterocarióticos provenientes da linhagem A, portadora de duplicação cromossômica, dois foram encontrados no presente trabalho. O primeiro tipo é o que possui tanto confídios verdes como amarelos viáveis e quatro desses casos (H_1 , H_2 , H_3 e H_4) foram analisados. O segundo tipo encontrado é o que produz apenas confídios verdes capazes de produzir colônias (H_5 , H_6 , H_7 , H_8 , H_9 , H_{15} e H_{16}). A análise genética do primeiro tipo de setores revelou que o componente amarelo deve ser o resultado de núcleo onde houve perda do alelo $yA2^+$ possivelmente por deleção parcial ou total do segmento translocado.

Figura 20 - Modelo para explicar a origem das linhagens deterioradas e seus derivativos, analisados no presente trabalho.

Como, em cada componente analisado, o segmento perdido pode ter diferentes comprimentos, cada heterocário desse tipo se comporta diferentemente, como aliás é possível verificar pela relação conidial (Tabela 8) que é um reflexo da relação nuclear das hifas do heterocário (*CLUTTERBUCK e ROPER, 1966*). No entanto, interessante é notar que mesmo o componente verde desses heterocários tem diferenças morfológicas em comparação com a linhagem original A (Tabelas 15, 16 e 17) e diferenças no próprio tamanho de conídio e núcleo em relação à linhagem A (Tabelas 28, 29 e 30). Mesmo a análise genética mostra que embora os grupos de ligação III e VIII segreguem normalmente na haploidização, existem em alguns casos e não em outros, seleção contra certos alelos nos grupos de ligação I e II. A diminuição de setores $pro^- paba^-$ em meio de haploidização foi também notada por *AZEVEDO e ROPER (1970)* em estudos envolvendo a linhagem duplicada A. A seleção contra o alelo w^+ no grupo de ligação II pode indicar a presença da duplicação; em certos casos, no entanto, o componente verde do heterocário, que seria a linhagem A, não apresentou essa seleção, o que pode indicar que no caso a duplicação não foi perdida. O setor H_3 é um bom exemplo de que o componente heterocariótico verde deve ser bem diferente da linhagem A, pois nesse caso também as segregações meióticas foram anômalas para alelos $proA_1$ e $pabaA_6$ (Tabelas 55 e 58). Tudo isso leva à hipótese de que um setor heterocariótico seja resultado de um evento talvez envolvendo recombinação mitótica entre os segmentos em dupli-

cata, produzindo dois componentes diferentes da linhagem A original que então originam um heterocário balanceado, diretamente ou após novas modificações. Mesmo o segundo tipo de setor analisado, aquele que só dá conídios verdes viáveis, reforça essa hipótese. Nesse caso era de se esperar que o componente verde fosse a linhagem A e que o componente amarelo inviável fosse resultado de uma deleção que atinge inclusive a parte não duplicada do grupo de ligação II, o que daria um hipohaplóide inviável. De fato as análises genéticas dos componentes amarelos, conseguidas através da nova técnica introduzida no presente trabalho, indicaram letalidade associada ao grupo de ligação II (Tabela 54) embora o segmento deletado não afetasse os resultados normais de segregação meiótica (Tabela 60). Evidências da perda de material genético foram conseguidas ainda no caso dos componentes amarelos letais de setores heterocarióticos, através de análise citológica de núcleos que foram sempre menores nos mesmos em comparação inclusive com linhagens haplóides (Tabelas 37, 38 e 39). No entanto, mesmo nos casos de um componente letal, o componente verde viável também é alterado em relação à linhagem A, no que se refere a caracteres morfológicos como altura e diâmetro do pedúnculo e altura do conidióforo (Tabelas 15, 16 e 17). Também os núcleos são menores que os da linhagem A (Tabelas 28, 29 e 30) e na análise mitótica (Tabela 54) houve seleção contra o alelo w^+ em alguns casos e não em outros, como também houve forte seleção contra os alelos *proA₁* e *pabaA₆* no grupo

de ligação I, como no caso de H_6 , indicando um possível letal nesse grupo.

Especulativamente pode-se pensar em um modelo hipotético para explicar os resultados aqui obtidos para os setores heterocarióticos analisados através de seus componentes verdes e amarelos. Se supusermos que, eventualmente, possa ocorrer uma inversão no segmento em duplicata translocado para o grupo de ligação II na linhagem A, uma permuta mitótica entre as duas regiões em duplicata originaria um cromossomo com dois centrômeros, que durante a divisão celular poderiam ir a polos opostos originando deleções e novas duplicações. Se esse fosse o processo de formação de deleções e duplicações na linhagem A, isso poderia explicar a alta variabilidade encontrada em componentes verdes de setores heterocarióticos bem como na de setores amarelos viáveis e letais (Figura 21). Evidentemente, muito mais dados experimentais seriam necessários para confirmar ou não essa hipótese, mas ela não deixa de ser tentadora para ser analisada futuramente, não só em relação aos setores heterocarióticos mas para todo o fenômeno de instabilidade mitótica envolvendo a linhagem A com duplicação cromossômica. Fica difícil supor que essa inversão já exista na linhagem original A, pois se esse fosse o caso ela já teria sido observada por análises meióticas; no entanto, sendo ela instável e originando duplicações como supuseram *NGA e ROPER (1968)*, também inversões, eventualmente, po-

deriam se originar desencadeando então o processo sugerido aci
ma. Inclusive essas inversões talvez estivessem relacionadas
com segmentos de inserção que recentemente têm sido descritos
em bactérias (COHEN, 1976). Similaridades existem entre os
segmentos de inserção e transposons em bactérias e os proces-
sos de instabilidade em eucariotos superiores como em milho
(NEVERS e SAEDLER, 1977) e *A. nidulans* (MENEZES e AZEVEDO,
1978). Se essas similaridades são ao nível apenas de observaa
ção ou se a nível de mecanismos, só novos e mais detalhados
experimentos é que poderão decidir.

Figura 21 - Modelo para explicar os diversos tipos de componentes obtidos em setores heterocarióticos.

Haplóide amarelo viável. Perda parcial da duplicação. Ex.: possivelmente H₄A.

Linhagem A original.

Linhagem mais duplicada que a original. Possivelmente mais instável ainda dando derivativos de diversos tipos.

Deleção no I.

Figura 21 - Continuação.

7. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

a) Variação de temperatura tem influência no fenômeno da instabilidade mitótica em *A. nidulans*. Houve aumento na frequência total de setores, assim como daqueles setores resultantes de deleções do segmento translocado do grupo de ligação I para o grupo de ligação II (setores amarelos). A elevação da temperatura também favoreceu o aumento do número de setores gêmeos.

b) Houve alterações de germinação, conidiogênese e crescimento de colônias em variantes deteriorados, quando comparados com a linhagem original portadora de duplicação. Esta também apresentou germinação, morfologia e taxa de crescimento alterados quando comparada com a linhagem haplóide estável.

c) Núcleos conidiais da linhagem A e de varian

tes deteriorados e heterocarióticos tiveram seus diâmetros alterados pela presença ou excisão do segmento duplicado, quando comparados com os de linhagens haplóides sem duplicação.

d) A técnica de "manipulação de cabeças conídiais", especialmente desenvolvida para a análise de componentes letais de setores heterocarióticos, permitiu a comprovação citológica e genética da ocorrência de deleção maior do que o segmento duplicado original, assim como o caráter hipohaplóide dos conídios apresentando letalidade.

e) As análises genéticas realizadas nos variantes deteriorados mostraram que os determinantes de deterioração situaram-se em grupos de ligação diferentes daquele originalmente envolvido na duplicação e, na maioria dos casos, apenas um gene estava envolvido. Casos de transposição foram verificados, assim como a ocorrência de novas duplicações em tandem, sendo esses fatos corroborados por evidências citológicas. Para os componentes de setores heterocarióticos verificou-se, genética e citologicamente, a ocorrência de excisões, tanto no segmento original duplicado quanto no translocado, atingindo toda, parte, ou mais do que região envolvida na duplicação. Os dados obtidos confirmam o modelo proposto para explicar tais resultados.

8. SUMMARY

The present research was carried out aiming the study of mitotic instability, from the genetic and cytological point of view, on heterokaryotic sectors and deteriorated variants obtained spontaneously from the strain A of *Aspergillus nidulans*. Also the frequency of sectors on different temperatures was studied.

The duplication strain produces sectors which frequency was altered by the different temperatures used. At the highest temperature used (40°C) there was an increase on the total number of sectors and also on the number of yellow sectors (originated from deletion of the translocated segment attached to linkage group II). Also twin sectors of various types were more frequently obtained with the temperature increase.

Cytological analysis of deteriorated variants have shown that several alterations on the conidial structure

were observed; the same is not true for the components of heterokaryotic sectors analysed. Changes in the germination rates were also observed for some variants.

The presence of duplication have altered the nuclei diameter of the conidia on the deteriorated and heterokaryotic variants. Partial or total deletion of duplication was detected by cytological and genetic methods. A special technique was developed which permitted to observe that the deletion have altered germination, as well conidia and nuclei size.

Genetic analysis of deteriorated variants have shown that the determinants of deterioration were located in several of the eight linkage groups; for most events a single gene was involved. Cases of transposition and new tandem duplications were detected. For the components of the heterokaryotic sectors several cases of deletions on the duplication segments were detected.

9. LITERATURA CITADA

- AGNIHOTRI, V.P., 1967. Role of trace elements in the growth and morphology of five ascosporic *Aspergillus* species. *Canadian Journal of Botany*, 45:73-79.
- ALDERSON, T., 1966. Unstable genes in *Drosophila*. *Heredity*, 21:528.
- ALMEIDA, L.M., 1976. Obtenção de linhagens com duplicações cromossômicas em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter e sua instabilidade. Piracicaba, ESALQ/USP, 122p. (Tese de Mestrado).
- ANDERSON, J.G. e J.E. SMITH, 1972. The effects of elevated temperatures on spore swelling and germination in *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 18:289-297.
- ANDERSON, P.R. e J.R. ROTH, 1977. Tandem duplications in phage and bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 31: 473-505.
- ANDERSON, R.P. e J.R. ROTH, 1978. Tandem chromosomal duplications in *Salmonella typhimurium*: Fusion of histidine genes to novel promoters. *Journal of Molecular Biology*, 119(1):146-166.

- APIRION, D., 1962. A general system for automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice versa in micro-organisms. *Nature*, 195:959-961.
- ARLETT, C.F., M. GRINDLE e J.L. JINKS, 1962. The "red" cytoplasmic variant of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 17:197-209.
- AXEROLD, D.E., 1972. Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *A. nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 73:181-184.
- AXEROLD, D.E., M. GEALT e M. PASTUSHOK, 1973. Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Developmental Biology*, 34:9-15.
- AZEVEDO, J.L., 1971. Mitotic non conformity in *Aspergillus nidulans*. England, University of Sheffield. 240p. (Ph. D. Thesis).
- AZEVEDO, J.L., 1972. O ciclo parassexual em fungos. *Revista de Microbiologia*, 3:157-168.
- AZEVEDO, J.L., 1975. Altered instability due to genetic changes in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 26:55-61.
- AZEVEDO, J.L., 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, 2:3-15.
- AZEVEDO, J.L. e J.A. ROPER, 1967. Lethal mutations and balanced lethal systems in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 49:149-155.
- AZEVEDO, J.L. e J.A. ROPER, 1970. Mitotic non conformity in *Aspergillus*: successive and transposable genetic changes. *Genetical Research* (Cambridge), 16:79-93.
- AZEVEDO, J.L., A. OLIVEIRA e A.J. ROCHA CAMPOS, 1976. Replí-cador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. *Summa Phytopathologica*, 2:237-241.

- AZEVEDO, J.L. e E. PACHECO SANTANA, 1975. The use of chloroneb to obtain haploid segregants from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 13:6.
- AZEVEDO, J.L., E.P. SANTANA e R. BONATELLI JR., 1977. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 48:163-172.
- BALL, C., 1967. Chromosome instability related to gene suppression in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research* (Cambridge), 10:173-183.
- BALL, C. e J.L. AZEVEDO, 1964. A "fluffy" mutant in *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 5:9.
- BALL, C. e J.L. AZEVEDO, 1976. Genetic instability in parasexual fungi. In: 2nd International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. New York, Academic Press, 243-251.
- BAINBRIDGE, B.W., 1963a. Study of a translocation affecting morphology. *Aspergillus News Letter*, 4:20-21.
- BAINBRIDGE, B.W., 1963b. Genetic analysis of morphological mutants. *Aspergillus News Letter*, 4:26.
- BAINBRIDGE, B.W., 1966. Table of located or partially located mutants and revised map of linkage group III. *Aspergillus News Letter*, 7:19-21.
- BAINBRIDGE, B.W., 1971. Macromolecular composition and nuclear division during spore germination in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 66:319-325.
- BAINBRIDGE, B.W., 1972. Isolation and analysis of temperature sensitive mutations affecting spore germination and growth in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 29:130.

- BAINBRIDGE, B.W., 1976. Estimation of the generation time and peripheral growth zone of *Aspergillus nidulans* and *Alternaria solani* hyphae from radial growth rates and ranges in apical cell length. *Journal of General Microbiology*, 97(1):125-127.
- BAINBRIDGE, B.W. e J.A. ROPER, 1966. Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 42:417-424.
- BAINBRIDGE, B.W. e A.P.J. TRINCI, 1969. Colony and specific growth rates of normal and mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, 53:473-475.
- BARACHO, I.R., R. VENCovsky e J.L. AZEVEDO, 1970. Correlations between size and hybrid or selfed state of cleistothecia in *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, 54:109-116.
- BARNETT, W.E. e F.J. DeSERRES, 1963. Fixed genetic instability in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 48:717-723.
- BARTNICKI-GARCIA, S., 1973. Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. *Symposium Society of General Microbiology*, 23:245-267.
- BIAGI, C.M.R., 1977. Mutantes morfológicos induzidos por 8-metoxipsoraleina e luz ultra-violeta em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 150p. (Tese de Mestrado).
- BIRKETT, J.A. e J.A. ROPER, 1977. Chromosome aberrations in *Aspergillus nidulans*. In: Smith, J.E. e J.A. Pateman (ed.). *Genetics and Physiology of Aspergillus*. London. Academic Press, p.292-303.
- BOLLON, A.P., 1975. Gene duplication and fusion genesis of the IVL-1 multi functional gene in *S. cerevisiae*. *Genetics*, 80 (3 part 1).

- BONATELLI JR., R., 1977. Estabilidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, ESALQ/USP, 126p. (Tese de Mestrado).
- BONATELLI JR., R. e J.L. AZEVEDO, 1977. Effects of ethidium bromide in diploid and duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Experientia*, 33:311-312.
- BORDER, D.J. e A.P.J. TRINCI, 1970. Fine structure of the germination of *Aspergillus nidulans* conidia. *Transactions of the British Mycological Society*, 54:143-152.
- BRIDGES, B.A., R.E. DENNIS, R.J. MUNSON e M.A. ROTHWELL, 1971. A mutational instability associated with an ochre suppressor in *Escherichia coli*. *Heredity*, 27(3):485-486.
- BULL, A.T., 1970. Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. *Journal of General Microbiology*, 63:75-94.
- BULL, A.T. e B.L.A. CARTER, 1973. The isolation of tyrosinase from *Aspergillus nidulans* cell walls, its kinetic and molecular properties and some consideration of its activity "in vivo". *Journal of General Microbiology*, 75:61-63.
- BULL, A.T. e A.P.J. TRINCI, 1977. The physiology and metabolic control of fungal growth. *Advances in Microbial Physiology*, 15:2-76.
- BURNS, J.A. e D.V. GERSTEL, 1967. Flower color variegation and instability of a block of heterochromatin in *Nicotiana*. *Genetics*, 57:155-167.
- BURR, K.W., H.M. PALMER and J.A. ROPER, 1971. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the effect of reduced DNA repair. *Heredity*, 27:487.
- CAMPBELL, D.A., S. FOGEL e K. LUSNAK, 1975. Mitotic chromosome loss in a disomic haploid of *S. cerevisiae*. *Genetics*, 79(3):383-396.

- CASE, B.L. e J.A. ROPER, 1975. Genetic imbalance and mitotic nonconformity in *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 13:8-11.
- CASE, B.L. e J.A. ROPER, 1978. Conidiospore size in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 14:20-24.
- COCHRANE, V.W., 1958. Physiology of fungi. New York, John Wiley e Sons. Inc. 524p.
- COHEN, S.N., 1976. Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature* (London), 263:731-738.
- COHEN, S.N. e D.J. KOPECKO, 1976. Structural evolution of bacterial plasmids role of translocating genetic elements and DNA sequence insertions. *Federation Proceedings*, 35(9):2031-2036.
- COLLINS, O.R., C.D. THERRIEN e D.A. BETTERLEY, 1978. Genetical and cytological evidence for chromosome elimination in a true slime mold *Didymium iridis*. *American Journal of Botany*, 65(6):660-670.
- COOKE, R.C. e D.T. MITCHELL, 1970. Carbohydrate physiology of sclerotia of *Claviceps purpurea* during dormancy and germination. *Transactions of the British Mycological Society*, 54:93-99.
- COOKE, P., J.A. ROPER e W. WATMOUGH, 1970. Trypan blue induced deletions in duplications strains of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 226:276-277.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1969a. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 63:317-327.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1969b. Cell volume per nuclei in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 55:291-299.

- CLUTTERBUCK, A.J., 1970a. Synchronous nuclear division and septation in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 60:133-135.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1970b. A variegated position effect in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 16:303-316.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 70:423-435.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1973. Interrelations between development and pigmentation during conidiation of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 74:50.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1974. *Aspergillus nidulans*. In: King, R.C. (ed.). *Handbook of Genetics*. I. New York, Plenum Press, p.446-510.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1975. Cyclic AMP levels during growth and conidiation. *Aspergillus News Letter*, 12:13-15.
- CLUTTERBUCK, 1977. The genetics of conidiation in *Aspergillus nidulans*. In: Smith, J.E. e J.A. Pateman (ed.). *Genetics and Physiology of Aspergillus*. London, Academic Press, p.305-317.
- CLUTTERBUCK, A.J. e J.A. ROPER, 1966. A direct determination of nuclear distribution in heterokaryons of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 7:185-194.
- DANTAS D'ARCE, M.M.C., 1972. Contribuição ao estudo de aberrações cromossômicas numéricas em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP. 50p. (Tese de Mestrado).
- DARLINGTON, O., 1966. Instabilities in *Salmonella typhimurium*. *Heredity*, 21:527-528.
- DAWSON, G.W.P. e P.F. SMITH-KEARY, 1963. Episomic control of mutation in *Salmonella typhimurium*. *Heredity*, 18:1-20.

- DEMEREK, M., 1932. Effect of temperature on the rate of change of the unstable miniature 3-gamma gene of *Drosophila virilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 18:430-434.
- DEMEREK, M., 1941. Unstable genes in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 9:145-167.
- DOOLITTLE, W.F., 1978. Genes in pieces: were they ever together? *Nature* (London), 272(13):581-582.
- DORN, G.L., 1970. Genetic and morphological properties of undifferentiated and invasive variants of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 66:267-279.
- DORN, G.L., G.M. MARTIN e D.M. PURNELL, 1967. Genetic and cytoplasmic control of undifferentiated growth in *Aspergillus nidulans*. *Life Science*, 6:629-633.
- DUNNET, C.W., 1964. New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20(3):482-491.
- ELLIOT, C.G., 1960. The cytology of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 1:462-476.
- EMERSON, R.A., 1914. The inheritance of a recurring variation in variegated ears of maize. *American Naturalist*, 48:87-115.
- EMERSON, R.A., 1917. Genetical studies on variegated pericarp in maize. *Genetics*, 2:1-35.
- EPHRATI-ELIZUS, E. e S. LUTHER-DAVIES, 1977. Phenotypic instability in a tip-2 mutant of *Escherichia coli*. III Suppression of thermo-induction and filamentation. *Molecular General Genetic*, 155(2):163-170.
- FABERGÉ, A.C. e G.H. BEALE, 1942. An unstable gene in *Portulaca*: mutation rate at different temperatures. *Journal of Genetics*, 43:173-187.

- FELDEN, R.A., M.M. SANDERS e N.R. MORRIS, 1976. The presence of histories in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Biology*, 68:430-439.
- FIDDY, C. e A.P.J. TRINCI, 1976. Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 97:169-184.
- FINCHAM, J.R.S. e G.R.K. SASTRY, 1974. Controlling elements in maize. *Annual Review of Genetics*, 8:15-50.
- FLETCHER, J. e A.G. MORTON, 1970. Physiology of germination of *Penicillium griseofulvum* conidia. *Transactions of the British Mycological Society*, 54:65-81.
- FLORANCE, E.R., W.C. DENISON e T.C. ALLEN, 1972. Ultrastructure of dormant and germinating conidia of *Aspergillus nidulans*. *Mycologia*, 64:115-123.
- FOSTER, J.W., 1949. "Chemical Activities of Fungi". New York, Academic Press. 648p.
- FULLER, M.S., 1976. Mitosis in fungi. *International Review of Cytology*, 45:113-151.
- GABRIELLI, A.C., 1978. Estudos citogenéticos em uma linhagem deteriorada (V₈) de *Aspergillus nidulans* e seus derivados. Piracicaba, ESALQ/USP, 101p. (Tese de Mestrado).
- GAVAZZI, G., M. SANDRI, G. ANZANI e A. GHIDONI, 1977. Chromosomal instability associated with duplications in maize. *Heredity*, 38(3):349-358.
- GEALT, M.A. e D.E. AXEROLD, 1974. Coordinate regulation of enzyme inducibility and developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Developmental Biology*, 41:224-232.
- GEALT, M.A., G. SHEIRNEIN e N.R. MORRIS, 1976. The isolation of nuclei from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 94(1):204-210.

- GILBERT, W., 1978. Why genes in pieces? *Nature* (London), 271(9):501.
- GOLDSTEIN, A. e J.S. SMOOT, 1955. A strain of *Escherichia coli* with an unusually high rate of auxotrophic mutation. *Journal of Bacteriology*, 70:588-595.
- GOWEN, J.W. e E.H. GAY, 1933. Effect of temperature on everporting eye colour in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 72:312.
- GREEN, M.M., 1967. The genetics of a mutable gene at the white locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 56:467-482.
- GREEN, M.M., 1969. Controlling elements mediated transpositions of the white gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 61:429-441.
- GREEN, M.M., 1973. Some observations and comments on mutable and mutator genes in *Drosophila*. *Genetics supplement*, 73:187-194.
- GREEN, M.M., 1975. Genetic instability in *Drosophila melanogaster*. Mutable miniature [m^U]. *Mutation Research*, 29:77.
- GREENBLATT, I.M., 1966. Transposition and replication of modulator in maize. *Genetics*, 53:361-369.
- GREENBLATT, I.M., 1968. The mecanism of modulator transposition in maize. *Genetics*, 58:585-597.
- GREENBLATT, I.M. e R.A. BRINK, 1962. Twin mutations in medium variegated pericarp in maize. *Genetics*, 47:489-501.
- GREENBLATT, I.M. e R.A. BRINK, 1963. Transpositions of modulator in maize into divided and individed chromosome segments. *Nature* (London), 197:412-413.

- GROSE, S. e A.J. CLUTTERBUCK, 1975. "Fluffy" colonies obtained from *Aspergillus* conidia after ageing and other treatments. *Aspergillus News Letter*, 13:17-18.
- HABER, J.E., 1974. Bisexual mating behavior in a diploid of *S. cerevisiae*: evidence for genetically controlled non-random chromosome loss during vegetative growth. *Genetics*, 78:843-858.
- HANSCHÉ, P.E., 1975. Gene duplication as a mechanism of genetic adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 79(4):661-674.
- HANSCHÉ, P.E., V. BERES e P. LANGE, 1978. Gene duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 88(4):673-687.
- HARRISSON, B.J., 1971. Association of three highly mutable genes in *Antirrhinum majus*. *Heredity*, 27(3):488.
- HARRISON, B.J. e J.R.S. FINCHAM, 1964. Instability at the pal locus in *Antirrhinum majus*. *Heredity*, 19:237.
- HARRISON, B.J. e R. CARPENTER, 1977. Somatic crossing-over in *Antirrhinum majus*. *Heredity*, 38(2):169-189.
- HASTIE, A.C., 1970. Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature* (London), 226:771.
- HEAGY, F.C. e J.A. ROPER, 1952. Deoxyribonucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus* conidia. *Nature* (London), 170:713-714.
- HELINSKY, D.R., 1976. Plasmids. *Federation Proceedings*, 35(9):2024-2025.
- HESS, W.M. e D.L. STOCKS, 1969. Surface characteristics of *Aspergillus* conidia. *Mycologia*, 61:560-571.
- HOLLOMAN, D.W., 1970. Ribonucleic acid synthesis during fungal spore germination. *Journal of General Microbiology*, 62:75-87.

- HOUSE, V.L., 1955. The influence of temperature on gene expression at the "cubitus interruptus" locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 40:576.
- HOZUMI, N. e S. TONEGAWA, 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, U.S.A., 73:3628-3632.
- HSIANG, M.W. e R.D. COLE, 1973. The isolation of histone from *Neurospora crassa*. *Journal of Biology and Chemistry*, 248:2007-2013.
- HUGHES, D.T. e S. AUSTIN, 1966. Karyotype instability in the syrian hamster "in vivo" and "in vitro". *Heredity*, 21:531-532.
- ISHITANI, G., K. UCHIDA e K. IKEDA, 1956. The relation of DNA content to cell size in *Aspergillus*. *Experimental Cell Research*, 10:737-740.
- JANSEN, G.J.O., 1967. Some properties of the *uvr1* mutant of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 8:20-21.
- KÄFFER, E., 1961. The process of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46:1581-1609.
- KÄFFER, E. e T.L. CHEN, 1964. Translocations and recessive lethals induced in *Aspergillus nidulans* by ultraviolet light and gamma rays. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 6:249-254.
- KAPPAS, A. e S.G. GEORGOPOULOS, 1974. Interference of griseofulvin with the segregation of chromosome at mitosis in diploid *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 119:334-335.

- KAPPAS, A., S.G. GEORGOPOULOS e A.C. HASTIE, 1973. Genetic instability of *Aspergillus nidulans* diploids induced by benzimidazole and thiophanate fungicides. *Mutation Research*, 21:190-191.
- KILBEY, B.J., 1963. Yellow conidial mutants of *Aspergillus nidulans* strain 16643. *Aspergillus News Letter*, 4:16-17.
- KINGSMAN, A.J., D.A. SMITH e M.D. HULANICKA, 1978. Genetic instability in auxotrophs of *Salmonella typhimurium* requiring cysteine or methionine and resistant to inhibition by 1, 2, 4 - triazole. *Genetics*, 89 (3):419-437.
- KUBOYE, A.O., J.G. ANDERSON e J.E. SMITH, 1976. Control of autolysis of a spherical cell form of *Aspergillus niger*. *Transactions of the British Mycological Society*, 67:27-31.
- LACAVA, P.M., 1973. Mutantes morfológicos induzidos por Raios Gama em *Aspergillus nidulans*. Jaboticabal, Faculdade de Medicina, Veterinária e Agronomia. (Tese de Doutorado). 85p.
- LATEN, H.M., J. GORMAN, F. WEBB e R.M. BOCK, 1976. Genetic analysis of a transposable supressor genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 73(12):4623-4627.
- LEE, Y.T. e B.H. NGA, 1973. Meiotic segregation behavior of translocation haploids in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* (Supplement), 74:153-154.
- LIEBER, M.M., 1976. The effects of temperature on genetic instability in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 34:93-122.
- MAJERFELD, I.H. e J.A. ROPER, 1978a. The effect of coumarin on the frequency of deletions in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 159:203-206.

- MAJERFELD, I.H. e J.A. ROPER, 1978b. Dose effects of the $uvrA^+$ gene product in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 49:19-26.
- MARTINELLI, S.D., 1972. Some characteristics of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 29:130.
- MARTINELLI, S.D., 1976. Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged culture. *Transactions of the British Mycological Society*, 67:121-128.
- MARTINELLI, S.D. e A.J. CLUTTERBUCK, 1971. A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 69:261-268.
- MARTINELLI, S.D. e B.W. BAINBRIDGE, 1974. Phenoloxidases of *Aspergillus nidulans*. *Transactions of The British Mycological Society*, 63:361-370.
- MENEZES, E.M., 1974. Análise genética de variantes deteriorados e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP, 114p. (Tese de Mestrado).
- MENEZES, E.M., J.L. AZEVEDO, 1978. Reversion in variants from a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 164(3):255-258.
- MERCER, B. e N.R. MORRIS, 1975. The effect of chloral hydrate upon mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 88:197-199.
- McCLINTOCK, B., 1945. *Neurospora*. I. Preliminary observations of the chromosomes of *Neurospora crassa*. *American Journal of Botany*, 32:671-678.
- McCLINTOCK, B., 1951. Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 16:13-47.
- McCLINTOCK, B., 1953. Induction of instability at selected loci in maize. *Genetics* (Princeton), 38:579-599.

- McCLINTOCK, B., 1955. Intranuclear systems controlling gene action and mutation. *Brookhaven Symposia Biology*, 8:58-71.
- McCLINTOCK, B., 1965. The control of gene action in maize. In: "Genetic control of differentiation". *Brookhaven Symposia in Biology*, 18:162-184.
- McCULLY, K.S. e E. FORBES, 1965. The use of p-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research*, 6:352-359.
- MISHRA, N.C., 1977. Genetics and biochemistry of morphogenesis in *Neurospora*. *Advances in Genetics*, 19:341-405.
- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregation induced by p-fluorophenylalanine. *Aspergillus News Letter*, 2:10.
- MÜLLER, H.J., 1928. The measurement of gene mutation rate in *Drosophila*, its high variability, and its dependence upon temperature. *Genetics*, 13:280-357.
- NGA, B.H., 1968. Production and analysis of new translocations in *A. nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 9:16-17.
- NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1966. A chromosomal process giving rise to vegetative instability in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 21:530-531.
- NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1968. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 53:103-209.
- NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1969. A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research* (Cambridge), 14:63-70.

- ~~MEYERS~~, P. e H. SAEDLER, 1977. Transposable genetic elements as agents of gene instability and chromosomal rearrangements. *Nature* (London), 268:109-115.
- NEWMAYER, D., 1965. Somatic instability in *Neurospora* resulting from a pericentric inversion. *Genetics*, 52:462-463.
- NEWMAYER, D. e C.W. TAYLOR, 1967. A pericentric inversion in *Neurospora* with a unstable duplication progeny. *Genetics*, 56:771-791.
- NEWMAYER, D. e D.R. GALEAZZI, 1977. The instability of *Neurospora* duplications Dp (IL $\rightarrow$ IR) H₄₂₅₀, and its genetic control. *Genetics*, 85(3):461-488.
- NEWMAYER, D. e D.R. GALEAZZI, 1978. A meiotic UV - sensitive mutant which causes deletion of duplications in *Neurospora*. *Genetics*, 89:245-269.
- NEWMAYER, D., A.L. SCHROEDER e D.R. GALEAZZI, 1978. An apparent connection between histidine, recombination, and repair in *Neurospora*. *Genetics*, 89:271-279.
- OLIVER, P.T.P., 1972. Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 73:45-54.
- PAES DE BARROS, J., 1977. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP. 81p. (Tese de Mestrado).
- PALMER, H.M. e J.A. ROPER, 1970. Induced deletions in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 11:20.
- PARAG, Y., 1977. Genetic analysis of mutations for low (rec) and very high (pop) mitotic recombination frequency in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 155(3):319-328.

- PARAG, Y. e J.A. ROPER, 1975. Genetic control of chromosome instability in *Aspergillus nidulans* as a mean for gene amplification in eukariotic microorganisms. *Molecular General Genetics*, 140(4):275-287.
- PARK, D. e P.M. ROBINSON, 1970. Germination studies with *Geotrichum candidum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 54:83-92.
- PASTUSHOK, M. e D.E. AXEROLD, 1976. Effect of glucose, ammonium and media maintenance on the time of conidiophore initiation by surface colonies of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 94:221-224.
- PEREIRA, J.O., 1978. Ocorrência do ciclo parassexual em uma espécie do gênero *Aspergillus*. Piracicaba, ESALQ/USP. 108p. (Tese de Mestrado).
- PERKINS, D.D. e E.G. BARRY, 1977. The cytogenetics of *Neurospora*. *Advances in Genetics*, 19:133-285.
- PETERSON, P.A., 1952. Effect of temperature on the mutation rate of a mutable locus in maize. *Genetics*, 37:614.
- PETERSON, P.A., 1968. The origin of an unstable locus in maize. *Genetics*, 59:391-398.
- PETERSON, P.A., 1970a. Controlling elements and mutable loci in maize. Their relationship to bacterial episomes. *Genetica*, 41:33-56.
- PETERSON, P.A., 1970b. The *En* mutable system in maize. III. Transpositions associated with mutational events. *Theoretical and Applied Genetics*, 40:367-377.
- PETERSON, P.A., 1976. Change in state following transposition of a regulatory element of the enhancer system in maize. *Genetics*, 81:469-483.

- PIZZIRANI, A.A., 1977. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP, 111p. (Tese de Mestrado).
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, D.W. HEMMONS, K.D. MACDONALD e A.W. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.
- PONTECORVO, G., E. TARR-GLOOR e E. FORBES, 1954. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Genetics*, 52:226-237.
- PRITCHARD, R.H., 1955. The linear arrangement of a series of alleles of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 9:343-371.
- RAPER, K.B. e D.I. FENNEL, 1953. Heterokaryosis in *Aspergillus*. *Journal of Elisha Mitchell Scientific Society*, 69:1-29.
- RAPER, K.B. e D.I. FENNEL, 1973. The genus *Aspergillus*. Huntington, New York. R.E. Krieger Publishing Company. 686p.
- REANNEY, D., 1976. Extrachromosomal elements as possible agents of adaptation and development. *Bacteriological Review*, 40(3):552-590.
- RETHORÉ, M.O., B. DUTRILLAUX, J.C. JOB e J. LEJEUNE, 1974. Trisomie 4p par aneusomie de recombinaison d'une inv (4) (p14 q35). Apud Perkins, D.D. e E. Barry, 1977. The cytogenetics of *Neurospora*. *Advances in Genetics*, 19:133-285.
- RHOADES, M., 1941. The genetic control of mutability in maize. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 9:138-144.
- RICHMOND, D.V., 1975. Effects of toxicants on the morphology and fine structure of fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 19:289-319.

- ROBINOW, C.F. e C.E. CATEN, 1969. Mitosis in *A. nidulans*. *Journal of Cell Science*, 5:403-431.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozigous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8:14-15.
- ROPER, J.A., 1958. Nucleo-cytoplasmic interactions in *Aspergillus nidulans*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 23:141-154.
- ROPER, J.A., 1966. The parasexual cycle. In: Ainsworth, G.C. e Sussman, A.S., ed. *The fungi*, II. New York, Academic Press, p.589-617.
- ROPER, J.A., 1971. *Aspergillus*. In: Hollander, A. (ed.). *Chemical mutagens*. New York, Plenum Press, p.343-363.
- ROPER, J.A. e B.H. NGA, 1969. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the production of hypodiploid and hypohaploid nuclei. *Genetical Research* (Cambridge), 14:127-136.
- ROPER, J.A., H.M. PALMER e W.A. WATMOUGH, 1972. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the effects of coffeine. *Molecular General Genetics*, 118:125-133.
- ROSATO, Y.B., 1973. Efeitos do etil-metano-sulfonato e acriflavina na instabilidade mitótica em *A. nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 74p. (Tese de Mestrado).
- ROSATO, Y.B., 1977. Análise genética e respirometria em mutantes compactos de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP. 152p. (Tese de Doutorado).
- ROSENBERG, R.F. e M. KESSEL, 1967. Synchrony of nuclear replication in individual hyphae of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 94:1464-1469.
- RIYASATY, S., 1966. Instability and selective mutations in the aromatic genes of *Salmonella typhimurium*. *Heredity*, 21:528.

- RUSSELL, N.J., D. KERRIDGE e E.F. GALE, 1975. Polyene sensitivity during germination of conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of General Microbiology*, 87:351-358.
- RUSSELL, N.J., D. KERRIDGE e J.T. BOKOR, 1977. Sterol metabolism during germination of conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of General Microbiology*, 101:197-206.
- SAND, S.A., 1957. Phenotypic variability and the influence of temperature on somatic instability in cultures derived from hybrids between *Nicotiana langsdorffii* and *N. sanderae*. *Genetics*, 42:685-703.
- SASTRY, G.R.K., 1976. Evocation of instability at the *pal* locus in *Antirrhinum majus*. *Heredity*, 36(3):315-329.
- SAXENA, R.K. e U. SINHA, 1973. Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged liquid culture. *Journal of General and Applied Microbiology*, 19:141-146.
- SAXENA, R.K. e U. SINHA, 1977. Sexual differentiation under submerged condition in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 102(1):195-198.
- SCOTT, B.R., T. ALDERSON e D.G. PAPWORTH, 1972. The effect of radiation on the *Aspergillus* conidium. I. Radiation sensitivity and a germination inhibitor. *Radiation Botany*, 12:45-50.
- SINGH, M. e U. SINHA, 1976. Chloral hydrate induced haploidization in *Aspergillus nidulans*. *Experientia*, 32(9):1144-1145.
- SNEDECOR, G.W. e W.G. COCHRAN, 1972. Statistical methods, 6a. ed., Ames, The Iowa State University Press. 593p.
- SMITH, J.E., 1977. Asexual sporulation in filamentous fungi. In: Smith, J.E. e D.R. Berry (ed.). *The Filamentous Fungi*. Vol. III. London, Edward Arnold.

- SMITH, J.E., K. GULL, J.G. ANDERSON e S.G. DEANS, 1976.
Organelle changes during fungal spore germination. In: Weber, D.J. e W.M. Hess (ed.). *The fungal Spore: Form and Function*. New York, John Wiley & Sons. p.301-354.
- SMITH, J.E., J.G. ANDERSON, S.G. DEANS e B. DAVIS, 1977.
Asexual development in *Aspergillus*. In: Smith, J.E. e J.A. PATEMAN (ed.). *Genetics and Physiology of Aspergillus*. London, Academic Press. p.23-58.
- STARLINGER, P., 1977. DNA rearrangements in procaryotes. *Annual Review of Genetics*, 11:103-126.
- STEEL, R.G.D. e J.H. TORRIE, 1960. Principles and Procedures of Statistics. New York, McGraw-Hill Book Company, Inc. 481p.
- STERN, C., 1936. Somatic crossing over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 21:625-730.
- TECTOR, M.A. e E. KÄFFER, 1962. Radiation induced chromosomal aberrations and lethals in *Aspergillus nidulans*. *Science*, 136:1056-1057.
- TERENZI, H.F., M.M. FLAWIA, M.T. TELLEZ-INÓN e H.N. TORRES, 1976. Control of *Neurospora crassa* morphology by cyclic adenosine 3', 5' - monophosphate and dibutyryl cyclic adenosine 3', 5' - monophosphate. *Journal of Bacteriology*, 126:91-99.
- TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, N.W., 1935. Über die wirkung der temperatur auf deu mutationsprozen bei *Drosophila melanogaster*. I. Versuche innerhabb normales tempersturgrenzen. Z. *Vererbungslehre*, 70:125.
- TREFFERS, H.P., V. SPINELLI e N.O. BELSER, 1954. A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, 40:1064-1071.

- TRINCI, A.P.J., 1969. A kinotic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *Journal of General Microbiology*, 57:11-24.
- TRINCI, A.P.J., 1971. Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. *Journal of General Microbiology*, 67:325-344.
- TRINCI, A.P.J. e C. WHITTAKER, 1968. Self-inhibition of spore germination in *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, 51:594-596.
- TURNER, B.C., 1975. Duplications in *Neurospora* produced meiotically by a translocation T(I → VI) NM103, and their breakdown to produce euploid derivatives. *Genetics*, 80: 81.
- TURNER, B.C., 1977. Euploid derivatives of duplications from a translocation in *Neurospora*. *Genetics*, 85:439-460.
- TURIAN, G., 1966. Morphogenesis in Ascomycetes. In: Ainsworth, G.C. e A.S. Sussman (ed.). *The Fungi*. II. New York, Academic Press. 805p.
- VAN DE VATE, C. e G.J.O. JANSEN, 1978. Meiotic recombination in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 31(1):29-52.
- VUJIČIĆ, R. e M. MUNTANJOLA-CUETROVIĆ, 1973. A comparative ultrastructural study of conidium differentiation in the *Cladosarum* - like mutant 22B of *Aspergillus aureolatus*. *Journal of General Microbiology*, 79:45-51.
- YANAGITA, T. e F. KOGANÉ, 1962. Growth and cytochemical differentiation of mold colonies. *Journal of General and Applied Microbiology*, 8:201-213.
- YUILL, E. e J.L. YUILL, 1938. *Cladosarum olivaceum*, a new Hyphomycete. *British Mycological Society Transactions*, 22:194-200.

- YUILL, E., 1950. The numbers of nuclei in conidia of *Aspergillus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 53:324-331.
- WEISER, J. e S.H. WEISBERG, 1966. Karyokinesis of the somatic nucleus of *Aspergillus nidulans*. I. The juvenile chromosome cycle (Feulgen staining). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 3:361-373.
- WILLIAMS, E. e A. BRINK, 1972. The effect of abnormal chromosome 10 on transposition of modulator from R locus in maize. *Genetics*, 71:97-110.
- WOOD, S. e E. KÄFFER, 1967. Twin spots as evidence for mitotic crossing over in *Aspergillus nidulans*. *Nature* (London), 216:63-64.
- ZONNEVELD, B.M.S., 1974. α -1,3 glucan synthesis correlated with α -1,3 glucanase synthesis, conidiation and fructification in morphogenetic mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 81:445-451.
- ZONNEVELD, B.J.M., 1977. Biochemistry and ultrastructure of sexual development in *Aspergillus*. In: Smith, J.E. e J.A. Pateman (ed.). *Genetics and Physiology of Aspergillus*. London, Academic Press. 552p.
- ZUCCHI, T.M.A., 1975. Instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Ribeirão Preto, SP., Faculdade de Medicina. 96p. (Tese de Doutorado).

--ooo000||000ooo--