OCORRÊNCIA DO CICLO PARASSEXUAL EM UMA ESPÉCIE DO GÊNERO *Aspergillus*

JOSÉ ODAIR PEREIRA

Universidade do Amazonas

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 Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1978

Ao

amigo

professor

e orientador

João Lúcio de Azevedo

MINHA HOMENAGEM

A

meus pais

meus irmãos

minha esposa *Rosa Maria*

e nossa filha *Graziela*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Expressamos nossos agradecimentos:

- Ao Professor *João Lúcio de Azevedo*, pela orientação segura e estímulos constantes.
- Ao Prof. *Dr. Ernesto Paterniani* pelo apoio no início da nossa atividade profissional.
- Ao Prof. *Isaias Olívio Geraldi* pela orientação na execução das análises estatísticas.
- Ao Prof. *Cláudio Luis Messias* pelo auxílio nas fotomicroscopias.
- Ao Prof. *Alcides Martinelli Filho* pela disponibilidade e auxílios prestados.
- À minha esposa *Rosa Maria* pela compreensão, estímulo, e correção do manuscrito.
- À colega e amiga *Aline A.P. Kleiner*, pela nossa iniciação nessa pesquisa, sugestões, e correção do manuscrito.
- Aos professores que participaram da nossa formação científica.
- Aos colegas do curso de Pós-Graduação, de modo especial àqueles de convivência diária pelas contribuições e sugestões dadas.
- Aos funcionários do Instituto de Genética pelos serviços prestados.
- À *CAPES* pela concessão de bolsa de estudos inicial, à *Universidade do Amazonas* pelos auxílios e ao *CNPQ* (PIG-SIP 04/52), pelos auxílios ao Laboratório.

I N D I C E

	<u>Página</u>
RESUMO	1
1. INTRODUÇÃO.	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Descoberta e etapas.	5
2.2. Comparação entre os ciclos sexual e parassexual	12
2.3. Ocorrência	14
2.4. Importância.	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Linhagem utilizada	21
3.2. Meios de cultura e soluções usadas	21
3.2.1. Meio mínimo	21
3.2.2. Meio completo	22
3.2.3. Solução de vitaminas.	23
3.2.4. Solução de ácido nucléico de leveduras...	23
3.2.5. Meio mínimo líquido mais 2% de meio com	
pleto	24
3.2.6. Suplementos adicionados ao meio mínimo..	24
3.2.7. Solução de tween 80	26
3.2.8. Solução salina.	26
3.2.9. Solução de albumina	26
3.2.10. Solução fosfato pH 6,9.	26
3.2.11. Solução Helly	27
3.2.12. Solução de formol neutro.	27
3.2.13. Solução estoque de Giemsa	28
3.2.14. Solução de p-fluorfenilalanina (pFA). .	28
3.2.15. Placas de análise	28
3.2.16. Microscopia e material fotográfico. . .	29

	<u>Página</u>
3.3. Esterilização e incubação	29
3.4. Obtenção da curva de sobrevivência com luz ultra-violeta	29
3.5. Isolamento de mutantes auxotróficos e morfológicos	30
3.6. Caracterização dos mutantes auxotróficos . . .	31
3.7. Ensaio de reversão	32
3.8. Ensaio de alelismo	33
3.9. Técnicas de análise genética - ciclo parassexual	33
3.9.1. Obtenção de heterocários.	33
3.9.2. Obtenção de diplóides	34
3.9.3. Haploidização e permuta mitótica. . . .	34
3.9.3.1. Haploidização com luz ultra-violeta	35
3.9.3.2. A técnica do <i>p</i> -fluorfenilalanina (<i>p</i> FA)	36
3.10. Caracterização de haplóides e diplóides através do número de núcleos presentes nos confídios	37
3.11. Análise estatística.	38
4. RESULTADOS.	39
4.1. Descrição sumária da linhagem em meio completo	39
4.2. Sobrevivência à luz ultra-violeta.	41

	<u>Página</u>
4.3. Obtenção dos mutantes	43
4.4. Ensaio de reversão	44
4.5. Ensaio de alelismo e nomenclatura dos mutantes . . .	46
4.6. Análise genética	51
4.6.1. Obtenção de heterocáries	51
4.6.2. Obtenção dos diplóides	55
4.6.3. Haploidização e permuta mitótica	56
4.6.3.1. Haploidização induzida por luz ultra-violeta	56
4.6.3.2. Haploidização selecionada com pFA	58
4.6.3.3. Haploidização espontânea	59
4.6.4. Permuta mitótica	63
4.7. Medidas dos diâmetros dos confídios e número de núcleos em linhagens haplóides e diplóides . .	64
5. DISCUSSÃO	70
5.1. Sobrevivência à luz ultra-violeta	70
5.2. Mutantes e sua estabilidade	72
5.3. Ensaio de alelismo	76
5.4. Obtenção de heterocáries	79
5.5. Obtenção de diplóides	85
5.6. Segregantes e recombinantes	89
6. CONCLUSÕES	92
SUMMARY	94
7. LITERATURA CITADA	96

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
01 - Média do número de confídios sobreviventes e porcentagem relativa da média de confídios sobreviventes à luz ultra-violeta	41
02 - Mutantes auxotróficos obtidos por irradiação de confídios da linhagem selvagem com luz ultra-violeta	43
03 - Duplos mutantes obtidos após irradiação de alguns mutantes simples com luz ultra-violeta. . .	44
04 - Frequência de reversão espontânea para as mutações auxotróficas simples em 10^6 confídios/ml. .	45
05 - Frequência de reversão espontânea para a segunda mutação auxotrófica em 10^7 confídios/ml . . .	46
06 - Ensaios de alelismo para os mutantes portadores da mesma deficiência nutricional	47
07 - Nomenclatura de todos os mutantes obtidos neste trabalho com base nos ensaios de alelismo . . .	50
08 - Cruzamento de todos os duplos mutantes entre si . . .	52
09 - Desenvolvimento de algumas películas transplantadas para placas com meio mínimo	53
10 - Análise de requisitos nutricionais das colônias claras e escuras obtidas dos confídios coletados dos heterocários	54

TabelaPágina

11 - Isolamento de diplóides a partir de conídios (10^6 /ml) coletados dos heterocários	55
12 - Isolamento de diplóides a partir das colônias <u>claras</u> e <u>escuras</u> (Tabela 11) isoladas dos heterocários	56
13 - Haploidização induzida com luz ultra-violeta. .	57
14 - Haploidização selecionada com pFA	58
15 - Haploidização espontânea	59
16 - Ocorrência de permuta mitótica por exposição de diplóides à luz ultra-violeta	63
17 - Haploidização dos diplóides auxotróficos com auxílio de pFA	65
18 - Médias (28 repetições) dos diâmetros de conídios de linhagens diplóides e seus respectivos <u>segregantes</u> e <u>recombinantes</u> haplóides	66
19 - Análise da variância dos diâmetros dos conídios..	66
20 - Comparação entre as médias dos diplóides e respectivos haplóides através do teste t	67
21 - Porcentagem de conídios de <i>Aspergillus</i> sp 321 com diferentes números de núcleos	68

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
01 - Linhagem de <i>Aspergillus</i> sp 321 em meio completo	40
02 - Curva de sobrevivência de <i>Aspergillus</i> sp 321 à luz ultra-violeta	42
03 - Heterocário típico em meio mínimo resultante do cruzamento entre <i>met B1 lis A3/ met A2 pir A1</i> ..	53
04 - Isolados parentais (claros e escuros) obtidos dos heterocários	54
05 - Haploidização e permuta mitótica induzidos com luz ultra-violeta	60
06 - Haploidização pela técnica da pFA a uma concentração de 50 µg/ml após 10 dias de incubação . .	61
07 - Haploidização espontânea	62
08 - Linhagem haplóide típica de <i>Aspergillus</i> sp 321 apresentando confídios binucleados	69
09 - Linhagem diplóide típica de <i>Aspergillus</i> sp 321 apresentando confídios uninucleados	69

"CURRICULUM VITAE"

JOSÉ ODAIR PEREIRA, nascido em São Simão, Estado de São Paulo, aos 02 de novembro de 1951.

Licenciado em Ciências Biológicas pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo em 1975.

Iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoria-mento de Plantas, na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, em 1976.

Foi Bolsista da CAPES no período de março de 1976 a julho de 1978.

Faz parte do Plano de Formação de Recursos Humanos da Fundação Universidade do Amazonas desde maio de 1977, onde exercerá atividades de Ensino e Pesquisa.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de todas as etapas do ciclo parassexual em mais uma espécie do gênero *Aspergillus*.

Mutantes duplos auxotróficos isolados por tratamento com luz ultra-violeta foram utilizados para constituição de heterocários balanceados. Nesses heterocários houve fusão de núcleos produzindo diplóides heterozigotos. Durante a haploidização espontânea, com auxílio de ultra-violeta ou p-fluorfenilalanina observaram-se segregantes parentais e recombinantes. Também foi possível detectar ocorrência de permuta mitótica após tratamento das linhagens diplóides com luz ultra-violeta.

As linhagens diplóides foram identificadas por apresentarem metade do número de núcleos encontrados nas linhagens haplóides.

.2.

Uma tentativa de localização dos marcadores genéticos utilizados revelou que duas marcas (*ade B1* e *met A2*) possivelmente estão ligadas, sendo que *met A2* é distal em relação à outra marca. Todos os outros marcadores analisados estão em diferentes grupos de ligação. Concluiu-se portanto que a espécie estudada apresenta no mínimo cinco grupos de ligação.

1. INTRODUÇÃO

Nos fungos além do processo sexual que ocorre em muitas espécies, existe ainda uma alternativa do sexo que é denominada de ciclo parassexual. Esse ciclo foi descoberto em *Aspergillus nidulans* e se caracteriza basicamente pela formação de diplóides seguindo-se permutas mitóticas ou haploidização o que dá origem então aos recombinantes mitóticos (AZEVEDO, 1972).

A descoberta dessa alternativa do sexo por *PONTECORVO* e *ROPER* em 1952 em *A. nidulans* suscitou duas questões. Primeiro quais os mecanismos que regem a série de eventos denominada de ciclo parassexual. Segundo, qual a extensão desse ciclo entre os fungos filamentosos, e qual a importância desse sistema genético particularmente nos casos onde não se conhece a ocorrência do mecanismo sexual. Essas questões começaram a ser respondidas logo após a descoberta do ciclo. Trabalhos com *A. nidulans* levaram ao conhecimento detalhado de

cada passo do processo e muitas contribuições foram dadas neste campo de pesquisa; entre outras podemos citar: o nascimento de uma hipótese sobre a regulação gênica em eucariotos (PONTECORVO, 1963), o conhecimento sobre o significado da instabilidade genética nuclear (BALL e AZEVEDO, 1976) ou ainda o mapeamento gênico em eucariotos através da permuta mitótica (CLUTTERBUCK, 1974).

Por outro lado, na tentativa de generalizar o processo, procurou-se verificar se o fenômeno ocorria também em outros fungos além do *A. nidulans*. Foi constatado que em outras espécies (*A. niger*, *A. sojae*, *A. flavus* e outras) e outros gêneros (*Penicillium*, *Fusarium*, *Ustilago* e outros) o fenômeno também ocorria. Consequentemente surgiu a possibilidade de se estudar a genética de fungos desprovidos do ciclo sexual, inclusive visando o melhoramento daquelas espécies com potencial econômico para a indústria ou agricultura.

O presente trabalho teve por objetivo verificar a ocorrência do ciclo parassexual em mais uma espécie do gênero *Aspergillus*, na tentativa de se generalizar ainda mais o processo com todas as suas etapas: fusão de núcleos em heterocários, permuta mitótica e haploidização. As particularidades encontradas foram discutidas e comparadas com *A. nidulans* e outros fungos onde o ciclo já foi descrito.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Descoberta e etapas do ciclo parassexual

O trabalho clássico de *BEADLE e TATUM (1941)* com *Neurospora crassa* é considerado o marco de uma nova era para a Genética. A partir desse evento a Genética de Microorganismos começou a ser estudada efetivamente pois tentativas anteriores de introdução de microrganismos em estudos genéticos foram apenas esporádicas. O uso desses organismos foi de grande impacto devido a uma série de vantagens que apresentam como: ciclo vital rápido, cultivo de um grande número de indivíduos em um pequeno espaço, facilidade de obtenção de mutantes uma vez que a maioria dos microrganismos é haplóide, capacidade de desenvolvimento em meio de composição definida e outras. Como consequência, inúmeros conceitos genéticos foram alterados e novos conceitos surgiram.

A Genética atêm-se à variabilidade encontrada nos seres vivos, variabilidade esta, produzida por mutação e recombinação. Através da mutação consegue-se variabilidade

nova, e através da recombinação o material genético se reorganiza em novas combinações. Até praticamente um quarto de século, o ciclo sexual era a única maneira conhecida pela qual poderia ocorrer recombinação genética. No entanto, foi verificado que outros mecanismos além do sexual ocorrerem em microrganismos. Os processos de transformação (AVERY e col., 1944) e transdução, (ZINDER e LEDERBERG, 1952) são exemplos típicos de alternativas do sexo para produção de recombinantes em bactérias. Também em fungos, além do processo sexual que ocorre em muitas espécies, existe uma alternativa do sexo descrita pela primeira vez em 1952 por PONTECORVO e ROPER no fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* ao qual PONTECORVO denominou de "processo parassexual" por se diferenciar em alguns pontos do processo sexual típico.

Esta revisão abordará o processo parassexual em fungos desde a sua descoberta, enfocando-se etapas do processo, ocorrência em muitos gêneros, semelhanças e diferenças com relação ao processo sexual e importância desse mecanismo de recombinação para o fungo em si e para a pesquisa genética.

A descoberta do ciclo parassexual em *A. nidulans* foi possível graças ao trabalho de ROPER (1952) utilizando mutantes para coloração de conídios e deficientes nutricionais. Uma linhagem haplóide requerendo adenina e apresentando conídios brancos e outra linhagem haplóide requerendo ácido p-aminobenzóico, biotina e apresentando conídios amarelos

foram colocadas para germinar de tal modo que ocorresse anastomose de hifas e conseqüentemente formação do heterocário. A partir desse heterocário foram coletados conídios e semeados em meio de composição definida ou seja meio mínimo desprovido de adenina, biotina e ácido *p*-aminobenzóico. Este meio não permitia a germinação de conídios de constituição genética igual aos parentais envolvidos no heterocário, dessa forma não era esperado o crescimento de colônias nesse meio. No entanto quando um grande número de conídios provenientes deste heterocário (10^6 - 10^8 conídios) foi semeado em meio mínimo, algumas colônias puderam se desenvolver. Estas colônias eram verdes (cor da linhagem selvagem deste fungo) e não apresentavam as deficiências nutricionais das linhagens parentais (adenina, biotina e ácido *p*-aminobenzóico). Tais colônias diplóides originaram-se da fusão de núcleos haplóides no heterocário. Estes núcleos multiplicaram-se por divisões mitóticas sendo eventualmente incluídos nos conídios.

O ciclo parassexual em fungos pode ser demonstrado seguindo-se as seguintes etapas: (a) produção de linhagens com marcadores nutricionais (preferencialmente duplos auxotróficos) a partir do isolado selvagem; (b) associação dos mutantes auxotróficos, quando possível, com marcadores para coloração; (c) formação de heterocários balanceados entre os mutantes auxotróficos; (d) detecção, isolamento e purificação de heterozigotos diploides e, finalmente (e) recuperação de segregantes e recombinantes haplóides e diploides para clas

sificação de acordo com suas colorações e requerimentos nutri
cionais.

Muitas referências são encontradas na literatura
sobre o isolamento de mutantes auxotróficos e morfológicos,
conforme se pode ver pelas revisões de *ESSER e KUENEN (1967)*,
FINCHAM e DAY (1971) e *BURNETT (1975)*. Os métodos de isola-
mento de mutantes são os mais diversos possíveis, dependendo
do mutante que se quer isolar ou das características das li-
nhagens empregadas.

De posse dos mutantes, inicia-se a formação de
heterocários entre mutantes complementares para requisitos nu
tricionais (*ROPER, 1952*). Nesse caso a heterocariose se dá
em virtude de anastomose entre as células vegetativas de li-
nhagens geneticamente diferentes. No entanto a heterocariose
tem um sentido mais amplo pois vem a ser a coexistência de
núcleos geneticamente diferentes em um citoplasma comum, e is
to também pode ocorrer por mutação dentro de um clone (*ISHITANI*
e SAKAGUCHI, 1956, *TINLINE, 1961*). Revisões de *CATEN e JINKS,*
1966; *TINLINE e McNEILL, 1969*; *DAVIS, 1966* abordam amplamente
o significado e a origem dos heterocários em fungos.

O próximo passo do processo parassexual ini-
cia-se com a fusão de núcleos em um heterocário dando diplói-
des heterozigotos (*ROPER, 1952*). A proporção de esporos di-
plóides em relação ao número total de esporos vegetativos ha-
plóides pode dar uma idéia da frequência com que ocorre fusão

nuclear em um micélio heterocariótico. Os valores dessas frequências situam-se ao redor de um confídio diplóide por cerca de 10^6 a 10^7 confídios haplóides em *A. nidulans*. Os diplóides heterozigotos resultantes são razoavelmente estáveis na mitose. Colônias com núcleos diplóides são reconhecidos pelo seu fenótipo tipo selvagem (exceto para aqueles casos raros onde esses diplóides carregam um alelo dominante ou semi-dominante), pelo tamanho dos confídios (aproximadamente 3μ para haplóides e 4μ para diplóides no caso de *A. nidulans*) e produção vegetativa de segregantes haplóides mostrando os alelos mutantes parentais. A respeito desses critérios usados para o reconhecimento de diplóides convém lembrar que existem muitas variáveis. Primeiramente a frequência de aparecimento de um diplóide pode ser maior, como ocorre com certos Basidiomicetos; os Basidiomicetos são geralmente dicarióticos e a oportunidade para formação de diplóides é aumentada em relação a outros tipos de heterocários (TINLINE e McNEILL, 1969). O número de diplóides também pode ser alterado por agentes físicos como a ultra-violeta (DAY e JONES, 1969; IKEDA e col., 1957) e químicos como cânfora (PONTECORVO e col., 1953). Quanto ao tamanho como critério de separação entre confídios haplóides e diplóides também não existe uma regra geral. Os diplóides podem ser maiores como no caso de *A. nidulans* porém em *A. oryzae*, *A. sojae* (IKEDA e col., 1957), *Ustilago maydis* (HOLLIDAY, 1961), *Cochliobolus sativus* (TINLINE, 1962) e *A. flavus* (PAPA, 1973), não existe diferença entre haplóides e diplóides.

O passo seguinte no processo parassexual é a produção de recombinantes. O mecanismo de recombinação envolve permuta mitótica e haploidização.

Permuta mitótica foi descoberta por STERN (1936) em *Drosophila* e atualmente é um processo bem conhecido devido a muitos estudos a respeito (KAFFER, 1958, 1961, PONTECORVO e KAFFER, 1958; ROPER, 1966) em *Aspergillus nidulans*.

Este raro evento ocorre por permutas recíprocas no estágio de 4 fios da mitose. Usualmente há uma simples permuta em relação a todo o genoma. Subsequentemente os cromossomos apresentam um comportamento mitótico, isto é, os centrômeros se dividem e as cromátides de cada homólogo vão para polos opostos. Dependendo da segregação das cromátides, os núcleos filhos serão homozigotos para certos marcadores para os quais eram previamente heterozigotos. Especificando ainda mais, os núcleos serão homozigotos para todos os alelos ligados e distais em relação ao ponto de permuta. Marcadores proximais ao ponto de permuta e marcadores em outros braços cromossômicos, permanecerão heterozigotos.

Através da análise dos recombinantes mitóticos, é possível se conhecer a ordem dos genes e posição do centrômero em um braço cromossômico individual. Em *A. nidulans* o resultado de tais análises sempre tem estado em absoluta concordância com resultados provenientes de análises mitóticas.

Contudo, segundo *ROPER (1966)*, as análises através da permuta mitótica apresentam limitações: por exemplo, quando são analisados os braços cromossômicos não se tem idéia sobre a associação dos genes em relação a todos os grupos de ligação. Esta associação pode ser mostrada através da haploidização conforme veremos no próximo ítem desta revisão. Outra limitação é a necessidade de alelos recessivos ou semi-dominantes, localizados distalmente, para fornecer meios para seleção das classes resultantes da permuta mitótica. Finalmente, outra limitação é que essas análises não proporcionam uma medida imediata da frequência de recombinação como no caso das análises meióticas.

Apesar das dificuldades de se estimar a frequência absoluta com que ocorre permuta mitótica (*ROPER, 1966*), foi sugerido por *PONTECORVO e KAFER (1958)* e *KAFER (1961)*, que ocorre uma permuta para cada 50 divisões mitóticas.

Entre os segregantes obtidos de um diplóide, existem três classes que não surgem por permuta mitótica. Essas classes são haplóides, diplóides por não disjunção e aneuplóides (*ROPER, 1966*).

PONTECORVO e KAFER (1958), encontraram colônias de *A. nidulans* instáveis quando semearam confídios de diplóides heterozigotos em meio mínimo. Através da análise desses tipos instáveis, *KAFER (1961)* encontrou várias classes de aneuplóides. Hiperdiplóides, principalmente do tipo $2n + 1$ e

mais raramente $2n + 2$, $2n + 3$ ou $2n + 4$. Hiperhaplóides, principalmente $n + 1$ e novamente foram mais raros os tipos $n+2$, $n+3$ ou $n + 4$. Os hiperdiplóides apareceram numa frequência de um em 150 colônias analisadas; os hiperhaplóides aparecem numa frequência de um em 1000 colônias. Todos os aneuplóides tinham em comum uma taxa reduzida de crescimento e produziam setores normais. Esses setores diferiam do genótipo da parte central aneuplóide da colônia.

Os resultados de *KAFER* sugerem que um mecanismo básico pode explicar a origem dos diplóides por não disjunção e muitos haplóides, ou seja, os hiperdiplóides reverterem para o estado diplóide e em um terço dos casos dão um diplóide homozigoto por não disjunção; os hiperhaplóides são instáveis e podem através de sucessivas não disjunções ir perdendo outros cromossomos até atingir o estágio haplóide estável. No caso de *A. nidulans* este estado corresponde a $2n - 8$ = oito cromossomos.

Com base nessas análises *KAFER* estimou que ocorre uma não disjunção para cada 50 mitoses.

2.2. Comparação entre os ciclos sexual e parassexual

A primeira vista o ciclo parassexual pode parecer mais laborioso que o ciclo sexual, devido à baixa frequência de aparecimento de recombinantes mitóticos. Contudo as análises mitóticas tornaram-se relativamente simples devido às

várias técnicas desenvolvidas em estudos com o fungo filamentoso *A. nidulans*. Por exemplo a localização de um determinado marcador em um grupo de ligação é feita com sucesso desde que *FORBES (1959)* preparou linhagens testadoras carregando marcadores em todos os cromossomos. A localização do centrômero torna-se muito mais fácil através da análise dos produtos da permuta mitótica do que pela análise de ascos na meiose. Enfim uma comparação entre os ciclos parassexual e sexual pode ser feita em fungos que possuem ambos os mecanismos de recombinação como é o caso do *A. nidulans*. Algumas diferenças básicas entre os dois ciclos (*AZEVEDO, 1972*) podem ser citadas tais como: (1) enquanto a fusão nuclear no ciclo sexual ocorre em estruturas especializadas resultando zigotos híbridos ou não, no ciclo parassexual a fusão nuclear é rara, ocorre em células vegetativas e resulta em diplóides relativamente estáveis; (2) embora em ambos os ciclos ocorra recombinação no estágio de quatro fios, no processo sexual são envolvidos todos os cromossomos e posteriormente há volta ao estágio haplóide, enquanto no processo parassexual há geralmente uma só permuta por célula e a haploidização é devido à não disjunções através de aneuploidia; (3) os recombinantes oriundos do ciclo sexual (ascósporos) são facilmente reconhecidos e isolados, enquanto que no ciclo parassexual são necessários marcadores apropriados para isolá-los das células vegetativas.

2.3. Ocorrência

Desde a descoberta do ciclo parassexual em *A. nidulans*, muitas outras espécies, em diversos gêneros, tem sido estudadas para verificação da ocorrência do fenômeno.

Além de *Neurospora* (ROPER, 1966) e *Colletotrichum lagenarium* (DUTTA e GARBER, 1960), não se conhecem outros casos onde o ciclo parassexual não foi encontrado, apesar de que foram feitas tentativas para descrevê-lo. Em uma recente revisão, AZEVEDO (1976) relatou a ocorrência do ciclo em 36 espécies, oito das quais pertencentes ao gênero *Aspergillus* e o restante em diversos gêneros. Após a referida revisão o ciclo já foi descrito em *Humicola* (BERTOLDI e CATEN, 1975), *Metarrhizium anisopliae* (MESSIAS, com. pessoal) e em *Beauveria bassiana* (YURCHENKO e col., 1974). Neste último caso, os diplóides estavam sendo identificados.

As oito espécies do gênero *Aspergillus* que já tiveram o ciclo parassexual descrito são: *A. amstelodani*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. rugulosus* e *A. sojae* (AZEVEDO, 1976).

2.4. Importância

Para a Biologia, o ciclo parassexual em fungos se constitui em um poderoso sistema de análise genética. Uti-

lizando-se deste recurso torna-se possível o mapeamento de genes e centrômeros, análises detalhadas da permuta mitótica e do mecanismo da haploidização. Destaca-se ainda a possibilidade de estudos genéticos em fungos desprovidos do mecanismo sexual de recombinação.

Em *A. nidulans* as análises genéticas através do ciclo parassexual se encontram em um estado bem avançado. Um mutante qualquer isolado, pode ser prontamente localizado em um grupo de ligação. A linhagem contendo o alelo mutante que se quer localizar, é cruzada com uma linhagem mestra contendo marcadores em todos os seus oito grupos de ligação. São obtidos os diplóides e durante a haploidização o alelo mutante pode ser encontrado ligado a um dos oito marcadores da linhagem mestra (McCULLY e FORBES, 1965). Após a localização do grupo de ligação normalmente é feita análise meiótica através da segregação dos cleistotécios. Através de permuta mitótica também é possível se fazer o mapeamento (PONTECORVO e col., 1954; PONTECORVO e KAUFER, 1958).

Em vários fungos além do *A. nidulans* identificaram-se grupos de ligação através de análises mitóticas. Como exemplo desses casos podemos citar: *A. niger* (LHOAS, 1967), *Penicillium chrysogenum* (BALL, 1971), *P. expansum* (GARBER e BERAHA, 1965), *Humicola* (BERTOLDI e CATEN, 1975), *A. flavus* (PAPA, 1976), *Verticillium albo atrum* (HASTIE, 1964), *Dictyostelium discoideum* (WRIGHT e col., 1977).

Em *A. flavus* (PAPA, 1976), sete grupos de ligação foram identificados por meio do ciclo parassexual. Foram localizados nesses grupos de ligação 20 marcadores genéticos contendo seis, quatro, quatro, dois, dois, um e um marcadores respectivamente.

Em *Humicola* (BERTOLDI e CATEN, 1975), foram demonstrados dois passos do ciclo parassexual: obtenção de diplóides e haploidização. Resta agora verificar se também ocorre permuta mitótica. Pelas análises mitóticas nesse fungo identificaram-se quatro grupos de ligação. Segundo o autor essas análises serão importantes na taxinomia do gênero *Humicola*.

Em *A. fumigatus* (STROMNAES e GARBER, 1963) 23 entre 26 marcadores genéticos não puderam ser localizados em grupos de ligação. Os motivos dessa ausência de ligação foram brevemente discutidos pelo autor que também alertou sobre a cautela que se deve ter em estudos a respeito de grupos de ligação quando poucos dados são disponíveis.

Em *A. niger* (LHOAS, 1967) as investigações sobre segregação e recombinação mitótica resultaram nas seguintes informações: 31 marcadores não alelos foram localizados em seis grupos de ligação, contendo cada um onze, nove, seis, três, um e um marcadores, respectivamente; em um determinado grupo de ligação foram determinadas as sequências e distâncias entre alguns marcadores através da análise de recombinantes haplóides para marcas ligadas.

O ciclo parassexual em fungos em contraste com os demais processos alternativos à recombinação sexual em bactérias, se caracteriza por apresentar um "zigoto" relativamente estável. O uso desses "zigotos" (diplóides) permite um estudo da dominância e recessividade de genes em um mesmo núcleo e em um citoplasma comum. Em determinadas situações os diplóides e seus segregantes apresentam especiais vantagens. Por exemplo, o estudo da eficiência da complementação interalélica quando comparado em heterocários e diplóides (ROBERTS, 1963); o estudo das interações citoplasmáticas (ROPER, 1958) ou ainda como lembrou PONTECORVO (1962) sobre a possibilidade de se fazer análises mitóticas em culturas de tecidos de organismos superiores (veja HARRIS, 1970). Maiores detalhes a respeito das implicações do ciclo parassexual para a genética podem ser encontrados nas revisões de ROPER (1966) e AZEVEDO (1972).

Um outro campo de pesquisas que ganhou grande impulso com a descoberta do ciclo parassexual foi o estudo da instabilidade. O estudo do processo de instabilidade nos seres vivos tem se revelado difícil sobre dois aspectos; primeiramente devido à própria complexidade do assunto, e em segundo lugar pelas dificuldades apresentadas na escolha do material para este fim. Destacam-se neste campo trabalhos de McCLINTOCK (1951 e 1956) em milho, de BURNS e GERSTEL (1967) em *Nicotiana*. Em fungos também ocorre instabilidade mitótica e graças ao ciclo parassexual o fenômeno pode ser melhor estudado. A instabilidade mitótica em fungos foi detalhadamente abordada

na revisão sobre o ciclo parassexual feita por AZEVEDO em 1972, MENEZES (1974), ALMEIDA (1976), SOUZA (em publicação).

Resta ainda considerar o papel do ciclo parassexual em relação ao próprio fungo.

A heterocariose provavelmente fornece um amplo meio de estoque de variabilidade expressa ou em potencial. Em si, este estado já é importante para os fungos uma vez que em um organismo haplóide ele permite condições similares à da diploidia. Além disso esse estado permite uma plasticidade de adaptação em relação às alterações do ambiente (PONTECORVO, 1946; JINKS, 1952). Contudo a heterocariose tem duas deficiências sérias na propagação e total exploração da variação genética disponível. Em espécies com confídios uninucleados após cada cultivo monospórico é necessário restabelecer os heterocários por mutação ou anastomose de hifas com culturas vizinhas portadoras de genótipo diverso. Em espécies com confídios multinucleados, há possibilidade de perpetuar o estado heterocariótico por intermédio dos confídios, apesar de que sómente uma pequena proporção dos confídios produzidos por um heterocário são heterocarióticos por si mesmos (TINLINE, 1962). A segunda e mais grave deficiência da heterocariose está na incapacidade de produção, por si mesma, de novos genótipos por recombinação da variabilidade hereditária disponível.

O ciclo parassexual vem completar as vantagens

decorrentes de um heterocário e oferece uma maneira para recombinação em fungos imperfeitos, bem como um suplemento para aqueles fungos com disponibilidade do estágio perfeito.

A maioria dos fungos de valor industrial são desprovidos do estágio sexual perfeito. O melhoramento genético dessas espécies pode ser feito por mutação, mas é a existência do ciclo parassexual que permite a combinação de caracteres favoráveis encontrados em diferentes linhagens, em uma linhagem comum. Merecem ser lembradas aqui revisões a respeito do melhoramento de espécies de fungos produtoras de antibióticos como *SERMONTI* (1959, 1956, 1969), *BURNETT* (1975) e *MacDONALD* (1976). Também durante haploidização pode haver troca de grupos de ligação entre linhagens relacionadas para aumento da produção de drogas de interesse industrial (*BALL*, 1973, citado por *BALL e AZEVEDO*, 1976).

Finalmente o ciclo parassexual tem implicações no aparecimento de novas raças fisiológicas em fungos fitopatogênicos assexuais. Um trabalho clássico nesse campo é o de *BUXTON* (1956, 1962) onde ele demonstrou o controle da patogenicidade em *Fusarium oxysporum* f.s. *pisi*. Nesta espécie foram obtidos diplóides heterozigotos a partir de heterocários entre a raça 1 virulenta para o cultivar Onward de ervilha e a raça 2 virulenta para Onward e Alaska. Recombinantes mitóticos obtidos por este cruzamento foram virulentos não só para os cultivares Onward e Alaska como também para um terceiro

cultivar, o Delviche Commando, para o qual as raças parentais 1 e 2 não foram virulentas. Extensas revisões foram feitas sobre a importância do ciclo parassexual em fungos fitopatogênicos (*TINLINE e McNEILL, 1969; WEBSTER, 1974 e AZEVEDO, 1976*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagem utilizada

Todos os dados deste trabalho foram ~~obtidos~~ com uma linhagem de *Aspergillus* sp 321 selvagem proveniente da micoteca do Instituto Zimotécnico da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

Uma descrição sumária da linhagem com algumas características morfológicas e microscópicas estão apresentadas no item 4.1.

3.2. Meios de cultura e soluções usadas

3.2.1. Meio mínimo

Preparado de acordo com *PONTECORVO e col. (1953)*.

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

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4%.

3.2.2. Meio completo

Preparado de acordo com *PONTECORVO e col.(1953)*.

É constituído de meio mínimo adicionado de:

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

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4%.

3.2.3. Solução de vitaminas

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

A solução foi posteriormente esterilizada em banho-maria por 15 minutos e guardada a 4°C em frasco escuro, sob clorofórmio.

3.2.4. 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 por 20 minutos, misturadas e o pH ajustado para 6,0. Filtrou-se e completou-se o volume para 40 ml com água destilada esterilizada. A seguir a solução foi conservada sob clorofórmio a 4°C.

3.2.5. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo

Ao meio mínimo líquido adicionou-se 2% de meio completo também líquido. A seguir distribuiu-se 2,5 ml por tubo de ensaio e autoclavou-se.

3.2.6. Suplementos adicionados ao meio mínimo

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

Solução estoque (mg/100 ml de H ₂ O)		Quantidade adicionada por placa (20 ml de meio de cultura)	Concentração final no meio de cultura (µg/ml)
Adenina	500,0	0,1 ml	25,0
Guanina	500,0	0,1 ml	25,0
Timina	500,0	0,1 ml	25,0
Citosina	500,0	0,1 ml	25,0
Biotina	4,0	0,1 ml	0,20
Ácido p-aminobenzóico	5,0	0,1 ml	0,25
Tiamina	5,0	0,1 ml	0,25
Piridoxina	5,0	0,1 ml	0,25
Ácido nicotínico	10,0	0,1 ml	0,50

Continua

(Continuação)

Solução estoque (mg/100 ml de H ₂ O)		Quantidade adicionada por placa (20 ml de meio de cultura)	Concentração final no meio de cultura (µg/ml)
Riboflavina	10,0	0,1 ml	0,50
Alanina	1000,0	0,1 ml	50,00
Valina	1000,0	0,1 ml	50,00
Leucina	1000,0	0,1 ml	50,00
Isoleucina	1000,0	0,1 ml	50,00
Prolina	1000,0	0,1 ml	50,00
Fenilalanina	1000,0	0,1 ml	50,00
Triptofano	1000,0	0,1 ml	50,00
Metionina	1000,0	0,1 ml	50,00
Glicina	1000,0	0,1 ml	50,00
Serina	1000,0	0,1 ml	50,00
Treonina	1000,0	0,1 ml	50,00
Cisteína	1000,0	0,1 ml	50,00
Tirosina	1000,0	0,1 ml	50,00
Asparagina	1000,0	0,1 ml	50,00
Glutamina	1000,0	0,1 ml	50,00
Ácido aspártico	1000,0	0,1 ml	50,00
Ácido glutâmico	1000,0	0,1 ml	50,00
Lisina	1000,0	0,1 ml	50,00
Arginina	1000,0	0,1 ml	50,00
Histidina	1000,0	0,1 ml	50,00

3.2.7. Solução de Tween 80

Tween 80 0,1 ml

Água destilada 99,9 ml

2,5 ml da solução foram distribuídos em tubos de ensaio e autoclavados.

3.2.8. Solução salina

NaCl 9,0 g

Água destilada 1000,0 ml

9,0 ml da solução salina foram distribuídos em frascos e autoclavados.

3.2.9. Solução de albumina

Clara de ovo 5 ml

Água destilada esterilizada. . 95 ml

Filtrou-se a solução que foi conservada em frasco escuro a -20°C .

3.2.10. Solução fosfato pH 6,9

Solução A

NaH_2PO_4 27,80 g

Água destilada 1000,0 ml

Solução B

Na₂HPO₄ 53,65 g
 Água destilada. 1000,0 ml

Para se usar a solução fosfato colocou-se 45 ml da solução A, 55 ml da solução B e 100 ml de água destilada. A solução A e B sempre foram conservadas a 4°C, e a solução tampão era preparada imediatamente antes do uso.

3.2.11. Solução Helly

Bicromato de potássio 3,0 g
 Cloreto de mercúrio 5,0 g
 Água destilada 100,0 ml

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

3.2.12. Solução de formol neutro

Formalina 1 parte
 Carbonato de cálcio 3 partes

A solução foi agitada várias vezes ao dia durante 10 dias antes do uso e foi conservada à temperatura ambiente.

3.2.13. 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.

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

<i>p</i> -fluorfenilalanina . . .	1,0 g
Água destilada.	100,0 ml

A solução foi esterilizada em banho-maria por 15 minutos e conservada à 4°C.

3.2.15. Placas de análise

Para isolamento, caracterização dos mutantes auxotróficos e análise genética das colônias, utilizaram-se placas de Petri com meio completo, meio mínimo, meio mínimo suplementado com todos os requisitos nutricionais e meio mínimo suplementado com todos os requisitos exceto aquele em ensaio.

3.2.16. Microscopia e material fotográfico

As observações citológicas sobre o número de núcleos e diâmetros dos conídios foram feitas em microscópio Bausch & Lomb Optical Co., com ocular micrométrica com Charriot (Carl Zeiss, 8x) e objetiva de imersão.

As fotomicroscopias foram feitas em microscópio Zeiss West Germany, câmera Carl Zeiss C 35 10x e objetiva 63x. Utilizou-se o filme Panatomic X.

3.3. 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 $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em todos experimentos.

3.4. Obtenção da curva de sobrevivência com luz ultra-violeta

Os conídios da linhagem de *Aspergillus* foram colocados em solução de Tween, desagregados, estimado seu número na suspensão em hematímetro ($10^6/\text{ml}$) e feita a diluição de 1:10. A suspensão diluída foi colocada em placa de Petri

esterilizada e irradiada com luz ultra-violeta (2.537 Å) em tempos crescentes de exposição. A fonte de irradiação ficou de 13 a 14 cm do material a ser irradiado.

A suspensão irradiada sofreu diluições adequadas em solução salina, e 0,1 ml foi semeado em placas com meio completo. Paralelamente, repetiu-se o mesmo processo com os confídios não irradiados. Após 72 horas de incubação, fez-se a contagem das colônias, estimou-se o número de confídios sobreviventes por ml e a porcentagem de sobrevivência para cada tempo de tratamento. As colônias resultantes da porção não irradiada foram consideradas com o nível de 100% de sobrevivência.

O processo descrito acima foi repetido três vezes, sendo que a curva de sobrevivência obtida foi feita com a porcentagem de sobrevivência média dos três experimentos.

Para uniformização dos resultados, os confídios foram coletados de colônias com seis dias de incubação. As irradiações foram feitas em câmara escura, e a semeadura se dava imediatamente após o tratamento.

3.5. Isolamento de mutantes auxotróficos e morfológicos

O isolamento dos mutantes auxotróficos e morfológicos foi feito pela técnica do isolamento total, segundo

PONTECORVO e col. (1953).

Induziu-se mutações auxotróficas e morfológicas com o mutagênico luz ultra-violeta. Utilizou-se da dose capaz de inviabilizar 95% dos conídios tratados. A escolha de sa dose foi baseada na curva de sobrevivência previamente obtida. A metodologia usada na irradiação para obtenção de mutantes é a mesma descrita no ítem 3.4.

Coletaram-se as colônias sobreviventes com o auxílio de um fio de níquel-cromo e inocularam-se tais colônias em 26 posições conhecidas em placas com meio completo (cha ma das placas mestras). Após o desenvolvimento das colônias em condições adequadas (item 3.3.), com o auxílio de um replicador multifio (*AZEVEDO e col., 1976*), transferiram-se todas as colônias para placas com meio mínimo. As colônias que não cresciam em meio mínimo eram localizadas na placa mestra e es to ca das para posterior caracterização.

Os mutantes morfológicos foram selecionados de sa de que suas características se diferenciavam da linhagem selvagem através da inspeção visual.

3.6. Caracterização dos mutantes auxotróficos

Todas as colônias que cresciam em meio completo mas não cresciam em meio mínimo, foram usadas na constitui

ção de uma placa mestra que posteriormente foi replicada para placas com meio mínimo suplementado com soluções de caseína hidrolisada, vitaminas, extrato de leveduras e ácidos nucléicos, respectivamente.

A leitura dessas placas após incubação revelou para qual grupo de nutrientes houve deficiência.

Isolados os mutantes monoauxotróficos passou-se ao isolamento dos mutantes duplos auxotróficos. Dentre os monoauxotróficos foram escolhidos os mais estáveis que também sofreram tratamento com ultra-violeta. Salvo a suplementação em meio mínimo com os requisitos envolvidos na primeira mutação, os mutantes duplos foram isolados de acordo com o método descrito no item 3.5.

3.7. Ensaio de reversão

Todos os mutantes obtidos foram ensaiados para reversão das marcas nutricionais. Tal ensaio foi feito espalhando-se cerca de 10^6 - 10^7 cófídios por mililitro, em placas com meio mínimo, ou com meio mínimo suplementado com requisitos nutricionais que não os das marcas em ensaio. Desse modo foi possível calcular a frequência de reversão para as diferentes marcas envolvidas nos mutantes simples e duplos.

3.8. Ensaio de alelismo

Para os ensaios de alelismo, utilizaram-se tubos de ensaio com meio mínimo mais 2% de meio completo suplementado com os requisitos nutricionais correspondentes às mutações auxotróficas não envolvidas no ensaio.

Após 8 a 10 dias de incubação as películas, ou precipitados formados nos tubos de ensaios, foram transferidos para placas com meio mínimo para observação da formação ou não de heterocários. Em alguns casos foram colhidos conídios dos heterocários e espalhados em placas com meio completo para observação dos componentes parentais do heterocário.

3.9. Técnicas de análise genética - ciclo parassexual

3.9.1. Obtenção de heterocários

O fenômeno da heterocariose em *Aspergillus nidulans* foi descrito e discutido por *PONTECORVO e col. (1953)*.

No presente trabalho a metodologia usada teve como base os dados do trabalho acima citado, salvo pequenas adaptações. Heterocários formados entre duas linhagens requerendo diferentes fatores de crescimento foram obtidos quando aproximadamente igual número de conídios das duas linhagens (cerca de 10^6) foram colocados em 2 ml de meio mínimo líquido suplementado com 2% de meio completo líquido.

Essa suspensão dos dois tipos de conídios foi agitada fortemente e incubada por 4 a 5 dias. Durante esse período formou-se em alguns casos uma tênue película na superfície do meio e em outros casos houve crescimento submerso tornando o meio intensamente viscoso. A película foi retirada e cortada em 3 ou 4 pedaços que foram distribuídos sobre a superfície do meio mínimo sólido, em placa de Petri. Também o micélio submerso foi retirado, esgotado o excesso de umidade em papel de filtro esterilizado e colocado em fragmentos sobre a superfície de meio mínimo sólido. Setores de crescimento heterocariótico puderam ser visualmente detectados depois 5 - 6 dias de incubação.

3.9.2. Obtenção de diplóides

Diplóides heterozigotos foram obtidos pelo método usado por *ROPER (1952)*, que consiste na semeadura em meio mínimo, de grandes quantidades de conídios, previamente suspensos em solução de Tween, a partir de um heterocário. Sendo os conídios haplóides incapazes de crescer em meio mínimo, apenas heterozigotos diplóides prototróficos podem crescer, sendo facilmente selecionados e isolados.

3.9.3. Haploidização e permuta mitótica

Durante o crescimento vegetativo, a segregação

de marcas para as quais um diplóide é heterozigoto, não é somente uma consequência de crossing-over mitótico. É também o resultado de um processo de haploidização no qual, todo o cromossomo e não uma parte deste segrega ao acaso.

A haploidização resulta de uma série de não disjunções. Este mecanismo envolvendo uma não disjunção e consequente haploidização, foi bem estudado por KÄFER (1960). No presente trabalho, foram utilizados três métodos de haploidização. Haploidização espontânea foi obtida inoculando-se diplóides em placas com meio completo. Os setores emitidos foram purificados e analisados para requisitos nutricionais. Os outros dois métodos para haploidização: indução por luz ultra-violeta e seleção por pFA são descritos nos itens 3.9.3.1. e 3.9.3.2., respectivamente.

A purificação dos setores haplóides sempre foi feita por estrias em meio completo sólido.

3.9.3.1. Haploidização com luz ultra-violeta

A luz ultra-violeta, um agente que induz não disjunção (KÄFER, 1968), foi usada para obtenção de haplóides. Neste caso a metodologia é a mesma descrita no item 3.4. Os diplóides heterozigotos isolados foram incubados em meio completo e os confídios coletados dessas colônias foram expostos à luz ultra-violeta por 4 minutos. A suspensão irradiada foi

diluída adequadamente e semeada em placas com meio completo (Figura 5). Após 5 - 6 dias de incubação, segregantes haplóides e recombinantes mitóticos foram isolados. Ambos os eventos foram obtidos tanto a partir de setores provenientes de colônias diplóides como de colônias com crescimento lento em meio completo.

3.9.3.2. A técnica da *p*-fluorfenilalanina (*p*FA)

MORPURGO (1961) e LHOAS (1961) descreveram um método para evidenciar o aparecimento de haplóides em linhagens diplóides de *A. nidulans* e *A. niger*, respectivamente. O método está baseado no fato de que a *p*-fluorfenilalanina (abreviadamente *p*-FA) inibe o crescimento de linhagens diplóides, mas permite o desenvolvimento normal de setores haplóides. No presente trabalho a *p*FA, que é um análogo da fenilalanina, foi adicionada ao meio completo obtendo-se uma concentração final de 50 µg/ml. Cada placa foi dividida em quadrantes e em cada um desses quadrantes foi inoculado o diplóide desejado. Várias placas foram feitas para cada diplóide. A purificação dos setores haplóides em meio completo foi feita após 7 a 10 dias de incubação. A seguir montou-se em meio completo, placas mestras com os setores purificados. Após 4 dias de incubação, essas placas mestras foram replicadas para as placas de análise com auxílio de um replicador multifio. As leituras das placas de análise foram feitas com 24 e 48 horas de incubação.

anotando-se as colônias que cresceram e as que não cresceram.

3.10. Caracterização de haplóides e diplóides através do número de núcleos presentes nos conídios

Para a coloração dos conídios (*ROBINOW e CATEN, 1969*, modificado por *PAES DE BARROS, 1977*) utilizou-se sempre colônias com 4 - 5 dias de incubação. Com o auxílio de uma alça de níquel-cromo os conídios foram coletados e espalhados sobre lamínula em uma gota de albumina a 5%. Essa suspensão foi homogeneizada com o auxílio de uma outra lamínula e deixada para secar à temperatura ambiente. Esse processo permite a aderência dos conídios na superfície da lamínula. A fixação do material foi feita com fixador Helly mais 6% (v/v) de formol neutro. Após o contacto dos conídios com o fixador por 15 minutos as lamínulas foram lavadas com álcool 70% e hidrolisadas com HCl 1N a 63°C por 20 minutos. Em seguida as lamínulas foram lavadas por submersão em água destilada por 5 minutos e secadas levemente com papel de filtro, ficando prontas para receberem o corante. Imediatamente antes do uso diluiu-se 18 gotas de Giemsa em 10 ml de tampão fosfato pH 6,9. Essa solução permaneceu em contacto com o material durante 45 a 60 minutos, dependendo da linhagem em estudo. Após esse tempo as lamínulas passaram por uma rápida lavagem em tampão fosfato, sendo em seguida colocadas em lâminas para observações microscópicas.

Após a preparação, contou-se o número de confídios uni, bi, tri e tetranucleados das linhagens.

O número de núcleos nos confídios foi usado como um critério para discernimento entre haplóides e diplóides.

3.11. Análise estatística

Um outro critério utilizado no reconhecimento de linhagens haplóides e diplóides, foi a medida do diâmetro de seus confídios (*PONTECORVO e col., 1953*). Três linhagens diplóides foram utilizadas e em cada uma mediu-se o diâmetro de 28 confídios. Após serem haploidizadas, os confídios das linhagens haplóides também foram medidos e os valores obtidos comparados com as linhagens diplóides que lhes deram origem. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância segundo uma classificação hierárquica (*SNEDECOR e COCHRAN, 1972*). Em seguida, as linhagens haplóides foram comparadas com as respectivas diplóides através de um teste "t" (*PIMENTEL GOMES, 1973*).

4. RESULTADOS

4.1. Descrição sumária da linhagem em meio completo

A Figura 1 apresenta uma colônia da linhagem selvagem de *Aspergillus* sp crescida em meio completo. Após 4 dias de incubação, uma série de colônias semelhantes à apresentada na Figura 1 foram tomadas como base para a descrição sumária da linhagem utilizada neste trabalho.

Esta linhagem produz intensa esporulação que fica parcialmente encoberta por micélio aéreo. Os conídios novos são brancos o que pode ser notado na periferia das colônias, enquanto que os conídios da região mais central são amarelados. Entretanto, devido a ocorrência de intenso micélio aéreo, as colônias tomam um aspecto semelhante a algodão de coloração amarelo pálido.

Usualmente há produção de setores pouco nítidos que se assemelham muito à colônia original. Como exemplo, pode-se citar a ocorrência de setores com menor ou maior inten

sidade de micélio aéreo. Devido às alterações na quantidade desse micélio nota-se maior ou menor mascaramento da coloração dos conídios. Não foi detectada produção de cleistotécio.

Figura 1 - Linhagem de *Aspergillus* sp 321 em meio completo. Todos os resultados deste trabalho foram obtidos com esta linhagem.

Ao microscópio, as hifas, estruturas conidiais e conídios são translúcidos. A ramificação das hifas ora é esparsa, ora frequente. As estruturas conidiais apresentam-se com pedúnculo, vesícula e esterígmias primários, sendo bastante rara a detecção de esterígmias secundários. Os conidióforos originam-se de célula podal e apresentam-se septados ou não. As vesículas e os conídios são globosos, sendo de cerca

de 5 μ o diâmetro dos conídios, enquanto as vesículas apresentam-se com cerca de 12,5 μ de largura por 11 μ de comprimento. As células hifais são curtas (15 μ) enquanto os conidióforos são bastante longos (300 a 500 μ), sendo a largura de ambos cerca de 6 μ . Os esterígmas apresentam de 8 a 10 μ de comprimento por 4 a 5 μ de largura.

Esta linhagem pertence ao gênero *Aspergillus*, porém se distingue das espécies que já tiveram o ciclo parassexual descrito.

4.2. Sobrevivência à luz ultra-violeta

Os conídios da linhagem haplóide selvagem foram tratados com luz ultra-violeta nos tempos de um, dois, três, quatro e cinco minutos em suspensão salina. Assim foi possível estimar a porcentagem relativa de sobrevivência (Tabela 1), bem como traçar uma curva de sobrevivência como mostra a Figura 2.

Tabela 1 - Média do número de conídios sobreviventes e porcentagem relativa da média de conídios sobreviventes à luz ultra-violeta.

Tempo de exposição à UV em minutos	Média dos conídios viáveis/ml*	% relativa dos conídios viáveis
0	$1,54 \times 10^6$	100,00
1	$1,32 \times 10^6$	85,71
2	$7,37 \times 10^5$	47,86
3	$2,67 \times 10^5$	17,34
4	$7,50 \times 10^4$	4,87
5	$1,10 \times 10^4$	0,71

*Resultado de três repetições.

Figura 2 - Curva de sobrevivência de *Aspergillus* sp 321 à luz ultra-violeta.

4.3. Obtenção dos mutantes

Pela curva de sobrevivência estimou-se a dose capaz de inviabilizar 95% dos conídios irradiados. Essa dose, que correspondeu a 4 minutos de exposição à luz ultra-violeta, foi escolhida para indução de mutações.

A luz ultra-violeta induziu mutações auxotróficas e morfológicas com um rendimento de 0,69% e 31% respectivamente. Os mutantes auxotróficos isolados estão relacionados na Tabela 2, onde também são apresentados os símbolos desses mutantes em ordem numérica de caracterização.

Tabela 2 - Mutantes auxotróficos obtidos por irradiação de conídios da linhagem selvagem com luz ultra-violeta.

Requisito nutricional envolvido	Símbolo dos mutantes em ordem numérica de caracterização
metionina	met 2
metionina	met 3
metionina	met 4
metionina	met 5
metionina	met 6
lisina	lis 1
lisina	lis 2
leucina	leu 1
leucina	leu 2
serina	ser 1
biotina	bio 1
biotina	bio 3
biotina	bio 4
biotina	bio 5
tiamina	tia 1
adenina	ade 1

O passo seguinte foi o isolamento de mutantes duplos auxotróficos. Esses mutantes foram isolados tratando-se alguns mutantes simples com luz ultra-violeta. A Tabela 3 apresenta os mutantes duplos obtidos.

Tabela 3 - Duplos mutantes obtidos após irradiação de alguns mutantes simples com luz ultra-violeta.

Mutante simples utilizado	Segunda marca obtida
met 2	pro 1 ^a
met 3	lis 3
met 4	ade 2
met 4	pir 1 ^b
lis 1	arg 1 ^c
leu 2	bio 6

a: pro = prolina

b: pir = piridoxina

c: arg = arginina

4.4. Ensaio de reversão

Todos os mutantes auxotróficos foram ensaiados para verificação da estabilidade das marcas nutricionais. O teste de reversão foi feito semeando-se uma grande quantidade de conídios (10^6 - 10^7 /ml) em meio mínimo. Através do número de colônias que cresciam nesse meio, estimou-se a fre-

qüência de reversão do marcador auxotrófico.

Nas Tabelas 4 e 5 estão apresentados os resultados do ensaio de reversão da primeira e segunda marca nutricional.

Tabela 4 - Frequência de reversão espontânea para as mutações auxotróficas simples em 10^6 confídios/ml.

Mutantes	Número de re- vertentes
met 2	0
met 3	0
met 4	0
met 5	0
met 6	0
lis 1	0
lis 2	0
leu 1	produção de setores
leu 2	0
bio 1	crescimento residual
bio 3	28 (colônias pequenas)
bio 4	41 (colônias pequenas)
bio 5	200
tia 1	crescimento residual
ade 1	0
ser 1	crescimento residual

Tabela 5 - Frequência de reversão espontânea
para a segunda mutação auxotrófica
em 10^7 células/ml.

Mutantes	Número de re- vertentes
pro 1 ^a	0
lis 3	0
ade 2 ^a	0
pir 1	20
arg 1 ^a	0
bio 6	1

a = Apresentaram sinais de crescimento residual.

4.5. Ensaio de alelismo e nomenclatura dos mutantes

Foram feitos ensaios de alelismo para mutações envolvendo metionina, lisina, leucina, adenina e biotina. Tal ensaio se fez necessário por ter sido isolado mais de 1 mutante envolvendo os nutrientes citados acima. Ver resultados na Tabela 6 - a, b, c, d, e.

Tabela 6 - Ensaios de alelismo para os mutantes portadores da mesma deficiência nutricional.

a) Metionina

	met 2	met 3	met 4	met 5	met 6
met 2	----	+++	----+	+++	---+
met 3		----+	++++	---+	++++
met 4			----	++++	---+
met 5				---+	++++
met 6					----

---- = ausência de crescimento.

----+ = resíduos no fundo do tubo de ensaio.

---+ = membrana incompleta com pouca viscosidade.

+++ = membrana viscosa.

++++ = película com confidio.

b) Lisina

	lis 1	lis 2	lis 3
lis 1	----+	----+	----+
lis 2		----	----+
lis 3			----+

---- = ausência de crescimento.

----+ = resíduos no fundo do tubo.

c) Leucina

	leu 1	leu 2
leu 1	----	----
leu 2		----

---- = ausência de crescimento.

Tabela 6 - Continuação.

d) Adenina

	ade 1	ade 2
ade 1	---+	+++
ade 2		---+

---+ = resíduos no fundo do tubo.

+++ = membrana viscosa.

e) Biotina

	bio 3	bio 4	bio 5	bio 6
bio 3	+--+	++++	++++	++++
bio 4		+--+	+--+	+--+
bio 5			+--+	+--+
bio 6				----

---- = ausência de crescimento.

+--+ = película fina e branca.

++++ = película bem formada com confidio.

Tabela 6 - Continuação.

a) Metionina

As setas indicam complementação.

b) Lisina

lis 1 = lis 2 = lis 3

c) Leucina

leu 1 = leu 2

d) Adenina

ade 1 $\longleftrightarrow$ ade 2

A seta indica complementação.

e) Biotina

As setas indicam complementação.

Pelos resultados dos testes de alelismo foi possível dar uma nomenclatura mais apropriada e definitiva aos mutantes que foram usados nas análises posteriores. Essa nomenclatura foi feita seguindo-se as recomendações padronizadas por DEMEREC e col. (1966) em bactérias e adaptadas para fungos por CLUTTERBUCK (1968). Na Tabela 7 estão apresentadas as nomenclaturas definitivas dos mutantes.

Tabela 7 - Nomenclatura de todos os mutantes
obtidos neste trabalho com base
nos ensaios de alelismo.

Mutantes	Nomenclatura definitiva
met 2	met A1
met 4	met A2
met 6	met A3
met 3	met B1
met 5	met B2
lis 1	lis A1
lis 2	lis A2
lis 3	lis A3
leu 1	leu A1
leu 2	leu A2
ade 1	ade A1
ade 2	ade B1
bio 3	bio A1
bio 4	bio B1
bio 5	bio B2
bio 6	bio B3
pro 1	pro A1
pir 1	pir A1
arg 1	arg A1
tia 1	tia A1

4.6. Análise genética

4.6.1. Obtenção de heterocários

No ciclo parassexual os estudos genéticos são feitos baseados nas análises mitóticas, segundo o método de *ROPER (1952)*. De posse dos mutantes duplos o próximo passo foi a obtenção do heterocário. Os heterocários foram isolados cruzando-se os duplos mutantes em todas as combinações possíveis. A Tabela 8 apresenta os resultados desses cruzamentos.

As melhores películas formadas entre os cruzamentos dos duplos mutantes, foram transplantadas para meio mínimo. Na Tabela 9 observa-se o desenvolvimento dessas películas e na Figura 3 pode-se observar um heterocário típico.

Os confídios coletados dos heterocários e semeados em meio completo deram origem a colônias com tonalidades claras e escuras (Figura 4). Uma amostra (26 colônias) de cada tonalidade foi ensaiada quanto aos seus requisitos nutricionais (Tabela 10).

Tabela 8 - Cruzamento de todos os duplos mutantes entre si.

	met A1 pro A1	met B1 lis A3	met A2 ade B1	met A2 pir A1	lis A1 arg A1	leu A2 bio B3
met A1 pro A1	----	----	----	----	----	----
met B1 lis A3		----	----	----	----	----
met A2 ade B1			----	----	----	----
met A2 pir A1				----	----	----
lis A1 arg A1					----	----
leu A2 bio B3						----

---- = ausência de crescimento.

---+ = película incompleta.

--++ = viscosidade no fundo do tubo de ensaio.

-+++ = película muito fina.

++++ = película completa.

Tabela 9 - Desenvolvimento de algumas películas transplantadas para placas com meio mínimo.

Cruzamento	Desenvolvimento
<i>met A1 pro A1/met B1 lis A3</i>	-
<i>met B1 lis A3/met A2 ade B1</i>	-
<i>met A1 pro A1/met A2 ade B1</i>	-
<i>met A1 pro A1/leu A2 bio B3</i>	-
<i>met B1 lis A3/leu A2 bio B3</i>	-
<i>met A2 pir A1/leu A2 bio B3</i>	+
<i>met A2 ade B1/leu A2 bio B3</i>	+
<i>met B1 lis A3/met A2 pir A1</i>	+

- = ausência de desenvolvimento do heterocário.

+ = desenvolvimento do heterocário.

Figura 3 - Heterocário típico em meio mínimo, resultante do cruzamento entre *metB1 lis A3/met A2 pir A1*.

Tabela 10 - Análise de requisitos nutricionais das colônias claras e escuras obtidas dos confídios coletados dos heterocários.

Cruzamento	Coloração	Requisitos envolvidos
<i>met A2 ade B1/leu A2 bio B3</i>	claras escuras	leucina - biotina ^a metionina - adenina
<i>met A2 pir A1/leu A2 bio B3</i>	claras escuras	leucina - biotina ^a metionina - piridoxina
<i>met B1 lis A3/met A2 pir A1</i>	claras escuras	metionina - lisina metionina - piridoxina

a = Na maioria das colônias ensaiadas o marcador biotina não foi encontrado.

Figura 4 - Isolados parentais claros e escuros obtidos dos heterocários.

4.6.2. Obtenção dos diplóides

Os diplóides foram isolados dos três cruzamentos que produziram heterocáries típicos.

Nas Tabelas 11 e 12 são apresentadas as seqüências seguidas para isolamento de diplóides em meio seletivo.

Tabela 11 - Isolamento de diplóides a partir de conídios (10^6 /ml) coletados dos heterocáries.

Cruzamento	Crescimento em meio		Coloração em meio	
	completo	mínimo	completo	mínimo
<i>met A2 ade B1/leu A2</i>	+++	--+	claras e esc.	escuras
<i>met A2 pir A1/leu A2</i>	+++	--+	claras e esc.	escuras
<i>met B1 lis A3/met A2 pir A1</i>	+++	--+	claras e esc.	escuras

+++ = aproximadamente 300 colônias por placa.

--+ = máximo de 10 colônias por placa.

Tabela 12 - Isolamento de diplóides a partir das colônias claras e escuras (Tabela 11) isoladas dos heterocá-
rios.

Cruzamento	Coloração em meio		Crescimento em meio	
	completo	mínimo	completo	mínimo
<i>met A2 ade B1/leu A2</i>	(escuras	escuras) ^a	+++	+++
	claras		+++	---
	(escuras	escuras) ^b	+++	---
<i>met A2 pir A1/leu A2</i>	(escuras	escuras) ^a	+++	+++
	claras		+++	---
	(escuras	escuras) ^b	+++	---
<i>met B1 lis A3/met A2 pir A1</i>	(escuras	escuras) ^a	+++	+++
	claras		+++	---
	(escuras	escuras) ^b	+++	---

a = Isoladas das colônias escuras que cresceram em meio mínimo na Ta
bela 11.

b = Isoladas das colônias escuras que cresceram em meio completo na
Tabela 11.

+++ = Aproximadamente 300 colônias por placa.

--- = Máximo de 10 colônias por placa.

4.6.3. Haploidização e permuta mitótica

4.6.3.1. Haploidização induzida por luz ultra-violeta

Na Tabela 13 estão apresentados os segregantes ha-
plóides isolados de diplóides tratados com luz ultra-violeta.

Tabela 13 - Haploidização induzida com luz ultra-violeta.

Diplóides	Segregantes	Frequência
	<i>met B1 met A2 pir A1 lis A3</i>	2
	<i>met B1 met A2 pir A1</i>	2
	<i>met A2 lis A3</i>	1
<i>met B1 lis A3// met A2 pir A1</i>	<i>met A2 pir A1</i>	1 a
	<i>met B1 met A2</i>	1
	<i>met A2</i>	2
	<i>lis A3</i>	2
	<i>pir A1</i>	2
	<i>metionina</i>	1
	<i>met A2 pir A1 leu A2</i>	4
	<i>pir A1 leu A2</i>	2
<i>met A2 pir A1// leu A2</i>	<i>pir A1</i>	1 b
	<i>met A2 leu A2</i>	1
	<i>met A2 adenina*</i>	1
	<i>Selvagem</i>	1
<i>met A2 ade B1// leu A2</i>	<i>leu A2</i>	3 c

a = De 39 setores analisados 5 eram haplóides e de 10 colônias de crescimento lento em meio completo 9 eram haplóides.

b = De 24 setores analisados 5 eram haplóides e de 10 colônias de crescimento lento em meio completo 5 eram haplóides.

c = Isoladas de colônias de crescimento lento em meio completo.

* = Provavelmente corresponde a uma nova mutação induzida com luz ultra-violeta.

4.6.3.2. Haploidização selecionada com pFA

Na Tabela 14 se encontra o resultado da análise de setores haplóides purificados, selecionados com pFA.

Tabela 14 - Haploidização selecionada com pFA.

Diplóides	Segregantes	Frequência
	<i>met B1 met A2</i>	1
	<i>lis A3 pir A1</i>	1
	<i>lis A3</i>	4
	<i>pir A1</i>	25
<i>met B1 lis A3// met A2 pir A1</i>	<i>met B1</i>	2 a
	<i>metionina lis A3 pir A1</i>	5
	<i>metionina pir A1</i>	12
	<i>metionina lis A3</i>	6
	<i>metionina</i>	5
	<i>met A2 pir A1 leu A2</i>	6
	<i>met A2 pir A1</i>	9
<i>met A2 pir A1// leu A2</i>	<i>pir A1 leu A2</i>	2 b
	<i>pir A1</i>	20
	<i>leu A2</i>	1
	<i>met A2 ade B1 leu A2</i>	10
	<i>met A2 ade B1</i>	20
<i>met A2 ade B1// leu A2</i>	<i>met A2</i>	1 c
	<i>leu A2</i>	2
	<i>Selvagem</i>	1

a = 65 setores analisados.

b = 81 setores analisados.

c = 42 setores analisados.

4.6.3.3. Haploidização espontânea

Os setores espontâneos obtidos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Haploidização espontânea.

Diplóides	Segregantes	Número de segregantes
<i>met B1 lis A3// met A2 pir A1</i>	<i>met A2 pir A1 lis A3</i>	1
	<i>lis A3 pir A1</i>	1
	<i>met B1</i>	1
	<i>lis A3</i>	1
<i>met A2 pir A1// leu A2</i>	<i>met A2 pir A1 leu A2</i>	1

A haploidização com luz ultra-violeta, pFA e espontânea pode ser observada nas Figuras 5, 6 e 7. As três Figuras se referem ao diplóide *met B1 lis A3// met A2 pir A1*.

A Figura 5 apresenta colônias provenientes de confídios tratados com luz ultra-violeta. Observa-se nessa Figura colônias emitindo setores e colônias pequenas que crescem lentamente em meio completo. Linhagens haplóides e recombinantes mitóticos foram isolados tanto a partir dos setores como das colônias de crescimento lento em meio completo.

A Figura 6 apresenta colônias crescidas em meio completo contendo pFA. Os setores isolados foram purificados e a análise genética desses setores constatou a existência de segregantes haplóides.

A Figura 7 apresenta a produção de setores haplóides espontâneos.

Figura 5 - Haploidização e permuta mitótica induzidos com luz ultra-violeta.

Figura 6 - Haploidização pela técnica da pFA a uma concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ após 10 dias de incubação.

Figura 7 - Haploidização espontânea. O setor à esquerda é um segregante *met B1*, o setor superior à direita é um segregante *lis A3* e o inferior é *met A2 pir A1 lis A3*.

4.6.4. Permuta mitótica

O processo de formação de recombinantes no ciclo parassexual é análogo ao já descrito em 1936 por *STERN* em *Drosophila melanogaster*. Por indução com luz ultra-violeta isolaram-se diplóides auxotróficos os quais são produtos de recombinação mitótica no estágio de quatro fios resultando núcleos filhos homozigotos para marcadores envolvidos nos cruzamentos.

De 71 colônias analisadas, 10 diplóides foram selecionados contendo marcadores auxotróficos (Tabela 16).

Tabela 16 - Ocorrência de permuta mitótica por exposição de diplóides à luz ultra-violeta.

Diplóides	Marcadores obtidos	Freqüência
<i>met B1 lis A3//met A2 pir A1</i>	<i>pir A1</i>	4
	<i>lis A3</i>	2
	<i>met B1</i>	1 a
	<i>metionina</i>	1
<i>met A2 pir A1//leu A2</i>	<i>met A2</i>	1 b
<i>met A2 ade B1//leu A2</i>	<i>met A2</i>	1

a = Detectou-se permuta mitótica em 6 setores dos 39 analisados e em 2 colônias de crescimento lento em meio completo das 11 analisadas.

b = Não foi detectada permuta mitótica em nenhum dos 24 setores analisados. Detectou-se permuta mitótica em uma das 9 colônias de crescimento lento em meio completo.

Os setores diplóides resultantes de permuta mitótica, foram tratados com pFA e produziram novos setores. Os novos setores purificados e analisados forneceram os dados da Tabela 17.

4.7. Medidas dos diâmetros dos conídios e número de núcleos em linhagens haplóides e diplóides

Várias evidências comprovam a natureza diplóide de uma linhagem de *Aspergillus nidulans*, PONTECORVO e col. (1953). Como critério prático usado em laboratório, foram medidos e comparados os diâmetros dos conídios das linhagens haplóides e diplóides de *Aspergillus* sp 321. Nesta linhagem as medidas obtidas estão apresentadas na Tabela 18.

Tabela 17 - Haploideização dos diplóides auxotróficos com auxílio de pFA.

Diplóide	Marcador obtido por permuta mitótica	Segregantes haplóides	Nº de segregantes haplóides
met B1 lis A3//met A2 pir A1	metionina	met A2 pir A1 lis A3	1
		met A2 pir A1	1
		metionina pir A1 lis A3	3
		metionina lis A3	2
		metionina	3
pir A1		pir A1 met B1 lis A3	1
		pir A1 met B1	1
		pir A1 metionina lis A3	2
		pir A1 metionina	6
		pir A1 lis A3	1
		pir A1	3
met A2 ade B1//leu A2	met A2	met A2 ade B1	2
		met A2	1

Tabela 18 - Médias (28 repetições) dos diâmetros de confídios de linhagens diplóides e seus respectivos segregantes e recombinantes haplóides.

Linhagens diplóides	Diâmetro	
	Diplóide	Segregantes e recombinantes haplóides
<i>met B1 lis A3//met A2 pir A1</i>	4,7225	4,5211
<i>met A2 ade B1//leu A2</i>	4,5857	4,2529
<i>met A2 pir A1//leu A2</i>	4,3350	4,2211

Os diâmetros dos confídios diplóides e haplóides foram submetidos a uma análise de variância (Tabela 19), sendo em seguida comparadas as médias dessas medidas através do teste t (Tabela 20).

Tabela 19 - Análise da variância dos diâmetros dos confídios.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Entre tratamentos	6	5,6516	0,9419	2,37*
Dentro de tratamentos	189	74,9848	0,3967	
Totais	195	80,6364		

*Significativo ao nível de 95% de probabilidade.

Tabela 20 - Comparação entre as médias dos diplóides e respectivos haplóides através do teste t.

Diplóides	Haplóides	Teste t
4,7225	4,5211	1,20 ^{ns}
4,5857	4,2529	1,98**
4,3350	4,2211	0,68 ^{ns}

ns - Não significativo.

**Significativo ao nível de 99%.

Quando a linhagem original selvagem foi analisada para verificação do número de núcleos em seus conídios, revelou: 45,6% de conídios uninucleados, 49,3% de binucleados, 4,7% de trinucleados, e 0,4% de tetranucleados. As linhagens diplóides também foram analisadas e revelaram mais de 90% de uninucleados. Esses diplóides foram haploidizados e quando analisados apresentaram aumento na porcentagem de conídios binucleados. A comparação do número de núcleos entre linhagens haplóides e diplóides se encontra na Tabela 21.

Na Figura 8 estão apresentados os conídios binucleados de uma linhagem haplóide e na Figura 9 os conídios uninucleados de uma linhagem diplóide.

Tabela 21 - Porcentagem de conídios de *Aspergillus* sp 321 com diferentes números de núcleos.

Linhagens	Porcentagem de conídios			
	Uninu- cleados	Binu- cleados	Trinu- cleados	Nº de co- nídios
A) Diplóides				
met B1 lis A3//met A2 pir A1	97,9	2,1	0,0	4.068
B)				
met A2 ade B1//leu A2	98,9	1,1	0,0	769
C)				
met A2 pir A1//leu A2	98,9	1,1	0,0	892
Haplóides				
segregantes e recombinantes				
- oriundos do diplóide A	45,3	53,0	1,7	5.727
- oriundos do diplóide B	48,2	50,6	1,2	3.012
- oriundos do diplóide C	40,0	58,5	1,5	2.812

Figura 8 - Linhagem haplóide típica de *Aspergillus* sp 321 apresentando conídios binucleados.

Figura 9 - Linhagem diplóide típica de *Aspergillus* sp 321 apresentando conídios uninucleados.

5. DISCUSSÃO

5.1. Sobrevivência à luz ultra-violeta

Através da curva de sobrevivência com luz ultra-violeta (Figura 2), nota-se a correlação dose-efeito que pode ser interpretada segundo a teoria do alvo (LEA, 1956). De acordo com esta teoria, um simples evento microfísico (toque) pode causar um efeito biológico quando atinge estruturas sensíveis da célula (alvo). Existem muitos fatores que influem na curva de sobrevivência de conídios irradiados. Quando a linhagem irradiada é haplóide, obtém-se uma curva do tipo exponencial (um único toque para causar um evento). Na linhagem de *Aspergillus* sp 321 notou-se uma curva de sobrevivência do tipo sigmoideal (múltiplos toques). Esse tipo de curva é esperado para organismos que apresentam material genético em duplicata, como acontece com diplóides, poliplóides ou multinucleados. Quando macroconídios de *Neurospora crassa* (ATWOOD e NORMAN, 1949) foram tratados com luz ultra-violeta apresenta-

ram uma curva de sobrevivência semelhante à obtida com *Aspergillus* sp 321 neste trabalho. Os macroconídios de *Neurospora crassa* são multinucleados, apresentando média de 2,67 núcleos por conídio. Este fato levou à hipótese de que a linhagem de *Aspergillus* também poderia ser multinucleada. Análise posterior dos conídios desta linhagem confirmou tal hipótese, observando-se 1,56 núcleos por conídio nos haplóides provenientes do diplóide A (Tabela 21).

Outra explicação para o tipo de curva encontrado, relaciona-se à pequena quantidade de energia da luz ultra-violeta quando comparada com radiações ionizantes (KAPLAN, 1957; citado por ESSER e KUENEN, 1967).

A dose capaz de inviabilizar 95% dos conídios irradiados correspondeu a quatro minutos de exposição à luz ultra-violeta. Esta dose foi escolhida com base nos dados experimentais obtidos com *A. nidulans* (PONTECORVO e col., 1953). Para *A. nidulans* e *A. flavus*, a dose que resulta em 5% de conídios sobreviventes, quando tratados com a mesma fonte de ultra-violeta, corresponde a 2 - 3 minutos (PIZZIRANI, 1977) e 3 - 3,5 minutos (MESSIAS, 1977), respectivamente. Além do fato relacionado com o número de núcleos nos conídios, essas diferenças também podem ser devidas à maior ou menor pigmentação dos conídios.

5.2. Mutantes e sua estabilidade

Baseando-se na curva de sobrevivência, uma série de mutantes auxotróficos e morfológicos foram isolados após 4 minutos de irradiação ultra-violeta, no entanto, os mutantes morfológicos não foram selecionados como marcadores para constituição de heterocários e posterior análise genética. A exclusão desses mutantes foi devido a motivos tais como: cores não muito contrastantes com a da linhagem selvagem; colônias com coloração diferente da linhagem original, porém com excesso de micélio aéreo o que dificultava a coleta de confídios, ou ainda instabilidade desses caracteres morfológicos quando sucessivamente repicados.

Para trabalhos futuros muitos outros marcadores genéticos estão disponíveis; alguns segregantes possuem quatro mutações auxotróficas acompanhadas de caracteres morfológicos que se estabilizaram durante o manuseio das linhagens. Poder-se-ia ainda aumentar o número de marcadores isolando-se mutantes resistentes a agentes inibidores o que ainda não foi feito. Através do cruzamento de alguns segregantes e isolamento de mutantes para resistência a agentes inibidores disporíamos de um bom estoque de mutantes para estudos genéticos nessa espécie de *Aspergillus*.

Em relação aos mutantes auxotróficos ~~obtidos~~ ^{obtidos} (Tabelas 2 e 3), ocorreram deficiências para aminoácidos (metionina, lisina, leucina, serina, prolina e arginina), vitamí-

nas (biotina, tiamina e piridoxina), e purina (adenina).

O número de mutantes obtidos foi de cerca de 1 para 150 colônias analisadas. O elevado rendimento obtido no caso pode ser devido à seleção prévia feita com as colônias irradiadas e que seriam ensaiadas para verificação de mutações auxotróficas. Nessa seleção prévia escolheram-se as colônias que germinaram mais tardiamente em meio completo após serem irradiadas. Em *A. nidulans*, (PONTECORVO e col., 1953) obtém-se um mutante auxotrófico para cada 200 colônias analisadas.

Devido à grande quantidade de mutantes obtidos com deficiências para metionina (26,3%) e biotina (21,0%) esses resultados foram comparados com a porcentagem de outros mutantes auxotróficos em diferentes espécies de fungos. Consultando a literatura, (FINCHAM e DAY, 1971) constatou-se que o rendimento de um determinado mutante varia de espécie para espécie, e que em cada caso existe um requisito nutricional isolado mais frequentemente. Em *Neurospora crassa*, em 144 mutantes obtidos, 16,6% eram deficientes para metionina e 14,6% para adenina; em *Ophistoma multiannulatum* em 200 mutantes, 21% eram deficientes para arginina e 17% para tiosulfato ou outros compostos de enxofre reduzido; em *Venturia inaequalis* em 100 mutantes, 19% eram deficientes para uridina ou citrulina e 18% para arginina; em *Ustilago maydis*, em 98 mutantes, 17,3% eram deficientes para adenina e 15,3% para nicotinamida; em *Aspergillus nidulans*, em 98 mutantes, 17,3% eram deficientes

para amônia ou outros compostos de nitrogênio reduzido, e 10,2% para adenina; em *Penicillium chrysogenum*, em 398 mutantes, 13,6% eram deficientes para lisina e 13,0% para arginina.

Os mutantes auxotróficos foram submetidos a um teste de reversão afim de se verificar a estabilidade de suas marcas nutricionais. Esses testes de reversão estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, onde pode-se notar que de um modo geral, os mutantes para aminoácidos e para adenina foram mais estáveis que os mutantes para vitaminas. Nas mutações envolvendo requisitos para vitaminas foi comum observarem-se efeitos de crescimento residual e assim sendo, esses mutantes foram preteridos na triagem para obtenção dos duplos mutantes.

Na aplicação desses ensaios de reversão deve ser considerado certas fontes de erros que têm sido antecipadas por *ROPER (1950)* e *GRIGG (1952)*. Em primeiro lugar deve-se conhecer o número inicial de núcleos em ensaio e ter certeza de que este número não aumenta através da germinação de confídios auxotróficos em meio seletivo. Tal germinação pode produzir erro devido ao possível efeito da divisão nuclear na mutação em condições metabólicas restritas. Em *A. nidulans* foi notado que esses erros não influem porque os confídios são uninucleados e as linhagens testadas não germinam durante o ensaio.

Na linhagem utilizada no presente trabalho, tais erros são de relevante importância; primeiramente porque sen-

do esta linhagem multinucleada, deve-se estimar a frequência de reversão em número de núcleos por mililitro e não em número de conídios por mililitro. Para ilustrar tomaremos por base uma linhagem em ensaio de reversão com a mesma porcentagem de núcleos encontrada nos conídios da linhagem selvagem, ou seja: 45,6% de conídios uninucleados, 49,3% de binucleados, 4,7% de trinucleados e 0,4% de tetranucleados. Se 10^6 conídios/ml são usados no ensaio, na verdade estaremos com um acréscimo de 6×10^5 núcleos em cada placa do ensaio. Esses núcleos que devem ser considerados como unidades de reversão, certamente influirão nos resultados, aumentando a frequência de reversão.

Uma segunda fonte de erros sugerida consiste na possível perda de prototróficos quando eles são selecionados a partir de uma grande massa de auxotróficos. Principalmente quando conídios da linhagem em ensaio germinam em meio mínimo e por secreção lançam ao meio de cultura nutrientes que satisfazem certas linhagens que crescem por sintrofismo. Nos ensaios de reversão apresentados nas Tabelas 4 e 5 do presente trabalho, deve ter ocorrido sintrofismo para os marcadores envolvendo requisitos nutricionais para vitaminas. Isto explica a maior parte dos crescimentos observados nas placas com meio seletivo dos referidos ensaios. Quanto aos mutantes envolvendo deficiências para aminoácidos ficou notório que eles são ótimos como marcadores genéticos (nota-se neste caso exceção para o aminoácido serina). Pelos dados apresentados na

Tabela 5 nota-se sinais de crescimento residual para prolina 1, adedina 2 e biotina 6, porém deve ser notado que nestes casos foram testados 10^7 conídios/ml e a Tabela 4 apresenta o número de revertentes em 10^6 conídios/ml.

Em linhagens de *Neurospora*, GRIGG (1952) encontrou inibição de prototróficos por auxotróficos em meio mínimo com sorbose como fonte de carbono. Neste meio a eficiência de seleção de prototróficos depende da densidade de conídios auxotróficos viáveis ao redor dos prototróficos. Trabalhos posteriores confirmaram os dados de GRIGG, porém somente em meio com sorbose, desde que, em meio com glicose como fonte de carbono não há inibição de prototróficos pelos auxotróficos. Uma fonte de erros adicional sugerida por GRIGG em *Neurospora*, diz respeito à inibição intraconidial envolvida no uso de conídios multinucleados. Desde que isto é correto para *Neurospora*, também deve ser considerado para *Aspergillus* sp 321 o qual também possui conídios multinucleados.

5.3. Ensaios de alelismo

Os ensaios de alelismo apresentados na Tabela 6 a, b, c, d, e, foram necessários por terem sido isolados mais de um mutante auxotrófico envolvendo os nutrientes metionina, lisina, leucina, adenina e biotina. Através desse ensaio pretendeu-se decidir quantos loci estavam envolvidos para cada fator de crescimento. O critério usado foi a comple-

mentação através de heterocários, já que os heterocários são análogos aos heterozigotos e podem ser usados em testes de complementação inter ou intragênica (ROPER, 1971).

Todos os ensaios de complementação da Tabela 6 foram realizados somente em tubos de ensaio. Não foram feitas subculturas em placas com meio mínimo para testar a complementação desde que somente os ensaios em tubos foram suficientes.

Com base nos resultados do teste de alelismo foi possível separar o número de loci envolvidos em cada marca auxotrófica e dar uma nomenclatura apropriada para cada uma delas (CLUTTERBUCK, 1968). A nomenclatura de todos os mutantes obtidos está mostrada na Tabela 7.

Para metionina onde foram encontrados cinco mutantes met⁻, foi possível distinguir dois loci diferentes. Um locus foi chamado de locus A envolvendo met2, met3 e met4. O outro foi o locus B envolvendo met3 e met5. Para a lisina, os resultados indicaram a presença de um único locus chamado de lis A do qual se tem três isolados: *lis A1*, *lis A2* e *lis A3*.

Os mutantes para leucina também foram isolados para um único locus ou seja *leu A1* e *leu A2*.

Para a adenina dois loci foram identificados: *ade A1* e *ade B1*. Finalmente os resultados com biotina onde foram testados quatro isolados, dois loci foram identificados: o locus A ao qual pertence o bio3 e o locus B ao qual pertencem

bio4, bio5 e bio6.

Nas Tabelas 13, 14, 15, 16 e 17, quando se tratava do diplóide *met B1 lis A3//met A2 pir A1*, também foi ne-
cessário lançar mão de ensaios de alelismo. Como se vê, no referido diplóide estão envolvidos dois loci para o marcador metionina. Desde que entre os segregantes desse diplóide não foi possível decidir morfologicamente se era o *met A2* ou *met B1* que estava envolvido, toda vez que aparecia um segregante me-
tionina, este foi submetido a ensaios de alelismo para comple-
mentação com os mutantes auxotróficos simples *met A2* e *met B1* do estoque. Quando havia complementação de um segregante me-
tionina com os loci *met A2*, concluía-se que se tratava do segregante *met B1*, e vice-versa. Este ensaio aparentemente simples, torna-se exaustivo quando se trata de um grande núme-
ro de segregantes envolvendo o marcador metionina, como foi o caso deste trabalho. Convém ressaltar aqui que os resulta-
dos dos ensaios de alelismo não se limitavam à leituras fei-
tas nos tubos de ensaio, ou seja, formação ou não de película. As películas formadas, excesso de viscosidade ou resíduos en-
contrados no fundo dos tubos de ensaio, eram transplantados para placas com meio seletivo para verificar melhor a exis-
tência ou não de complementação. Portanto as conclusões fo-
ram tiradas através do desenvolvimento ou não dos heterocá-
rios. Em alguns casos, quando o segregante metionina em en-
saio apresentava coloração branca ou mais clara que a cor dos mutantes em estoque com os quais seriam cruzados, os heterocá-

rios típicos foram raspados, e seus confídios semeados em placas contendo meio completo. Nessas placas era possível verificar a separação dos componentes do heterocário. Neste caso as placas de meio completo ficavam semelhantes à da Figura 4. Evidentemente quando foi possível chegar até essa fase de avaliação, a decisão entre um e outro locus era segura, porém nem sempre isso foi possível.

Nas Tabelas 13, 14, 16 e 17 aparece entre os segregantes haplóides, o marcador metionina escrito por extenso. Dentro desses casos se encontram segregantes não testados e outros que não se complementaram nem com o locus A nem com o locua B do estoque. A não complementação com nenhum dos dois loci significa a presença desses dois loci entre os segregantes. No entanto, essa informação só foi confirmada em três casos na Tabela 13 e em um caso no Tabela 14. Nos demais casos onde houve complementação, os resultados experimentais não foram concordantes e optou-se por chamá-los simplesmente de metionina. Um resultado mais definitivo é obtido pelo teste de heterozigotos diplóides, onde já não ter-se-iam influências devido ao balanceamento dos heterocários.

5.4. Obtenção de heterocários

A heterocariose vem a ser a coexistência de núcleos geneticamente diferentes em um citoplasma comum. De um

modo geral, os heterocários são instáveis se crescendo em meio onde eles estão desequilibrados e se dissociam dando os componentes parentais homocarióticos (*ROPER, 1971*). Em estudos genéticos há necessidade de heterocários mais estáveis ou balanceados on de certas condições favorecem o crescimento dos heterocários mas não o das células homocarióticas. Essas condições são conseguidas pelo uso de linhagens portadoras de diferentes deficiências nutricionais. Na Tabela 8 são apresentados os cruzamentos de todos os duplos mutantes (Tabela 3) entre si para seleção de heterocários balanceados mais estáveis. No ciclo parassexual a formação de heterocários é condição essencial para obtenção de diplóides (*PONTECORVO, 1956; ROPER, 1966*).

Além da escolha de pares de linhagens que se diferenciam em um ou mais requisitos nutricionais, é aconselhável que pelo menos um dos componentes heterocarióticos tenha uma mutação para coloração. Os mutantes envolvidos nos cruzamentos apresentados na Tabela 8, inicialmente não apresentavam diferenças morfológicas nítidas. Esperava-se que tal limitação iria dificultar a interpretação dos resultados. Surpreendentemente, no entanto, quando esses heterocários foram dissociados em meio completo notou-se que seus componentes se diferenciavam quanto à coloração das colônias (este assunto será abordado mais adiante).

Um caso especial relatado por *BERTOLLI e CATEN* (1975) diz respeito ao isolamento de linhagens diplóides heterozigotas em *Humicola* sp a partir de uma mistura de colônias

auxotróficas sem a detecção de um estágio heterocariótico. Em *Penicillium chrysogenum* (PONTECORVO e SERMONTI, 1954) e *Cephalosporium acremonium* (NUESCH, TREICHLER e LIERSCH, 1973) os heterocários crescem pobremente, e em seguida apresentam diplóides heterozigotos vigorosos. Já nas linhagens de *Humicola* parece ter ocorrido um caso extremo onde não foi detectado heterocário. No entanto deve ser lembrado que BERTOLDI e CATEN (1975) levantaram a hipótese de que análise microscópica poderia revelar porções limitadas de hifas heterocarióticas, as quais foram imediatamente encoberta por micélio diplóide.

Quanto à linhagem de *Aspergillus* sp em estudo, foi notado que nem sempre os heterocários formaram uma película verdadeira (como ocorre na maioria dos heterocários de *A. nidulans*) no tubo de ensaio. Isto foi observado principalmente quando se fez os ensaios de alelismo através da complementação em heterocários. Em muitos casos era observado nos tubos de ensaio um aumento da viscosidade ou a formação de uma membrana muito fina e translúcida que após ser passada para placas contendo meio mínimo sólido desenvolvia heterocários típicos.

Atualmente a fusão de protoplasto tem sido uma nova técnica de interesse para obtenção de heterocários. Ocorrência natural de fusão de protoplasto foram relatadas em *Geotrichum candidum* (FERENCZY, KEVEI e ZSOLT, 1974) e *A. nidulans* (FERENCZY, KEVEI e SZEGEDI, 1975). BINDING e WEBER (1974) descreveram a ocorrência desse fenômeno induzida pela água do

mar ou íons de cálcio em pH alto. Posteriormente *ANNÉ e PEBERDY (1976)* conseguiram formação de heterocários em altas frequências após a indução intraespecífica de fusão de protoplasto em *P. chrysogenum*, *P. patulum*, *P. roquefortii*, *A. nidulans*, *A. niger* e *Cephalosporium acremonium*. Também foi conseguida fusão de protoplasto entre *P. chrysogenum* e *P. notatum*. Em ambos os casos (intra e interespecífica) a indução foi feita por tratamento com polietileno glicol (PEG). Em *Beauveria tenella (PARIS, 1977)* diversos métodos foram usados para se obter heterocários. Eles formaram-se apenas por fusão de protoplasto nutricionalmente dependentes com tratamento com polietileno glicol. Esta técnica traz novas oportunidades de cruzamento entre linhagens de interesse industrial ou utilizadas no controle biológico; especialmente em casos onde existe uma barreira para formação de heterocários pelas técnicas convencionais.

Considerando-se todos os cruzamentos feitos, poderiam ter sido obtidos quinze heterocários diferentes. No entanto somente em três cruzamentos, houve desenvolvimento de heterocários típicos (Tabela 9). Os heterocários formados entre mutantes com deficiências nutricionais, possuem hifas com diferentes proporções dos dois tipos nucleares. O crescimento é mantido por seleção interhifas o que dá aspecto rugoso à colônia conforme se vê pela Figura 3. Apesar da baixa frequência de obtenção de heterocários estáveis típicos, não se pode falar em incompatibilidade de heterocários, desde que este

fenômeno é normalmente descrito entre diferentes isolados. Cabe lembrar no entanto que foi detectada incompatibilidade em linhagens de *Aspergillus nidulans* provenientes do estoque original de *GLASGOW* como relatado por *ROPER (1971)*. Maior número de heterocários poderiam ser obtidos modificando-se as condições em que foram feitos os cruzamentos. Uma possível alteração seria por exemplo aumentar a porcentagem de meio completo adicionada ao meio mínimo em que se montam os cruzamentos. Como apresentado no item 3.2.5., os heterocários obtidos foram cruzados em tubos de ensaio contendo meio mínimo líquido adicionado de 2% de meio completo líquido. Outra modificação possível de ser testada seria a técnica dos "poços": coloca-se meio mínimo sólido em placas de Petri e com o auxílio de um tubo de ensaio pequeno, recortam-se e retiram-se três ou quatro cilindros do meio de cultura formando-se desse modo pequenos "poços" no meio. Conídios das linhagens que serão usadas para formação de heterocários são colocadas em meio mínimo mais 2% de meio completo. Em seguida, essa suspensão é colocada para preencher os "poços" nas placas de meio mínimo. Após alguns dias de incubação há crescimento de heterocários a partir das bordas dos "poços" (*AZEVEDO, 1971*).

Os conídios produzidos por um heterocário, em relação aos genes nucleares, são de um ou de outro tipo parental. Quando conídios dos heterocários foram coletados e semeados em meio completo, observou-se um fato surpreendente. As linhagens parentais que anteriormente não se diferenciavam quanto

a cor de seus confídios, apresentavam-se agora nas cores claras e escuras (Figura 4). As colônias claras e escuras foram submetidas a uma análise de requisitos para identificação (Tabela 10). Através dessa análise foi confirmado que apesar das colônias claras serem uma característica nova, seus marcadores nutricionais correspondiam a um dos componentes dos heterocários. A cor escura a que se referem as Tabelas 10, 11 e 12, assemelham-se à cor da colônia selvagem original.

A mudança de cor observada pode ser atribuída à correlação genes cromossomos e fatores citoplasmáticos. Fatores citoplasmáticos podem se misturar durante o crescimento heterocariótico, e em tais casos uma proporção de confídios pode combinar genes de um pai e fatores extracromossômicos de outro. A produção de colônias não parentais por confídios vindos de um heterocário é evidência de herança extracromossômica (ROPER, 1971). A confirmação neste caso poderia ser feita pelas análises genéticas de JINKS (1954; 1958).

Outro fato que merece destaque dentro do item heterocariose diz respeito à autonomia da cor dos confídios. Problemas referentes à autonomia não seriam abordados se não fosse o surgimento de colônias com confídios claros a partir dos isolados dos heterocários. O conceito de genes autônomos e não autônomos originaram de estudos sobre mutantes para cor do olho de *Drosophila melanogaster*. STURTEVANT (1920) citado por STROMNAES e GARBER (1963) relatou o primeiro caso em uma mosca ginnan

dromorfa fêmea que era heterozigota para vermillion, uma mutação ligada ao sexo e que não exibia um olho vermillion na porção macho da cabeça. *PONTECORVO (1946)* explicou a terminologia de autonomia e não autonomia em mutantes para cor de esporos em fungos filamentosos. Em um mutante autônomo, a cor de um conídio uninucleado em um heterocário é determinada exclusivamente pelo genótipo de cada conídio. Em um mutante não autônomo, a cor do conídio é determinada pelo genótipo incluído no heterocário. Em *Aspergillus fumigatus* duas séries de alelos múltiplos para coloração de esporos tem sido encontradas (*STROMNAES e GARBER, 1963*). Em uma série, ambos os mutantes são autônomos e em outra série não autônomos. Autônomo e não autônomo pode ser uma característica de um locus e estar relacionada com o tipo de componente determinado pelo locus em um passo bioquímico que pode ser difusível e não difusível.

5.5. Obtenção de diplóides

O isolamento de diplóides em *Aspergillus* sp foi feito segundo o método descrito por *ROPER (1952)*, onde dois núcleos haplóides que diferem quanto aos seus requisitos nutricionais se fundem ocasionalmente originando um núcleo diplóide heterozigoto. A seleção desses diplóides é simples. Conídios coletados de um heterocário e semeados em alta densidade ($10^6 - 10^7$ /ml) em meio mínimo, permitem o desenvolvimento do diplóide heterozigoto mas não dos haplóides parentais

uma vez que esses são auxotróficos.

Conídios dos heterocários apresentados na Tabela 9, foram coletados e semeados em meio mínimo e em meio completo. A semeadura foi realizada em meio completo para se estimar o número de conídios que estava sendo utilizado no ensaio. Houve crescimento intenso em ambos os meios de modo que não foi possível a obtenção de colônias isoladas, nem mesmo no meio mínimo. A suspensão original de conídios foi então diluída para 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e, cada diluição foi novamente semeada em meio completo e em meio mínimo. Os resultados apresentados na Tabela 11 correspondem às diluições com 10^2 conídios por mililitro. A análise desses dados indica que colônias prototróficas podem ser encontradas entre as colônias escuras já que as colônias que cresceram em meio mínimo eram escuras. Das colônias claras e escuras que cresceram em meio completo (ver Tabela 11) foram colhidos conídios e semeados novamente em meio completo e meio mínimo (Tabela 12). Neste caso os resultados foram semelhantes aos anteriores, isto é, ficou confirmado que entre as colônias escuras, algumas eram prototróficas e que as colônias claras que não cresciam em meio mínimo correspondiam a um dos componentes parentais dos heterocários. Todos os conídios coletados das colônias escuras que cresceram em meio mínimo eram prototróficos e consequentemente possíveis diplóides.

No isolamento de diplóides, os dados sugerem

uma alta frequência de fusão nuclear. Desde que a espécie utilizada é multinucleada a oportunidade de formação de diplóides é aumentada em relação a outras linhagens em heterocários. Esta hipótese foi sugerida por *TINLINE e McNEILL (1969)* quando estudou o problema da fusão nuclear em basidiomicetos dicarióticos. No entanto maior número de diferentes heterocários são necessários para se estimar com segurança a taxa de fusão nuclear em *Aspergillus* sp 321.

Tentativas de identificação dos conídios diplóides através da medida de seus diâmetros falharam (Tabela 18). A análise estatística desses dados (Tabelas 19 e 20) mostrou que somente no caso do diplóide *met A2 ade B1//leu A2* os diplóides apresentaram diâmetros superiores aos haplóides. Convém ressaltar que foram feitas 28 medidas para cada diplóide e seus correspondentes haplóides, e mesmo no caso onde deu diferença significativa entre haplóides e diplóides, (Tabela 20) existem seis casos onde o haplóide apresentou diâmetro superior do diplóide, e três casos onde as medidas foram iguais para ambos. Fica evidente portanto que a medida do diâmetro dos conídios não serve como critério prático de laboratório para diferenciar um haplóide de um diplóide nessa espécie de *Aspergillus*. Quando os conídios das linhagens haplóides e diplóides foram corados com Giemsa e comparados o padrão de seus núcleos por inspeção ao microscópio notou-se que os diplóides apresentavam alta incidência de conídios uninucleados, fato este que os distinguia nitidamente dos haplóides que apresenta-

vam em média 54% de binucleados. O número de núcleos nos conídios passou a ser um excelente critério usado neste trabalho para reconhecimento entre linhagens haplóides e diplóides (Tabela 21).

Baseado nos resultados de coloração de conídios com Giemsa pelo método de *ROBINOW e CATEN (1969)*, modificado por *PAES DE BARROS (1977)* foi constatada a adequação do *Aspergillus* sp 321 para estudos citológicos. Além disso esta linhagem apresenta estruturas morfológicas maiores que as do *A. nidulans* (tomado como padrão) e foi um excelente material em ensaios preliminares de germinação e conidiogênese. Consequentemente a linhagem estudada além de ter demonstrado ser um bom material para estudos genéticos também pode ser explorada para estudos citológicos.

Entre o conteúdo de DNA e citoplasma existe uma proporção que é mantida no estado haplóide ou diplóide nos conídios (*ISHITANI e col. 1956*). Em linhagens de *A. nidulans*, *A. niger* ou *P. chrysogenum* que apresentam conídios uninucleados no estado haplóide a proporção DNA-citoplasma no diplóide é mantida do seguinte modo: o aumento do volume nuclear é compensado pelo aumento da quantidade de citoplasma. Desse modo nota-se um aumento proporcional no tamanho do conídio. Já em espécies como *A. orizae*, *A. sojae* (*IKEDA e col., 1957*), *A. flavus* (*PAPA, 1973*) portadoras de conídios binucleados no estado haplóide, a constante proporção DNA-citoplasma é mantida pela

redução do número de núcleos quando no estado diplóide. Desse modo o tamanho dos confídios haplóides não se diferencia muito daqueles no estado diplóide.

5.6. Segregantes e recombinantes

A haploidização foi conseguida por indução com luz ultra-violeta (Tabela 13), pelo uso de *p*-FA (Tabela 14) e espontaneamente (Tabela 15). Nesses cruzamentos estavam envolvidos dez marcadores nutricionais, porém os três diferentes tipos de diplóides analisados apresentavam um componente haplóide em comum. Desse modo somente seis diferentes marcadores gênicos foram analisados. Devido a esse pequeno número de marcadores dificilmente se poderia detectar ocorrência de ligação, a qual só seria detectada entre genes muito próximo a ponto de impossibilitar entre eles ocorrência de permuta mitótica antes da haploidização. Apesar dessas observações os resultados da haploidização com uso da *p*-FA (Tabela 14) sugerem que o locus *met A2* está ligado com o locus *ade B1*. Dos 34 setores haplóides identificados entre o diplóide *met A2 ade B1//leu A2*, 30 foram *met A2 ade B1* e três foram selvagens para ambos. Somente em um caso apareceu *met A2* individual indicando quebra da ligação. Possivelmente neste caso ocorreu permuta mitótica entre *met A2* e *ade B1*.

Para provar a existência de ligação entre os

loci referidos, uma linhagem *met A2* + deveria ser cruzada com uma outra linhagem + *ade B1*. Neste caso a ligação seria confirmada se entre os segregantes haplóides raramente fossem encontrados um recombinante *met A2 ade B1*.

A Tabela 16 apresenta os marcadores obtidos quando se tratou diplóides com luz ultra-violeta. Neste caso não houve haploidização, porém apareceram alguns marcadores presentes nas linhagens parentais. Esses resultados indicam a ocorrência de permuta mitótica induzida por luz ultra-violeta. Quando esses diplóides foram tratados com pFA para isolamento de setores haplóides revelaram os outros marcadores parentais que estavam no estado heterozigoto. Esses resultados confirmaram que em alguns casos (Tabela 16) a luz ultra-violeta não induziu haploidização mas somente permuta mitótica. Portanto no caso do diplóide *met A2 ade B1//leu A2* (Tabela 16), o setor obtido deficiente em metionina sugere que como *met A2* e *ade B1* estão localizados no mesmo grupo de ligação (Tabela 14), *met A2* deve estar em posição distal em relação ao marcador *ade B1*. No entanto não deve ser descartada a possibilidade de que alguns dos marcadores apresentados na Tabela 16 são oriundos de novas mutações. Isto porque a dose de ultra-violeta neste caso foi a mesma daquela usada para obtenção de mutantes. A ocorrência deste evento é baixa porque para que uma mutação se manifeste no estado diplóide é preciso que seja dominante (e as mutações auxotróficas geralmente são recessivas) ou que ambos os complementos cromossô-

micos sejam atingidos pelo mutagênico (fato este usualmente raro com luz ultra-violeta). Deve ser notado contudo que na Tabela 13 durante a haploidização com luz ultra-violeta apareceu um marcador adenina que não estava entre os componentes parentais.

6. CONCLUSÕES

Com base nos fatos observados e discutidos, as seguintes conclusões podem ser tiradas:

1) Com auxílio da luz ultra-violeta foram isolados mutantes morfológicos e auxotróficos (aminoácidos, vitaminas e adenina) nas frequências de 31% e 0,69%, respectivamente.

2) Ficou demonstrado o ciclo parassexual em mais uma espécie do gênero *Aspergillus*. Nessa espécie ocorreram todas as etapas do ciclo: fusão de núcleos em heterocáris dando diplóides, permuta mitótica e haploidização.

3) O número de núcleos nos conídios foi um excelente critério para diferenciar linhagens haplóides de diplóides. As linhagens diplóides apresentam metade do número de núcleos das linhagens haplóides.

4) A espécie estudada apresenta no mínimo cin-

co grupos de ligação. Possivelmente em um desses grupos o marcador *met* A2 está ligado na posição distal ao marcador *ade* B1.

5) A linhagem de *Aspergillus* sp 321 se constitui em um excelente material para estudos de Genética e Citologia.

SUMMARY

The present research was carried out with the aim of showing the occurrence of the parasexual cycle in a species of the genus *Aspergillus* not yet studied from this point of view.

Double auxotrophic mutants were isolated after treatment by ultra-violet light. These mutant strains were used to build balanced heterokaryons. From the heterokaryons, heterozygous diploids were obtained; such diploids produced haploid segregant sectors spontaneously, after treatment by ultra-violet light or selected by *p*-fluorophenylalanine. Diploid segregant sectors were also observed after treatment of diploid original strains by ultra-violet light which is an indication of mitotic crossing-over occurrence. Diploid strains were easily identified by the presence of half of the number of conidia nuclei found in haploid strains.

After analysis of haploid and diploid segregants

from diploid original strains it was shown that probably two genetic markers (*ade B1* and *met A2*) were linked being *met A2* distal in relation to *ade B1* in the same linkage group. The other markers analysed located each one in different linkage groups. It can be concluded then that the studied species presents at least five different linkage groups.

7. LITERATURA CITADA

ALMEIDA, L.M., 1976. Obtenção de linhagens com duplicações cromossômicas em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter e sua instabilidade. Piracicaba, ESALQ/USP, 122p. (Tese de Mestrado).

ANNÉ, J. e J.F. PEBERDY, 1976. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. *Journal of General Microbiology*, 92:413-417.

ATWOOD, K.C., A. NORMAN, 1949. On the interpretation of multihit survival curves. *Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America*, 35:696-709.

AVERY, O.T., C.M. MACLEOD e M. MCCARTY, 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine*, 79:137-158.

- AZEVEDO, J.L., 1971. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. Scheffield, University of Scheffield, England, 240 p. {Ph. D. Thesis}.
- AZEVEDO, J.L., 1972. O ciclo parassexual em fungos. *Revista de Microbiologia*, 3:157-168.
- AZEVEDO, J.L., 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, 2:3-15.
- AZEVEDO, J.L., A. OLIVEIRA e A.J. ROCHA CAMPOS, 1976. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. *Summa Phytopathologica*, 2:237-241.
- BALL, C., 1971. Haploidization analysis in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of General Microbiology*, 66:63-69.
- 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.
- BEADLE, G.W. e E.L. TATUM, 1941. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 27:499-506.

- BERTOLDI, M. e C.E. CATEN, 1975. Isolation and haploidization of heterozygous diploid strains in a species of *Humicola*. *Journal of General Microbiology*, 91:63-73.
- BINDING, H. e H.J. WEBER, 1974. The isolation, regeneration and fusion of *Phycomyces* protoplasts. *Molecular and General Genetics*, 135:273-276.
- BURNETT, J.H., 1975. *Mycogenetics*. London, John Wiley and Sons. 375p.
- BURNS, J.A. e D.U. GERSTEL, 1967. Flower color variegation and instability of a block of heterochromatin in *Nicotiana*. *Genetics*, 57:155-167.
- BUXTON, E.W., 1956. Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Journal of General Microbiology*, 15:133-139.
- BUXTON, E.W., 1962. Parasexual recombination in the banana-milt *Fusarium*. *Transactions of the British Mycological Society*, 45:274-279.
- CATEN, C.E. e J.L. JINKS, 1966. Heterokaryosis: Its significance in mild homothallic ascomycetes and fungi imperfecti. *Transactions of the British Mycological Society*, 49:81-93.

CLUTTERBUCK, A.J., 1968. Gene symbols and nomenclature:
Proposals and notes on them. *Aspergillus Newsletter*,
9:26-29.

CLUTTERBUCK, A.J., 1974. *Aspergillus nidulans*. In: King, R.C.,
ed. *Handbook of Genetics*. New York and London, Plenum
Press, I:447-510.

DAVIS, R.H., 1966. Mechanisms of inheritance. 2- Heterokaryosis.
In: Ainsworth, G.C. e A.S. Sussman, ed. *The Fungi*, II.
New York, Academic Press, 805p.

DAY, A.W. e J.K. JONES, 1969. Sexual and parasexual analysis
in *Ustilago violacea*. *Genetical Research*, 11:63-81.

DEMEREK, M., E.A. ADELBERG, J.A. CLARK e P.E. HARTMAN, 1966.
A proposal for a uniform nomenclature in bacterial
genetics. *Genetics*, 54:61-76.

DUTTA, S.K. e E.D. GARBER, 1960. Genetics of phytopathogenic
fungi. III. An attempt to demonstrate the parasexual
cycle in *Colletotrichum lagenarium*. *Botanical Gazette*,
122:118-121.

ESSER, K. e R. KUENEN, 1967. *Genetics of Fungi*. New York,
Springer Verlag. 499p.

- FERENCZY, L., F. KEVEI e M. SZEGEDI, 1975. Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *Experientia*, 31:50-52.
- FERENCZY, L., F. KEVEI e J. ZSOLT, 1974. Fusion of fungal protoplasts. *Nature*, London, 248:793-794.
- FINCHAN, J.R.S. e P.R. DAY, 1971. *Fungal Genetics*. Oxford, Blackwell Sci. Publ. 404p.
- FORBES, E., 1959. Use of mitotic segregation for assigning genes to linkage groups in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 13:67-80.
- GARBER, G.W. e L. BERAHA, 1965. Genetics of phytopathogenic fungi XIV. The parasexual cycle in *Penicillium expansum*. *Genetics*, 52:487-492.
- GRIGG, G.W., 1952. Back mutation assay method in microorganisms. *Nature*, London, 169:98-100.
- HARRIS, H., 1970. *Cell fusion*. Cambridge, Harvard University Press.
- HASTIE, A.C., 1964. The parasexual cycle in *Verticillium albo-atrum*. *Genetical Research*, 5:305-315.

- HOLLIDAY, R., 1961. Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genetical Research*, 2:231-249.
- IKEDA, Y., K. NAKAMURA, K. UCHIDA e G. ISHITANI, 1957. Two attempts upon improving an industrial strain of *Aspergillus oryzae* through somatic recombination and polyploidization. *Journal of General and Applied Microbiology*, 3:93-101.
- ISHITANI, G. e K. SAKAGUCHI, 1956. Hereditary variation and genetic recombination in koji-moulds (*Aspergillus oryzae* and *A. sojae*). V. Heterocaryosis. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2:345-400.
- ISHITANI, G., K. UCHIDA e Y. IKEDA, 1956. The relation of DNA content to cell size in *Aspergillus*. *Experimental Cell Research*, 10:737-740.
- JINKS, J.L., 1952. Heterokaryosis: A system of adaptation in mild fungi. *Proceedings of the Royal Society of Biology*, 140:83-106.
- JINKS, J.L., 1954. Somatic selection in fungi. *Nature*, London, 174:409-410.
- JINKS, J.L., 1958. Cytoplasmic differentiation in fungi. *Proceedings of the Royal Society of London. Ser. B. Biology Science*, 148:314-321.

- KAFER, E., 1958. An 8-chromossome map of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 9:105-145.
- KAFER, E., 1960. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London, 186:619-620.
- KAFER, E., 1961. The process of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46:1581-1609.
- KAFER, E., 1968. Effects of ultraviolet irradiation on heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. II. Recovery from UV - induced mutation in mitotic recombinant sectors. *Genetics*, 63:821-841.
- LEA, D.E., 1956. The target theory. In: *Actions of radiations on living cells*. Cambridge, University Press, 416p.
- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with p-fluorfenilalanine. *Nature*, London, 190:744.
- LHOAS, P., 1967. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in *Aspergillus niger*. *Genetical Research*, 10:45-61.

- MACDONALD, K.D., 1976. 2nd International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. New York, Academic Press. 636p.
- MCCLINTOCK, B., 1951. Chromosome organization and genetic expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 16:13-47.
- MCCLINTOCK, B., 1956. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 16:13-47.
- MCCULLY, K.S. e E. FORBES, 1965. The use of p-fluorfenilalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research*, 6:352-359.
- MENEZES, E.M., 1974. Análise genética de variantes deteriorados e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP. 114p. (Tese de Mestrado)
- MESSIAS, C.L., 1977. Parassexualidade e produção de Aflatoxina em *Aspergillus flavus*, Link. Piracicaba, ESALQ/USP. 75p. (Tese de Mestrado).
- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregation induced by p-fluorfenilalanine. *Aspergillus Newsletter*, 2:10.

- NUESCH, J., H.J. TREICHLER e M. LIERSCH, 1973. The biosynthesis of cephalosporin C. In: Vanek, Z., Z. Hostalek and J. Cudlin, ed. *Genetics of Industrial Microorganisms*. Amsterdam, London and New York, Elsevier, 2:309-334.
- PAES DE BARROS, J., 1977. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP. 81p. (Tese de Mestrado).
- PAPA, K.E., 1973. The parasexual cycle in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 65:1201-1205.
- PAPA, K.E., 1976. Linkage groups in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 68:159-165.
- PARIS, S., 1977. Heterokaryosis in *Beauveria tenella*. *Mycopathologia*, 61:67-76.
- PIMENTEL GOMES, F., 1973. *Curso de estatística experimental*. 5ª imp., São Paulo, Livraria Nobel S/A. 430p.
- PIZZIRANI, A.A., 1977. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP, 111p. (Tese de Mestrado).
- PONTECORVO, G., 1946. Genetic systems based on heterocaryosis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 11:193-201.

PONTECORVO, G., 1956. The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology*, 10:393-400.

PONTECORVO, G., 1962. Methods of microbial genetics in an approach to human genetics. *British Medical Bulletin*, 18:81-84.

PONTECORVO, G., 1963. Microbial genetics: retrospect and prospect. *Proceedings of the Royal Society of Biology*, 158:123-146.

PONTECORVO, G. e E. KAUFER, 1958. Genetic analysis by means of mitotic recombination. *Advances in Genetics*, 9:71-104.

PONTECORVO, G. e J.A. ROPER, 1952. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 6:vii.

PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONS, K.D. McDONALD e A.W.J. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.

PONTECORVO, G. e G. SERMONTI, 1954. Recombination without sexual reproduction in *Penicillium chrysogenum*. *Nature*, London, 172:126.

PONTECORVO, G., E. TARR-GLOOR e E. FORBES, 1954. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Genetics*, 52:226-237.

- ROBERTS, C.F., 1963. The genetic analysis of carbohydrate utilization in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 31:45-58.
- ROBINOV, C.F. e C.E. CATEN, 1969. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science*, 5:403-431.
- ROPER, J.A., 1950. Back-mutation in *Aspergillus nidulans*. *Microbial Genetics Bulletin*, 3:7-8.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous 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: G.C. Ainsworth e A.S. Sussman, 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.
- SERMONTI, G., 1956. Complementary genes which affect penicillin yields. *Journal of General Microbiology*, 15:599-608.

- SERMONTI, G., 1959. Genetics of penicillin production.
Annals of the New York Academy of Sciences, 8:950-966.
- SERMONTI, G., 1969. *Genetics of antibiotic producing microorganisms*. London, Wily Inter-Science. 389p.
- SNEDECOR, G.W. e W.G. COCHRAN, 1972. *Statistical methods*. 6a. ed., Ames, The Iowa State University Press. 593p.
- SOUZA, D.R.N., 1978. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans* (no prelo).
- STERN, C., 1936. Somatic crossing-over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 21:625-730.
- STROMNAES, O. e E.D. GARBER, 1963. Heterocaryosis and the parasexual cycle in *Aspergillus fumigatus*. *Genetics*, 48:653-662.
- TINLINE, R.D., 1961. *Cochliobolus sativus*. IV. Drug-resistance, color and nutritionally exacting mutants. *Canadian Journal of Botany*, 39:1695-1704.
- TINLINE, R.D., 1962. *Cochliobolus sativus*. V. Heterokaryosis and parasexuality. *Canadian Journal of Botany*, 40:425-437.
- TINLINE, R.D. e B.H. MCNEILL, 1969. Parasexuality in plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 7:147-170.

YURCHENKO, C.V., I.A. ZAKHAROV e M.M. LEVITIN, 1974. Genetics and selection of *Beauveria bassiana* and entomopathogenic fungus. III. Studies of heterocariosis. *Genetika*, 10: 95-101.

WEBSTER, R.K., 1974. Recent advances in the genetics of plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 12: 331-353.

WRIGHT, D.M., K.L. WILLIAMS e P.C. NEWELL, 1977. Ethidium bromide resistance: A selective marker located on linkage group IV of *Dictyostelium discoideum*. *Journal of General Microbiology*, 102: 423-426.

ZINDER, N.D. e J. LEDERBERG, 1952. Genetical exchange in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 64: 679-697.