**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SETORES
DETERIORADOS DA LINHAGEM Abnc DE *Aspergillus nidulans***

RENATA CASTIGLIONI PASCON

-Bióloga-

ORIENTADORA: Prof. Dra. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1994

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS "LUIZ DE QUEIROZ"/USP

Pascon, Renata Castiglioni
P2811 Isolamento e caracterização de setores deteriorados da linhagem Abnc de
Aspergillus nidulans. Piracicaba, 1994.
123p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Aspergilo - Caracterização 2. Aspergilo - Citogenética 3. Aspergilo -
Isolamento 4. Aspergilo - Linhagem 1. Escola Superior de Agricultura Luiz de
Queiroz. Piracicaba

CDD 589.24

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SETORES DETERIORADOS DA
LINHAGEM Abnc DE *Aspergillus nidulans*

RENATA CASTIGLIONI PASCON

Aprovada em 19 de Dezembro de 1994

Comissão julgadora:

Prof. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner	ESALQ/USP
Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
Prof. Dra. Marisa Vieira de Queiróz	ESALQ/USP

Prof. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

Orientadora

À MEMÓRIA DE GERALDO PASCON,

OFEREÇO

À DAYSE CASTIGLIONI PASCON E LUCIANO CASTIGLIONI PASCON,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Prof. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner, pela orientação, amizade e confiança.
- Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pelo auxílio na discussão dos dados e sugestões.
- Prof. Dr. Cláudio Costa, por ter iniciado minha formação.
- Prof. Sílvia Maria Guerra Molina, pelas facilidades concedidas em seu laboratório.
- Funcionários, José Antônio da Silva e Célia Regina Pontin, pelo auxílio durante a execução da parte experimental.
- Todos os funcionários e colegas do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas e do Laboratório de Genética de Microrganismos.
- Família Costa, pelas muitas acolhidas.
- Adriana Cristina Longo e Pedro Augusto Della Coletta, por terem sido a minha família em Piracicaba.

- A Mônica Rosa Bertão, Sônia Reis Lopes Shikida e Peri Francisco Assis Shikida, pela grande amizade
- Ao Marcelo Afonso Vallim pelo apoio constante.
- Aos meus amigos: Marisa Vieira de Queiróz, João Alencar Pamphile e Gilda Santos Müllen
- CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	xi
Resumo.....	xiii
Summary.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Introdução.....	4
2.2. O fungo <i>Aspergillus nidulans</i>	5
2.3. Instabilidade Genética.....	6
2.3.1. As Aberrações Cromossômicas como causa da Instabilidade do Genoma.....	6
2.3.2. Fatores que afetam a Instabilidade Genética.....	9
2.3.3. Os Elementos Genéticos Móveis e a Instabilidade Genética.....	11
2.4. Ciclo Celular e Divisão Mitótica em <i>Aspergillus</i> <i>nidulans</i>	14
2.4.1. O Estudo da Biologia do Ciclo Celular através dos Mutantes de <i>A. nidulans</i>	15
2.5. Desenvolvimento e Diferenciação em <i>A. nidulans</i>	19

2.5.1. Ciclo assexual e morfologia das estruturas vegetativas.....	19
2.5.2. Aquisição de competência para o desenvolvimento.....	24
2.5.3. Ciclo sexual e estrutura relacionadas.....	25
2.5.4. Regulação gênica do desenvolvimento em <i>A. nidulans</i>	27
2.5.5. Interação entre os genes do grupo "Bristle".....	36
2.5.6. O grupo "Stunted".....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1. Linhagens utilizadas:.....	40
3.2. Meios de Cultura e Soluções.....	45
3.2.1. Meio Mínimo (PONTECORVO <i>et. al.</i> , 1953).....	45
3.2.2. Meio Completo Modificado (AZEVEDO e COSTA, 1973).....	46
3.2.3. Meio Mínimo acrescido de Galactose (ROBERTS, 1959).....	46
3.2.4. Meio Mínimo de Acetato de Amônio (APIRION, 1962).....	46
3.2.5. Meio Completo Líquido.....	47
3.2.6. Meio Mínimo líquido mais 2% de meio completo (PONTECORVO <i>et. al.</i> , 1953).....	47
3.2.7. Meio de Indução de Ascosporogênese (ACHA & VILLANUEVA, 1961).....	47
3.2.8. Solução Salina.....	47

3.2.8. Solução Salina.....	47
3.2.9. Solução de Tween 80.....	48
3.2.10. Solução de Vitaminas.....	48
3.2.11. Solução de Benlate (metil-butil-carbamoil-2- benzimidazol carbamato) (HASTIE, 1970).....	48
3.2.12. Solução de p-fluorfenilalanina (pFA) 1%.....	48
3.2.13. Tampão Fosfato 0,2 M pH 7,0.....	49
3.2.14. Tampão Fosfato 0,2 M pH 5,8.....	49
3.2.15. Solução de HCl 1N.....	49
3.2.16. Solução de Giemsa.....	49
3.2.17. Solução de KCl 0,6 M.....	50
3.2.18. Tampão NDS.....	50
3.2.19. Solução de EDTA 50 mM.....	50
3.2.20. Tampão de Corrida TBE 5 x.....	50
3.2.21. Solução de Fixação.....	51
3.2.22. Solução estoque de requisitos nutricionais.....	51
3.3. Técnicas de análise genética	52
3.3.1. Isolamento dos setores deteriorados da linhagem Abnc.....	52
3.3.2. Obtenção de heterocário.....	52
3.3.3. Isolamento de Diplóides (ROPER, 1952).....	53
3.3.4. Análise Mitótica via Ciclo Parassexual.....	54
3.3.5. Análise Meiótica via Ciclo Sexual (PONTECORVO <i>et. al.</i> , 1953).....	55
3.4. Conidiogênese.....	56

3.6. Obtenção de Protoplastos.....	58
3.7. Inclusão dos Protoplastos em Agarose LGT.....	59
3.8. Preparo do Gel de Agarose para Eletroforese em Campo Pulsado.....	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1. Construção e Caracterização da Linhagem Abnc.....	61
4.1.1. Porcentagem de Conídios Bi e Trinucleados da Linhagem Abnc.....	61
4.1.2. Análise Mitótica e Meiótica.....	62
4.2. Isolamento e Caracterização Morfológica dos Setores Deteriorados.....	66
4.3. Cariótipo Eletroforético dos Variantes Deteriorados.....	75
4.4. Análise Genética.....	77
4.4.1. Formação de Heterocário e Obtenção de Colônias Diplóides.....	77
4.4.2. Haploidização.....	77
4.4.3. Análise Mitótica.....	79
4.4.4. Análise Genética pelo Ciclo Sexual.....	84
4.4.5. Análise Genética do Variante VB6.....	87
4.5. Análise citológica.....	91
4.5.1. Avaliação Citológica das Linhagens MSEbnc e Abnc.....	93
4.5.2. Avaliação Citológica do Variante VB1.....	100
4.5.3. Avaliação Citológica do Variante VB2.....	101

4.5.4. Avaliação Citológica dos Variantes VB3, VB4 e VB5.....	102
4.5.5. Avaliação Citológica do Variante VB6.....	102
5. CONCLUSÕES.....	111
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113

LISTA DE FIGURAS

1. Mapa de ligação e marcadores genéticos da linhagem A.....	41
2. Mapa ligação e marcadores genéticos da linhagem MSE.....	42
3. Mapa de ligação e marcadores genéticos da linhagem Abnc.....	43
4. Mapa de ligação e marcadores genéticos da linhagem MSEbnc.....	44
5. Mapa de ligação e marcadores genéticos da linhagem PPY.....	45
6. a) Variantes deteriorados provenientes da linhagem Abnc crescidos à 37°C por 8 dias. b) cadeias de conídios uninucleados e binucleados da linhagem Abnc.....	71
7. Separação de cromossomos em eletroforese em campo pulsado. c) controle, MSEbnc. A numeração de 1 a 6 corresponde aos variantes deteriorados VB1, VB2, VB3, VB4, VB5, VB6 respectivamente. A numeração a esquerda representa os cromossomos, e a direita o tamanho em mega- bases.....	76
8. Linhagens controle. a) PPY linhagem controle, aumento de 176 vezes 38 horas; b) linhagem MSE, 38 horas; c) linhagem A, 38 horas ; d), e) linhagem MSEbnc, mostrando as fiálides septadas e compartimentos com 2 e 3 núcleos, 48 horas; f) linhagem Abnc com o mesmo padrão de desorganização dos esterígmas, fiálides multinucleadas e septadas, 48 horas. Aumento de 1400 vezes.....	99

9. Variante deteriorado VB1. a) micélio e vesículas em início de formação, 20 horas; b) vesícula madura e primórdios de métulas, 30 horas; c) conidióforo maduro com 48 horas de crescimento; d) conidióforo maduro com 48 horas, conídios binucleados, núcleo em migração. Aumento de 1400 vezes.....	105
10. Variante deteriorado VB2. a) hifa com célula-pé gerando o início de uma haste.(26 horas); b) vesícula com métulas imaturas e núcleos em migração (28 horas); c) conidióforo anormal, métulas e fiálides maduras, início da formação de conídios (48 horas); d) conidióforo com dois estríngmas apenas, início da formação de conídios (48 horas); e) conióforos maduros com 50 horas de crescimento; f) conidióforo maduro em Meio Completo mais KCl 0,6 M, conídios bi e trinucleados. Aumento de 1400 vezes.....	106
11.Variante deteriorado VB3. a) e c) conidióforos maduros com 48 horas de crescimento; b) conidióforo maduro com 38 horas de crescimento em Meio Completo mais 0,6M de KCl. Aumento de 1400 vezes.....	107
12. Variante deteriorado VB4. a) hifa com vesícula na extremidade, 20 horas de crescimento; b) conidióforos maduros em Meio Completo mais KCl 0,6M (48 horas); c) vesícula com métulas imaturas (24 horas); d) conidióforo maduro (48 horas). Aumento de 1400 vezes.....	108
13. Variante deteriorado VB5. a) conidióforos maduros crescidos em Meio Completo mais KCl 0,6M (38 horas); b e c) conidióforos maduros (48 horas), fiálides septadas binucleadas e conídios binucleados em formação. Aumento de 1400 vezes.....	109
14. Variante deteriorado VB6. a) hifa e vesícula (24 horas); b) formação das métulas e fiálides com núcleos em posição apical (38 horas); c e d) métulas e fiálides maduras com conídios binucleados formados (48 horas); e) conidióforo com 50 horas. Aumento de 1400 vezes.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados dos variantes deteriorados binucleados.....	62
Tabela 2. Análise mitótica do cruzamento Abnc x MSE.....	64
Tabela 3. Análise meiótica do cruzamento Abnc x MSE.....	65
Tabela 4. Auxonografia da linhagem Abnc e dos variantes deteriorados binucleados.....	69
Tabela 5. Medida do diâmetro (em μm) dos conídios uni e binucleados.....	70
Tabela 6. Número, frequência e tipos de setores emitidos pelas linhagens Abnc e A.....	72
Tabela 7. Descrição morfológica dos variantes deteriorados isolados.....	73
Tabela 8. Quantificação da esporulação das linhagens MSEbnc, Abnc, A, MSE e dos variantes deteriorados originários da linhagem Abnc.....	74
Tabela 9. Análise mitótica do cruzamento VB6 x MSE.....	81
Tabela 10. Localização dos determinantes genéticos de deterioração nos grupos de ligação, e número de colônias analisadas.....	82
Tabela 11- Análise mitótica dos segregantes VB1, VB2, VB3, VB4 VB5.....	83
Tabela 12. Porcentagem de cleistotécios viáveis e abortivos dos variantes VB1, VB2, VB3, VB4, VB5, VB6.....	86

Tabela 13. Análise meiótica do cruzamento entre VB6 X MSE.....	88
Tabela 14. Teste de 3 pontos envolvendo marcadores do cromossomo I (proA1 pabaA6 e det. VB6). Cruzamento entre variante VB6 x MSE.....	89

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SETORES DETERIORADOS DA LINHAGEM *Abnc* DE *Aspergillus nidulans*

Autora: Renata Castiglioni Pascon

Orientadora: Aline A. Pizzirani-Kleiner

RESUMO

O fungo *Aspergillus nidulans* tem se mostrado um excelente organismo para os estudos de Genética, tanto clássica quanto molecular, graças a um grande número de mutantes, e à facilidade de manipulação do material genético. Neste trabalho foi utilizada a linhagem *Abnc* de *A. nidulans*. Esta linhagem possui um segmento do cromossomo I duplicado e translocado para o cromossomo II, que é responsável por uma grande instabilidade mitótica, detectada na forma de setores melhorados, deteriorados e heterocarióticos. Além disso, esta linhagem é portadora de uma mutação, *bncA1*, que causa a formação de conídios bi e trinucleados em uma frequência mais elevada do que nas linhagens selvagens. O objetivo deste estudo foi analisar genética e citologicamente o comportamento dos setores deteriorados provenientes da linhagem *Abnc*. O ciclo sexual não pode ser conduzido devido à alta taxa de corpos de frutificação abortivos. As análises citológicas por meio de conidiogênese e coloração de núcleos pela técnica de Giemsa possibilitaram a detecção de morfologia característica determinada pela mutação *bncA1*, e algumas variações morfológicas provavelmente induzidas pela presença do determinante de deterioração.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DETERIORATED SECTORS OF *Abnc* STRAIN OF *Aspergillus nidulans*

Author: Renata Castiglioni Pascon

Adviser: Aline A. Pizzirani-Kleiner

SUMMARY

The filamentous fungi *Aspergillus nidulans* has been considered an excellent standard organism to both, classical and molecular genetic studies, due to a great number of mutants and to its easy genetic manipulation. In this work a strain called *Abnc* was used. It holds a duplicated segment of chromosome I translocated to chromosome II, which leads to mitotic instability, causing 3 types of sectors to appear: improved, deteriorated and heterokariotic. Besides this duplication, the strain carries a mutation, *bncA1* responsible for bi and trinucleated conidia formation. The goals of this work was to analyse deteriorated sectors coming from *Abnc* strain, by means of classical genetics and cytology. Sexual cycle could not be conducted since a high degree of cleistotecia abortion was observed. Cytological analysis using conidiogenesis and nuclear staining with Giemsa have enable to detect morphological alterations due to *bncA1* mutation and some morphological alterations caused by deterioration.

1. INTRODUÇÃO

O fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* começou a ser estudado por Pontecorvo no final dos anos 40, quando este procurava o organismo ideal para estudar as interrelações entre genes e metabolismo celular. As razões de sua escolha foram as grandes vantagens que apresenta, as quais o tornaram um microrganismo modelo para a pesquisa na área de Genética, sendo até hoje de vasta utilização. É um organismo eucarioto, haplóide, forma colônias rapidamente em meio de cultura definido, produz esporos assexuais uninucleados esporos sexuais binucleados, e é homotático (CLUTTERBUCK, 1974).

Trabalhos em diversas áreas vem sendo realizados com *A. nidulans*. Desde obtenção de mutantes, mapeamento genético utilizando técnicas clássicas e moleculares, instabilidade mitótica e meiótica, transformação, clonagem, estudos de metabolismo celular, desenvolvimento e diferenciação e regulação de ciclo celular.

O estudo da instabilidade mitótica teve início com a descrição da linhagem A (BAINBRIDGE & ROPER, 1966). Entre outras linhagens com aberrações cromossômicas, esta possui um segmento do cromossomo I duplicado e translocado para o cromossomo II, o qual é a causa da

instabilidade mitótica que se expressa na forma de setores de 3 tipos: melhorados, originários da perda da duplicação, deteriorados, produto de novas duplicações, provavelmente em tandem, e heterocarióticos, os quais compreendem uma mistura de dois tipos de núcleos, sendo que um deles provavelmente é letal devido a perda de uma parte grande da duplicação, levando desta forma a manutenção do estado heterocário.

Vários fatores causam o aumento ou a diminuição da instabilidade mitótica da linhagem A, entre eles um mutante isolado por PIZZIRANI-KLEINER & AZEVEDO (1986b) que funciona como um estabilizador parcial da linhagem A, diminuindo a emissão de setores. Este mutante denominado *bncA1* confere um fenótipo bastante interessante às linhagens que o carregam, pois estas passam a produzir conídios bi e trinucleados com uma determinada frequência.

O objetivo do presente trabalho foi transferir o gene *bncA* para a linhagem A duplicada e analisar do ponto de vista genético e citológico os setores deteriorados produzidos pela linhagem resultante (Abnc), estabelecendo assim as relações entre o caráter deteriorado e o gene *bncA*. Para alcançar tal objetivo este trabalho foi subdividido em etapas que compreenderam:

- construção e caracterização genética da linhagem Abnc.
- isolamento de setores deteriorados característicos e estáveis.
- análise genética e mapeamento dos determinantes de deterioração dos 6 variantes deteriorados isolados.

- análise citológica das linhagens MSEbnc, Abnc e dos 6 variantes deteriorados pela técnica de conidiogênese, usando dois meios de cultura diferentes: Meio Completo e Meio Completo suplementado de KCl 0,6M.
- eletroforese em campo pulsado de 6 variantes deteriorados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Introdução

A Revisão de Literatura apresentada para substanciar o assunto abordado neste trabalho enfocou os seguintes tópicos: o primeiro ítem fornece uma breve descrição do microrganismo ***A. nidulans*** que é usado como modelo biológico na condução deste trabalho; a questão das alterações cromossômicas, relacionando-as ao fenômeno da instabilidade mitótica; os avanços no estudo da genética do ciclo celular, mais especificamente no que se refere ao ciclo mitótico; e finalmente esta Revisão de Literatura tratou do estudo do desenvolvimento e diferenciação em ***A. nidulans***, procurando ressaltar os trabalhos mais recentes que tem sido feitos a partir dos mutantes isolados no final dos anos 60 (CLUTTERBUCK, 1969), os quais possibilitaram o grande progresso alcançado nos últimos 15 anos, bem como da importância do estudo do desenvolvimento neste microrganismo.

2.2. O fungo ***A. nidulans***

O fungo ***A. nidulans*** foi primeiramente descrito por Eidam em 1883, porém só foi reconhecido como um microrganismo importante para os estudos de Genética a partir dos trabalhos realizados na década de 50 (PONTECORVO *et al.*, 1953, 1954). Desde então muitos estudos de caráter acadêmico e também aplicado tem sido realizados utilizando este fungo como modelo biológico.

Quanto às suas características gerais, é classificado como um Ascomyceto filamentoso, eucarioto que apresenta tanto o ciclo sexual quanto o ciclo parassexual (PONTECORVO *et al.*, 1953). É um microrganismo haplóide que produz conídios uninucleados pelo ciclo de vida assexual, e ascósporos binucleados pelo ciclo sexual; sendo também homotático (CLUTTERBUCK, 1974). É de fácil cultivo, desenvolvendo-se em meio de cultura definido (AZEVEDO & COSTA, 1973), e a temperatura ideal de crescimento é de 37°C.

O estudo de Genética em ***A. nidulans*** se faz especialmente importante devido à uma gama enorme de mutantes para diversos tipos de marcadores, como por exemplo marcadores auxotróficos, resistência à drogas, marcadores para fontes de carbono e nitrogênio.

A descrição dos ciclos de vida do fungo será feita no decorrer desta revisão.

2.3. Instabilidade Genética

2.3.1. As aberrações cromossômicas como causa da instabilidade do genoma

As aberrações cromossômicas do tipo estrutural são causadoras de instabilidade do genoma. Traduz-se por instabilidade todo tipo de alteração que leva à rearranjos do material genético ao nível dos cromossomos e consequentemente ao nível do DNA. Embora as aberrações numéricas sejam muito frequentes e causem inúmeras alterações fenotípicas, não serão abordadas aqui. Geralmente as aberrações estruturais estão relacionadas à excesso de material genético e elementos citoplasmáticos (ARLETT *et. al.*, 1962; JINKS, 1954). Os principais tipos de aberrações estruturais são: as translocações, duplicações, inversões e as deleções. Em fungos a visualização das aberrações cromossômicas por meio de técnicas que envolvem preparações citológicas é inviável devido ao pequeno tamanho dos cromossomos, portanto o emprego de técnicas de Genética Clássica e Molecular faz-se necessário para a detecção deste tipo de fenômeno. Estas anormalidades do material genético podem aparecer espontaneamente devido à possíveis imperfeições do mecanismo replicativo dos cromossomos, ou as aberrações podem ser induzidas por determinados agentes, como por exemplo, agentes químicos e físicos como as radiações ionizantes, especialmente raio X, os quais danificam grandes extensões do material genético (SWANSON, 1981).

Linhagens de *A. nidulans* com aberrações do tipo duplicação e translocação de segmentos cromossômicos foram descritas como sendo portadoras de instabilidade mitótica, gerando variantes morfológicos com diferentes características, como alteração da pigmentação, variabilidade no padrão de crescimento e frequência de reversão. NGA & ROPER (1968) descreveram uma linhagem com um segmento do cromossomo I duplicado e translocado para o cromossomo II que apresentava alta instabilidade mitótica, produzindo três tipos de setores: melhorados, deteriorados e heterocarióticos.

As linhagens duplicadas possuem uma morfologia característica chamada "crinkled". As colônias com este fenótipo crescem enrugadas, formando uma superfície em relevo sobre o meio de cultura, além disso as colônias provenientes de linhagens com duplicação tem crescimento reduzido e produzem setores que possuem diferentes gradações de fenótipo, no que diz respeito à coloração (BAINBRIDGE & ROPER, 1966).

Os variantes fenotípicos da linhagem com duplicação tem origem a partir de núcleos que sofreram perda de partes variáveis do segmento duplicado, ou mesmo deleção de toda a duplicação. Os variantes oriundos deste processo de perda da duplicação foram denominados de variantes fenotípicos melhorados, uma vez que quando perdem a duplicação ganham maior vigor de crescimento. NGA & ROPER, (1968) propuseram dois possíveis mecanismos para explicar o surgimento das perdas. O primeiro envolvia troca desigual entre cromátides-irmãs, e o segundo a ocorrência de uma permuta dentro de uma alça intracromossômica.

Para melhor avaliar a instabilidade intracromossômica de linhagens duplicadas, NGA & ROPER (1969) estudaram 3 linhagens diferentes

portadoras de duplicação. Três importantes conclusões surgiram deste trabalho: a primeira delas é que a ocorrência dos variantes fenotípicos é uma propriedade destas linhagens; em segundo lugar que a instabilidade mitótica é provocada por um desequilíbrio do material cromossômico; e finalmente que as alterações genotípicas estão confinadas àqueles segmentos que provocam a instabilidade, isto é, ao segmento envolvido com a duplicação. Estes dois autores propuseram o termo "não-conformidade mitótica" para melhor caracterizar este fenômeno de instabilidade.

AZEVEDO & ROPER (1970) estudando a linhagem A, portadora de duplicação e relataram a ocorrência de um tipo de setor que aparecia regularmente, porém em uma frequência baixa, os quais foram denominados variantes deteriorados por assim apresentarem sua morfologia, além de uma instabilidade modificada. A frequência dos variantes deteriorados é típica para cada linhagem desde que esta seja mantida sob as mesmas condições (AZEVEDO, 1971).

As características fenotípicas descritas para os variantes deteriorados são bastante variadas, mas em geral eles foram descritos como tendo uma taxa de crescimento similar à da linhagem duplicada da qual tiveram origem, a produção de conídios é reduzida, além de possuírem diferentes graus de pigmentação. Possivelmente este tipo de variante é decorrente de novas duplicações em tandem presentes nos segmentos cromossômicos envolvidos na duplicação, o que vem a aumentar a instabilidade. A transposição destes segmentos duplicados para outros locais do genoma levaria a uma diminuição da instabilidade. Neste sentido, a instabilidade apresentada em *A. nidulans* teria como causa, um mecanismo de

transposição de elementos genéticos móveis, e o processo seria semelhante aos de transposição observado em outros organismos, especialmente em linhagens duplicadas de milho (McCLINTOCK, 1951, 1965).

AZEVEDO & ROPER (1970) e AZEVEDO (1971) analisaram geneticamente 31 variantes deteriorados e concluíram que estes podem ser classificados em quatro grupos conforme a posição do determinante de deterioração no genoma: a) determinante de deterioração associado à deleções do cromossomo I; b) determinante de deterioração localizado no segmento translocado; c) determinante de deterioração localizado em outros cromossomos não envolvidos com a duplicação; d) determinante de deterioração impossível de ser mapeado devido à alta instabilidade.

2.3.2. Fatores que afetam a Instabilidade Genética

AZEVEDO (1975) constatou que alguns fatores são capazes de alterar a instabilidade genética, por exemplo: os mutantes *uvs* são capazes de aumentar a instabilidade de linhagens portadoras de duplicações. Um fator recessivo designado *stf -1* é capaz de reduzir a instabilidade mitótica em linhagens duplicadas

FAVRAUD (1984) constatou que a instabilidade genética é altamente influenciada pela temperatura. O aumento de temperatura num intervalo que vai de 30° a 40° C aumenta a instabilidade mitótica da linhagem A. LIEBER (1976) estudou o efeito da temperatura sobre a frequência das deleções em linhagens duplicadas, e constatou que estes fatores estão correlacionados. A frequência total de deleções do cromossomo III duplicado é

maior quando em baixas temperaturas, ao passo que as deleções do cromossomo I duplicado aparecem em maior frequência em altas temperaturas.

Diversos agentes físicos e químicos alteram a instabilidade mitótica em linhagens duplicadas de ***A. nidulans***: p-fluor-fenilalanina (LHOAS, 1961); benlate (HASTIE, 1970); azul de tripan (COOKE *et. al.*, 1970); DNA exógeno (MENEZES, 1974); ultra-violeta (MENEZES, 1974; AZEVEDO, 1975); Brometo de Etídio (BONATELLI & AZEVEDO, 1977); 1,4 oxatin e cloroneb (AZEVEDO *et. al.*, 1977); etil metano sulfonato (ROSATO & AZEVEDO, 1978); Mn^{2+} (BURR *et. al.*, 1982); álcool etílico (KÄFER, 1984); protoplastização (QUEIRÓZ, 1988);.

Fatores genéticos podem ainda modular a instabilidade, como mutações de ponto, o fator stf - 1 citado anteriormente, ou outras aberrações. O gene *uvsE* o qual determina o caráter sensibilidade à luz ultra-violeta diminui a taxa de permuta mitótica aumentando a instabilidade de linhagens duplicadas. O gene *uvsB*, ao contrário, aumenta a taxa de permuta mitótica, mas somente para os cromossomos homólogos do grupo de ligação I (BURR, 1982).

PIZZIRANI-KLEINER & AZEVEDO (1986a) descreveram um gene denominado *bncA* que confere o caracter bi e trinucleado aos conídios de ***A. nidulans***. Quando transferido para linhagens portadoras de duplicação cromossômica este gene funciona como um estabilizador parcial, diminuindo a instabilidade mitótica (PIZZIRANI-KLEINER & AZEVEDO, 1986b).

Estes fatores que alteram a instabilidade das linhagens duplicadas geralmente afetam a frequência de recombinação mitótica e o mecanismo de reparo do DNA.

2.3.3. Os elementos genéticos móveis e a instabilidade genética

A instabilidade genética promovida por Elementos Transponíveis tem sido documentada em um grande número de organismos procariotos e eucariotos. São conhecidas muitas classes de elementos genéticos móveis em *Escherichia coli*, *Zea mays*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Antirrhinum majus* etc. (BERG, 1989).

As evidências genéticas da presença de elementos de transposição no genoma são fornecidas pelas mutações instáveis. A excisão imprecisa dos elementos de transposição e os rearranjos cromossômicos causados por eles produzem derivativos que possuem fenótipos variados, desde o selvagem (reversão) até o pseudo-selvagem ou novos mutantes. O tempo em que um derivativo de uma mutação instável surge está relacionado ao ciclo de vida do organismo, dependendo do estágio de desenvolvimento do mesmo (McCLINTOCK, 1951).

A primeira vez que as mutações instáveis e os rearranjos cromossômicos foram relacionados com segmentos cromossômicos capazes de alterar sua localização no genoma foi na década de 50 por Barbara McClintock. Esta autora dispunha de alguns dados que a possibilitaram formular a hipótese de que segmentos cromossômicos tinham a capacidade de mudar sua posição no genoma. Alguns estoques de milho apresentavam grãos variegados quanto a pigmentação, a qual apresentava-se como manchas escuras contra o fundo despigmentado dos grãos. Este mesmo estoque com fenótipo variegado possuía em seu genótipo uma duplicação do cromossomo 9 fazendo com que este estoque de milho apresentasse o fenômeno de quebra-

fusão-ponte durante a divisão nuclear; uma série de marcadores heterozigotos no braço curto do cromossomo 9 possibilitou analisar a posição das quebras sofridas devido ao ciclo de quebra-fusão-ponte. McClintock observou que as quebras, hora aconteciam em um sítio, hora em outro. Concluiu, então que havia uma unidade móvel capaz de produzir quebras em locais diferentes.

Em fungos, exemplos de instabilidade genética causada por elementos de transposição podem ser citados. Em *S. cerevisiae* os elementos Ty são responsáveis por muitas mutações instáveis.

DECARIS *et. al.* (1981) identificou em *Ascobolus immersus* dois sistemas de instabilidade que afetam a coloração do esporo e diferem entre si no tempo de reversão. O primeiro sistema reverte após a indução da germinação do esporo e o outro reverte antes da meiose dentro dos órgãos de reprodução sexual. Em ambos os sistemas a reversão se dá para o fenótipo selvagem. NICOLAS *et. al.* (1987) utilizaram outra linhagem de *A. immersus* e obtiveram raros revertentes para o fenótipo selvagem e derivativos pseudo-selvagens. Os autores postularam que a atividade de elementos transponíveis foi a causa destes sistemas instáveis.

O primeiro elemento genético móvel isolado em fungos filamentosos foi o transposon Tad de *Neurospora crassa* . NEWMAYER & GALEAZZI (1977) observaram que uma linhagem selvagem de *N. crassa* chamada Adiopodoumé portadora de uma duplicação Dp(1L→1R) H4250 possuía um fator em seu background genético que favorecia o surgimento de produtos instáveis, e que estes poderiam estar relacionados com a duplicação. A clonagem do transposon Tad da linhagem duplicada Adiopodoumé mostrou que este era o fator que gerava os produtos instáveis do locus *am* (codifica a

enzima glutamato desidrogenase). A caracterização deste elemento de transposição mostrou que sua estrutura é bastante similar à um grupo de transposons chamado LINE, os quais são característicos de genomas de mamíferos (KINSEY & HELBER, 1989). Este transposon possui uma característica bastante interessante, que é a capacidade de transposição entre núcleos em heterocários (KINSEY, 1990).

DABOUSSI *et. al.* (1992) descreveram a descoberta de uma nova família de elementos transponíveis (Fot1) no fungo fitopatogênico ***Fusarium oxysporum***. A detecção do transposon Fot1 foi feita por meio da seleção de mutantes espontâneos e instáveis para o gene *niaD* (nitrato redutase). Quatro mutantes *niaD* foram analisados e a clonagem e o sequenciamento do elemento transponível foi feita para dois destes mutantes. A caracterização molecular do transposon mostrou que o mesmo possui 1,9 kb, 44 pb terminais repetidos, e apresenta similaridade com uma classe de transposons de ***Caenorhabditis elegans***.

AZEVEDO & ROPER (1970) sugeriram a atuação de elementos transponíveis em linhagens duplicadas de ***A. nidulans*** como responsáveis pela alta instabilidade mitótica apresentada. Muitos pontos em comum foram detectados entre as linhagens portadoras de transposons e as linhagens duplicadas de ***A. nidulans***, porém a carência de estudos moleculares que pudessem definitivamente comprovar esta hipótese deixam esta questão ainda sem resposta.

2.4. Ciclo celular e divisão mitótica em *A. nidulans*

Os avanços nos estudos de ciclo celular só puderam efetivamente acontecer a partir do aprofundamento das pesquisas feitas na área de Genética e Bioquímica. Os conhecimentos vindos de análises bioquímicas foram obtidos predominantemente da caracterização de fatores de regulação da mitose em ovócitos de células animais. Estes fatores chamados MPF ("mitosis promoting factor") tem propriedades de uma proteína quinase, regulada por processos de fosforilação e defosforilação (DOONAN, 1992).

A análise genética realizada em células eucarióticas representa uma rota alternativa para o estudo da dinâmica do ciclo celular e da mitose. Um grande número de mutantes condicionais auxiliam este estudo; foi a análise destes mutantes que possibilitou o isolamento de fatores reguladores da divisão mitótica. Muitos destes fatores são semelhantes àqueles isolados bioquimicamente. A maioria destas substâncias de regulação são produzidas em quantidades ínfimas, o que torna o estudo bioquímico mais difícil. Ao passo que a clonagem dos genes que codificam estes fatores e a expressão dos mesmos em maior escala significa uma vantagem para o estudo da Genética e da Biologia Molecular destas proteínas e dos genes que as produzem e regulam o ciclo celular.

O motivo de se utilizar eucariotos inferiores para o estudo da biologia da mitose, se deve ao fato dos organismos como *A. nidulans*, *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* possuem sistemas suficientemente complexos para o estudo do ciclo celular e são mais fáceis de serem manipulados do que células animais e vegetais.

Quanto a organização do núcleo do fungo ***A. nidulans***, parece ser bastante similar aos outros organismos eucariotos: possui membrana nuclear, cariolinfa, apenas um nucléolo, cromatina que se condensa durante a metáfase e se descondensa na intérfase. Com relação a divisão mitótica também possui semelhanças com outros organismos mas também possui algumas peculiaridades: as cromátides-irmãs segregam-se por ação das fibras do fuso mitótico, e a fidelidade do complemento cromossômico é garantida pela divisão mitótica. Porém alguns eventos são diferentes, por exemplo a membrana nuclear não desaparece permanecendo apenas menos contínua durante toda a mitose, e as cromátides duplicadas permanecem orientadas ao longo do fuso mitótico e não na placa metafásica.

2.4.1. O estudo da biologia do ciclo celular por meio de mutantes de ***A. nidulans***

A vantagem do uso dos mutantes para o estudo ciclo celular em ***A. nidulans*** é que por meio da clonagem das mutações chega-se aos genes e as proteínas que são codificadas por eles. A identificação destas proteínas é importante porque muitas delas são fatores reguladores da mitose, sem os quais o ciclo celular não poderia se completar de forma normal.

Os mutantes para mitose de ***A. nidulans*** foram identificados e classificados de acordo com o efeito que causam na estrutura do núcleo. Muitos deles são termossensíveis, isto é tem uma temperatura permissiva e uma restritiva para o crescimento. Baseado nisto três classes de mutantes com diferentes anormalidades mitóticas foram detectadas: os mutantes *bim*

("bloqued in mitosis") possuíam um bloqueio de mitose, revelaram um alto índice de divisões mitóticas em condições de temperatura restritiva; os mutantes *nim* (never in mitosis), foram bloqueados na intérfase e não chegaram a entrar em mitose em condições de temperatura restritiva, e por isso apresentaram baixos índices de divisão mitótica; e por último os mutantes *nud* (nuclear distribution), os quais apresentaram anormalidades quanto a distribuição nuclear, aparentemente possuíam algum bloqueio no sistema de movimentação de núcleos (MORRIS *et. al.*, 1989). Uma segunda estratégia para o estudo dos mutantes para ciclo celular foi a busca de mutantes específicos para os genes que codificam proteínas envolvidas com a formação do fuso mitótico, as tubulinas.

Mutantes *bim*

Como foi dito anteriormente os mutantes *bim* possuem uma mitose prolongada e nunca chegam a completar a anáfase, além disto o fuso mitótico não se desfaz, permanecendo intacto o tempo todo em que a temperatura é restritiva. Observou-se que a cromatina fica condensada e organizada em dois blocos separados, indicando que a separação das cromátides-irmãs foi iniciada. Este tipo de mutação tem um efeito pleiotrópico sobre a germinação do esporo. Em condições de temperatura restritiva o esporo cresce tomando uma forma esférica ao invés de lançar um tubo germinal que vai se alongar formando a hifa. O gene *bimG* foi clonado e seu produto foi caracterizado, mostrando forte homologia com uma fosfatase encontrada em mamíferos. Portanto acredita-se que a mutação cause uma

redução nos níveis de desfosforilação de um grupo de proteínas que precisam ser desfosforiladas para completar a mitose; considerando uma outra hipótese, este gene poderia codificar uma proteína reguladora de um ativador mitótico. Outros mutantes do grupo *bim* foram descritos: *bimE* é um regulador negativo da mitose, previne que a divisão mitótica se complete antes que todos os eventos pré-mitose se realizem, como por exemplo que todo o material genético se duplique; *bimA* é um gene essencial requerido para o término da mitose; sabe-se que este codifica uma proteína TPR (tetratricopeptídeo) .

Mutantes *nim*

Este grupo de mutantes condicionais, isto é, dependentes da temperatura fazem com que as células fiquem bloqueadas na fase G2 do ciclo celular, e portanto não consigam entrar em divisão mitótica. As evidências indicam fortemente que o produto gênico do gene *nimA* seja um indutor da mitose. A análise do transcrito do gene *nimA* mostrou ser esta uma proteína quinase, e parece provável que esta induza mitose por um mecanismo de fosforilação de uma ou mais proteínas que quando fosforiladas causam alterações físicas e morfológicas associadas com a mitose (MORRIS et. al., 1989). Este mesmo autor sugere que existe uma grande interação entre os grupos de genes *bim* e *nim*. O primeiro teria a função de desfosforilar os componentes que fazem com que a célula permaneça em mitose, isto é a desfosforilação causada por esta enzima acarretaria a finalização da mitose; os genes do grupo *nim* codificariam proteínas que promoveriam a fosforilação dos componentes necessários à iniciação da mitose.

Mutantes *nud*

Os mutantes deste grupo estão relacionados com a motilidade dos núcleos. Dois genes *nudA* e *nudC* foram caracterizados e são necessários para manter a distribuição normal dos núcleos ao longo das hifas em linhagens selvagens de ***A. nidulans***. No entanto, linhagens que carregam mutações condicionais (temperatura restritiva) são incapazes de transportar os núcleos no micélio que está em crescimento e portanto tem seu desenvolvimento limitado. Apesar do movimento nuclear ter sido relacionado a atuação dos microtúbulos, estes mutantes não parecem ter qualquer anormalidade nesta estrutura (MORRIS, 1976).

Mutantes para Tubulina

A proteína tubulina tem sido um grande alvo das análises genéticas e moleculares devido ao papel central que desempenha como componente principal do fuso mitótico. Várias formas de tubulina foram descobertas: β 1-tubulina, β 2-tubulina, β 3-tubulina, α -tubulina e γ -tubulina. Um passo importante para a caracterização destes isotipos da tubulina foi a descoberta dos mutantes resistentes para uma droga anti-microtúbulos, o benomil. O mutante resistente a benomil, *benA*, possui os isotipos mutantes para β 1 e β 2-tubulina identificados eletroforéticamente. Em cruzamentos genéticos estes isotipos mutantes são co-segregantes com a mutação *benA*, sugerindo que este gene codifica para as duas tubulinas. Posteriormente o gene *tubC* foi isolado a partir de um mutante, e determinou-se que este gene

seria responsável pela codificação da β 3-tubulina. Sugeriu-se também que esta tubulina seja importante para a mitose durante a conidiogênese mais do que durante o crescimento vegetativo. Quanto a γ -tubulina, sabe-se que é um isotipo codificado pelo gene denominado *mipA*. As análises imunocitoquímicas mostraram que esta tubulina não é um componente dos microtúbulos, mas é encontrada nos polos do fuso.

2.5. Desenvolvimento e diferenciação em *A. nidulans*

2.5.1. Ciclo assexual e morfologia das estruturas vegetativas e reprodutivas

O ciclo assexual pelo qual passa o fungo *A. nidulans* tem como produto final a formação de conídios ou esporos assexuais, os quais vão ser disseminados mecanicamente e quando em condições propícias de nutrição, temperatura e umidade vão germinar produzindo colônias com as mesmas características genéticas da colônia original. A esporulação é marcada por alterações na expressão de vários genes que levam à formação de tipos diferenciados de células, como: hifas, células-pé, haste, métulas e fiálides. É destas estruturas que depende a produção dos conídios, sem elas os esporos assexuais não podem ser formados. Como a esporulação tem início, e quais são os fatores que determinam a expressão dos genes envolvidos no desenvolvimento das estruturas vegetativas, são questões centrais no estudo da biologia do desenvolvimento, e serão melhor discutidas no transcorrer desta revisão.

O desenvolvimento vegetativo inicia-se pela germinação de um conídio ou ascósporo em meio de cultura sólido ou líquido com aeração e temperatura adequada (AZEVEDO e COSTA, 1973). O crescimento dá-se por extensão apical de células especializadas chamadas hifas, que são filamentos septados, multinucleados, de crescimento indefinido. As hifas são estruturas especializadas no sentido de produzirem hidrolases extracelulares que captam nutrientes do meio de cultura (TIMBERLAKE, 1990). O conjunto de hifas, chamado micélio, é bastante característico para cada fungo sendo portanto fonte de informação para identificação de linhagens, podendo variar em textura, tamanho, diâmetro e coloração.

Em condições suficientes de Carbono e Nitrogênio, não há formação de estruturas de desenvolvimento relacionadas com a diferenciação dos conídios (conidiogênese), a menos que o micélio seja exposto diretamente à uma superfície aerada (LAW e TIMBERLAKE, 1980; AXELROD *et al.* 1973); este parece ser um dos fatores determinantes para indução da conidiogênese e para o próprio início do desenvolvimento do conidióforo.

A luz é um fator limitante para a conidiogênese em linhagens selvagens de *A. nidulans* (KÄFER, 1960). Esta dependência de luz para formação de conídios é determinada pelo locus *velvet* (*vevA*). Porém as linhagens padrão de laboratório são luminosidade-independente devido a mutação *vevA₁* no locus *vevA*, e portanto realizam a conidiogênese sem necessidade da luz (MOONEY *et al.*, 1990).

A partir do momento que as hifas encontram-se em condições favoráveis inicia-se o processo de formação das estruturas relacionadas com a produção dos conídios, ou seja todos os componentes do conidióforo.

A ultraestrutura do desenvolvimento do conidióforo foi analisada por MIMS *et. al.* (1988), e pode ser didaticamente dividida em 5 estágios. No primeiro estágio, do compartimento de uma hifa surge uma célula diferenciada chamada célula-pé, a qual vai sustentar o conidióforo. As células-pé distinguem-se das demais células vegetativas por possuírem uma parede celular mais espessada e um diâmetro total maior do que da hifa (YAGER, 1990). Primeiramente a célula-pé foi considerada uninucleada, porém CLUTTERBUCK & SPATHAS (1984) demonstraram que em heterocários, entre linhagens com mutações complementares para movimentação de núcleos (*apsA*⁻ e *apsB*⁻, mapeados no cromossomo IV), a maioria dos conidióforos contém núcleos dos 2 tipos, sugerindo a existência de uma célula-pé binucleada. Esta conclusão é contrastante com os dados da literatura, onde os conidióforos provenientes de heterocários são homocarióticos, sendo a célula-pé uninucleada. No caso dos mutantes para movimentação nuclear, os conidióforos heterocarióticos poderiam ser explicados devido à necessidade das mutações complementares permanecerem juntas para uma melhor distribuição dos núcleos nos conídios. PIZZIRANI-KLEINER & AZEVEDO (1986a) descreveram uma linhagem mutante em *A. nidulans* que produz conídios bi e trinucleados em uma porcentagem bem definida. Heterocários entre esta linhagem binucleada e uma linhagem testadora produz conídios heterocarióticos, sugerindo também um caso em que na célula-pé há dois núcleos, geneticamente diferentes, que nos estágios subsequentes de desenvolvimento vão produzir conídios com 2 ou 3 núcleos de origens diferentes.

É a partir da célula-pé que vai se desenvolver a haste do conidióforo a qual tem um aspecto semelhante à uma hifa vegetativa em crescimento. É multinucleada e não possui septos. A diferença de uma haste para uma hifa comum é que a haste tem crescimento bem delimitado atingindo 100µm de comprimento, ao contrário da hifa que cresce indefinidamente. A região apical da haste é rica em vesículas que contém substâncias precursoras e polimerizadoras da parede celular, estas vesículas se fundem à membrana plasmática promovendo o alongamento da haste (GOODAY, 1983). Assim que o alongamento geneticamente programado termina, começa o segundo estágio de desenvolvimento, quando a haste toma forma globosa atingindo ao final cerca de 10 µm de diâmetro. Vários núcleos migram para esta região apical chamada vesícula, onde vão sofrer divisão mitótica.

No terceiro estágio há o brotamento sincronizado de células sobre a superfície da vesícula. Estas células vão originar os esterígmata primários ou métulas. Os núcleos que estão posicionados na região apical da vesícula vão migrar para dentro de uma métula tornando-a uninucleada. A delimitação entre a métula e a vesícula acontece pela deposição de um septo descontínuo que possui um poro central que permite a comunicação entre os dois compartimentos citoplasmáticos. No quarto estágio de desenvolvimento pequenos brotamentos surgem do ápice da métula. Estes brotamentos vão se diferenciar em esterígmata secundários ou fiálides, o núcleo presente na métula entra em divisão mitótica, e um núcleo-filho migra para a fiálide e o outro permanece na métula. Assim como acontece entre a métula e a vesícula, entre a métula e a fiálide também vai haver formação de um septo descontínuo com poro central.

O quinto estágio de desenvolvimento compreende a formação dos conídios, o que fecha o ciclo de vida assexual do fungo. Os eventos relacionados com a formação dos mesmos inicia-se pela divisão do núcleo da fiálide. O primórdio do conídio aparece como um brotamento do citoplasma da fiálide ligado a esta por um estreitamento chamado pescoço da fiálide. É justamente neste local que acontece a divisão do núcleo da fiálide. Um núcleo-filho entra para o conídio em diferenciação e permanece na fase G1 do ciclo celular (BERGEN & MORRIS, 1983) e o outro núcleo-filho volta para a região apical da fiálide. A separação entre a fiálide e o conídio acontece por invaginação da membrana plasmática e deposição da parede celular. Inicialmente há um poro central remanescente entre o conídio e a fiálide, com a maturação do conídio este poro desaparece. Assim que o primeiro conídio formado fica delimitado, o núcleo da fiálide entra em divisão mitótica outra vez para reiniciar o processo; sucessivas divisões do núcleo da fiálide vão formar uma longa cadeia de conídios.

O processo de maturação do conídio é definido como a diferenciação que ocorre depois da formação do septo que vem a delimitar o conídio, separando-o da fiálide. A maturação ocorre em 3 estágios: no estágio 1 o conídio já está inteiramente delimitado e ganha uma parede celular que consiste de duas membranas: uma interna chamada C2 e outra externa chamada C1. Durante o estágio 2 a membrana C2 condensa-se e C1 toma uma forma crenulada. Na transição entre o estágio 2 e o estágio 3 algumas regiões da membrana C2 se fundem com a membrana C1, fazendo pontos de conexão entre C2 e C1. No estágio 3, forma-se uma terceira membrana C3, desta vez entre C2 e C1, por último forma-se uma quarta membrana C4, que é

a mais interna a qual origina-se da membrana plasmática (SEWALL *et. al.*, 1990). Este autor sugere que a deposição destas 4 camadas ou membranas torna o conídio impermeável e garante sua dormência.

2.5.2. Aquisição de competência para o desenvolvimento

Os eventos ligados ao desenvolvimento podem ser divididos em precoces e tardios. Os eventos tardios do desenvolvimento são baseados em observações morfológicas e correspondem a descrição feita no item anterior. Os genes envolvidos nos eventos precoces são classificados como Classe I e regulam a transição entre crescimento vegetativo não-diferenciado e a conidiogênese. Os genes de Classe I estão associados com a aquisição de competência para a conidiogênese e com outros eventos muito precoces, preliminares à formação das estruturas de desenvolvimento assexual. Os genes de Classe II estão relacionados com os eventos descritos no item anterior, com a formação do conidióforo e dos conídios, e são classificados como morfogenéticos, (YAGER, 1990).

Como foi dito anteriormente a conidiogênese normalmente não acontece em cultura submersa, a menos que o micélio seja rapidamente exposto a uma superfície aerada. Este procedimento de transferência do micélio de cultura líquida para placa de Petri é chamado indução, e leva à formação dos conidióforos. O estabelecimento da competência é dependente das condições particulares empregadas para cada cultura, mas geralmente a competência é adquirida após 20 horas de crescimento à 37°C. Antes deste período as colônias são incapazes de desenvolver a conidiogênese mesmo que

haja indução por aeração (MILLER, 1990). Os resultados obtidos por AXELROD *et. al.* (1973) indicam que antes de 20 horas de incubação as células não respondem à indução, e que após este período a resposta leva 5 horas para se realizar. As células capazes de responder imediatamente à indução são ditas competentes para o desenvolvimento. O período entre a indução de células competentes e o aparecimento das primeiras estruturas do conidióforo é chamado de período de maturação.

O processo de aquisição de competência parece ter controle endógeno, uma vez que fatores como densidade de células e fornecimento contínuo de meio de cultura não surtem efeito sobre o início da conidiogênese (PASTUSHOK & AXELROD, 1976). Além disso a existência de mutantes como o BB142 que esporulam antes de 25 horas de incubação quando em comparação com a linhagem selvagem, vem a corroborar a idéia do controle endógeno.

2.5.3. Ciclo sexual e estruturas relacionadas

A formação dos esporos sexuais, chamados ascósporos, derivados de um evento de meiose, é um evento relativamente tardio do ciclo de vida do fungo ***A. nidulans***. A esporulação sexual inicia-se após o término do desenvolvimento assexuado. Apesar de ser um evento ainda não identificado na natureza, pode ser induzido em condições de laboratório, submetendo-se o fungo a condições de estresse, como por exemplo baixa tensão de oxigênio e condições de temperatura restritiva.

Os eventos morfológicos relacionados com a esporulação sexual envolvem a formação de 2 estruturas básicas: o cleistotécio e o asco. O primeiro sinal visível da diferenciação sexual é o aparecimento de um tipo de célula especializada chamada Célula Hülle, a qual se diferencia pelo seu formato globular, bem maior do que o conídio e por possuir uma parede celular bastante espessada. Este tipo celular recobre o primórdio do cleistotécio e é o primeiro indício da formação de um corpo de frutificação nesta região (BENJAMIN, 1955). Um dos primeiros estágios é o estabelecimento e manutenção da célula dicariótica, contendo dois núcleos iguais, no caso de autofecundação, ou dois núcleos parentais diferentes, no caso de um cruzamento entre linhagens diferentes. Já nesta etapa de cariogamia ocorre o aparecimento da célula mãe do asco, esta estrutura pode ser vista como um saco que envolve a célula dicariótica. É aí que o núcleo diplóide vai sofrer meiose dando origem à 4 células haplóides, produto da divisão meiótica. Em seguida cada núcleo sofre uma divisão mitótica originando 8 células que sofrem uma segunda mitose originando 8 ascósporos binucleados que ficam encerrados dentro do asco, que por sua vez está contido dentro do corpo de frutificação, o cleistotécio que funciona como estrutura de resistência e proteção para os ascósporos. Os ascósporos maduros e os cleistotécios possuem uma coloração avermelhada devido ao acúmulo da enzima lacase, a qual catalisa os polímeros difenólicos (KIRK & MORRIS, 1991). Estes mesmos dois autores descreveram uma linhagem deficiente para o gene *tubB* que é incapaz de promover sua própria ascosporogênese quando autofecundado. Este estudo foi desenvolvido quando se procurava possíveis efeitos causados pela substituição dos genes (*tubA* e *tubB*) que codificam α -tubulina, nos ciclos

assexual e sexual. E o resultado foi uma linhagem de ***A. nidulans*** incapaz de produzir ascósporos. Os cleistotécios analisados por estes autores mostraram-se vazios, comprovando o efeito do gene *tubB* na formação dos ascósporos, apesar dos cleistotécios permanecerem com morfologia normal.

2.5.4. Regulação gênica do desenvolvimento em ***A. nidulans***

Resultados de estudos bioquímicos e genéticos da conidiogênese tem demonstrado que a expressão de inúmeros genes é necessária para a formação de um conidióforo normal. Porém poucos exemplos podem ser citados, em que o produto gênico envolvido na conidiogênese é conhecido, e os mecanismos envolvidos neste processo são entendidos (TIMBERLAKE & MARSHALL, 1988).

MARTINELLI & CLUTTERBUCK (1971), realizaram uma análise mutacional baseada na taxa de mutação que afeta o desenvolvimento do conidióforo e a diferenciação do conídio, comparando-a com a taxa de mutação obtida para outros genes que não estão envolvidos na conidiogênese. Mutações que afetam apenas o crescimento vegetativo foram excluídas da análise. O objetivo deste estudo foi quantificar os genes envolvidos na diferenciação do conídio, os resultados mostrados indicam que aproximadamente 100 genes, com atividade essencial específica da diferenciação do esporo estão ativos. Experimentos realizados por TIMBERLAKE (1980), utilizando sondas radioativas de cDNA correspondentes à sequências de mRNA encontradas somente em culturas em esporulação foram hibridizadas com DNA genômico, e mostraram que cerca de 3% a 6% do

DNA de *A. nidulans* é seletivamente expressado durante a esporulação. Esta porcentagem representa aproximadamente 1300 genes estruturais. As razões para as diferenças entre os resultados obtidos por estes autores podem ser muitas, por exemplo: muitas das sequências quantificadas no experimento com hibridização podem não estar diretamente envolvidas na formação e manutenção dos tipos celulares diferenciados, estas sequências podem estar sendo acumuladas em resposta às necessidades nutricionais que a conidiogênese impõe; muitas mutações podem ter efeitos fenotípicos tão sutis que tornam-se de difícil identificação e acabam por não serem levados em conta. Outra razão para tal discrepância seria o acúmulo de sequências que só serão utilizadas na germinação do esporo e ficam estocadas em forma de mRNA.

A análise mutacional foi de grande importância porque possibilitou o isolamento de mutantes preciosos para o estudo do desenvolvimento, sem os quais nada se saberia até hoje sobre desenvolvimento e diferenciação celular em *A. nidulans*. CLUTTERBUCK (1969), subdividiu esta última classe de mutantes em 4 categorias: a) mutantes para alterações nos conídios (*yA*⁻, *wA*⁻, *fwA*⁻ e *wetA*⁻); b) mutantes com alterações da estrutura do conidióforo mas que não impedem a formação dos conídios (*stuA*⁻ e *medA*⁻); c) mutantes completamente bloqueados na formação dos conídios (*brlA*⁻ e *abaA*⁻); d) mutantes que afetam a pigmentação dos conidióforos (*ivoA*⁻ e *ivoB*⁻). TIMBERLAKE (1990) classificou as mutações relacionadas com o desenvolvimento assexual em duas classes: na classe I estão contidos os mutantes relacionados com a aquisição de competência. A classe II engloba aqueles mutantes que afetam a formação do conidióforo e do conídio,

Em uma classificação mais recente, MILLER *et. al.* (1992) dividiu os mutantes em dois grupos: o grupo BRISTLE e o grupo STUNTED. No primeiro estão incluídos 3 genes (*brlA*-bristle → *abaA*-abacus → *wetA*-wet-white) que atuam numa cadeia epistática e sem os quais não há formação do conidióforo e dos conídios, no segundo grupo, 2 genes estão envolvidos *stuA*→*medA*. Além de genes que estão envolvidos com a pigmentação do conídio como o locus *yA* e *wA*, os quais serão melhor analisados nos itens subsequentes. Alguns destes genes já foram isolados e sequenciados, e muitas coisas sobre as proteínas por eles codificadas já começam a ser entendidas.

Locus *wA*

O gene *wA* é o primeiro de uma cadeia epistática responsável pela pigmentação dos conídios. Nesta cadeia também está envolvido o gene *yA* que será descrito em seguida. O locus *wA* codifica uma enzima que converte um precursor em um produto secundário, que servirá como substrato para a enzima

p-difenol oxidase (lacase) codificada pelo locus *yA*

A clonagem do gene *wA* (MAYORGA & TIMBERLAKE, 1990; TILBURN *et. al.*, 1990) resultou no isolamento de um fragmento de 14 kb, sendo que a clonagem dos dois primeiros autores, deu-se por complementação de mutação e a clonagem do segundo foi feita por inativação insercional do gene *wA*. Em ambos, os resultados são concordantes, exceto pelo mapa de restrição, onde TILBURN encontrou um sítio de restrição *Xho I*, que não foi

detectado por MAYORGA & TIMBERLAKE. Além do gene *wA*, são conhecidos também *wB* e *wC*.

Locus *yA*

O gene *yA* é um dos mais bem caracterizados. Foi identificado por meio de mutação por PONTECORVO *et. al.* (1953) e caracteriza-se por possuir conídios amarelos ao invés de conídios verdes. CLUTTERBUCK (1972) demonstrou que o locus *yA* codifica uma enzima rica em cobre chamada *p*-difenol oxidase (lacase) que tem a função de converter um pigmento amarelo intermediário em pigmento verde que protege o esporo da ação da luz ultravioleta. O mutante *wA*⁻ tem coloração branca e o locus *wA* é epistático à *yA*, indicando que os genes *wA* e *yA* codificam enzimas envolvidas na síntese do mesmo pigmento que dá cor ao esporo. Os tipos mutantes devem apresentar mutações que inativam estas enzimas.

O gene *yA* foi isolado em um fragmento de 2,2 kb capaz de complementar a mutação *yA*₁, localizada no grupo de ligação I, entre os marcadores auxotróficos *pabaA*₁ e *biA*₁. O mRNA possui 2200 nucleotídeos e está presente em pequenas quantidades em células vegetativas e no conídio maduro, mas o transcrito começa a acumular em altos níveis paralelamente com a diferenciação das fiálides. Não se observa acúmulo do transcrito em linhagens *brlA*⁻, mas níveis detectáveis estão presentes em mutantes *abaA*₁ e *wetA*₆. A enzima lacase é dependente da síntese contínua de RNA, sugerindo que o gene é regulado ao nível da transcrição (O'HARA & TIMBERLAKE, 1989).

Locus *brlA*

Os mutantes bristles iniciam o processo de conidiogênese com a formação da haste do conidióforo, porém esta haste, que no tipo selvagem cresce por aproximadamente 100µm, no mutante *brlA* cresce indefinidamente sem que haja diferenciação da vesícula e nem das estruturas subsequentes. A conclusão de que a atividade *brlA*⁺ é muito importante para o controle do crescimento apical fazendo a alteração do crescimento polarizado para o não-polarizado, foi o ponto de partida no avanço dos estudos de diferenciação do conidióforo (CLUTTERBUCK, 1969; TIMBERLAKE & MARSHALL, 1988; TIMBERLAKE, 1990; YAGER, 1990).

O gene *brlA* foi clonado por complementação da mutação *brlA*₁ (JOHANSTONE *et. al.*, 1985; BOYLAN *et. al.*, 1987) em um fragmento de 2524 pb. A sequência possui apenas um quadro de leitura aberto e o mRNA produz um polipeptídeo de 432 aminoácidos. Uma das fortes razões para se acreditar que o gene *brlA* codifica uma proteína de regulação é o fato de que o sequenciamento da proteína BRLA mostrou que a mesma possui dois sítios Zn(II). Os chamados "zinc-fingers" (Zn(II)) são regiões altamente conservadas do DNA que codificam para cisteína e histidina (C2 - H2) e que tem função de reconhecimento de sequências específicas de DNA (EVANS & HOLLENBERG, 1988). Estas regiões tem sido consideradas como diagnóstico para uma classe de proteínas reguladoras que se ligam ao DNA. A proteína BRLA requer ambos os sítios C2-H2 para exercer plenamente sua função de ligação ao DNA, conforme indicam os dados experimentais (ADAMS *et. al.*, 1990). Neste trabalho foram feitas mutações sítio específicas nas regiões C2-H2 causando

alterações dos sítios Zn(II), o que acarretou perda da atividade reguladora da proteína BRLA.

Quanto a função da proteína BRLA acredita-se que esta seja uma proteína de regulação que se liga ao DNA, e que sua presença é necessária e suficiente para desencadear e dirigir o desenvolvimento do conidióforo (ADAMS *et. al.* 1988). A mutação no locus *brlA* tem efeito pleitrópico sobre a morfologia e sobre a expressão dos outros genes; os mutantes *brlA*⁻ não conseguem elaborar vesículas, métulas, fiálides e nem mesmo produz conidióforo ou pigmentos do esporo e as enzimas necessárias para sua síntese (MIRABITO *et. al.*, 1989).

A expressão do locus *brlA* é completamente suprimida durante o crescimento em cultura submersa (AXELROD *et. al.*, 1973; TIMBERLAKE, 1980), mas a partir do momento em que há indução este é um produto gênico que aparece precocemente no desenvolvimento (MIRABITO *et. al.*, 1989). A indução precoce do locus *brlA* nas células vegetativas, causa a expressão dos outros genes envolvidos no processo de desenvolvimento, como por exemplo os loci *abaA* e *wetA*, sugerindo que a ativação destes genes é dependente do locus *brlA* (BOYLAN *et al.*, 1987).

Apesar de todo o conhecimento que já se tem sobre a estrutura do gene *brlA* e do seu importante papel como fator iniciador e direcionador do desenvolvimento não se sabe ainda qual é, ou quais são os fatores genéticos e ambientais que regulam a sua expressão.

Locus *abaA*

CLUTTERBUCK, (1969) descreveu um tipo mutante denominado *abaA⁻* que apresenta uma alteração morfogênica das fiálides. Este mutante não forma cadeias de conídios, ao invés disso as fiálides se ramificam e proliferam. A clonagem deste gene mostrou que este possui uma sequência de 3744 pb que codifica uma proteína de 90 kD (BOYLAN *et. al.*, 1987).

ADAMS *et. al.*, (1988) fundiu o gene *abaA* com um promotor forte, (*alcAp::abaA*), de forma a poder induzir a expressão da proteína ABAA precocemente, e constatou que a expressão deste gene durante o crescimento vegetativo causa alterações de morfologia celular, como por exemplo vacuolização das hifas e ativação da transcrição do gene *brlA*, sugerindo fortemente que estes dois genes são reciprocamente induzidos, isto é: no tipo selvagem *brlA* induz *abaA*, e em condições experimentais em que *abaA* é induzido precocemente, este é capaz de induzir a transcrição de *brlA*, mesmo que a ordem temporal de ativação normal seja de *brlA* para *abaA* (MIRABITO *et. al.*, 1989).

A formação das fiálides requer apenas o gene *brlA*, porém para que as fiálides se tornem funcionais e produzam conídios é necessária a atividade de *abaA* (CLUTTERBUCK, 1977). A expressão induzida de *brlA* em células não diferenciadas de crescimento vegetativo ativa a transcrição de *abaA* e o aparecimento de fiálides funcionais. A ativação artificial de *abaA* não induz imediatamente a formação de fiálides e de conídios, mas ativa a transcrição de *brlA* e causa alterações morfológicas. Portanto a ativação destes

dois genes deve ocorrer na ordem correta, para que haja diferenciação de fiáides funcionais.

Além de ser capaz de ativar o gene *brlA*, *abaA* também regula a expressão do locus *yA*. O sequenciamento do gene *yA* mostrou a existência de dois sítios regulatórios denominados Elemento I e Elemento II, os quais contêm sequências chamadas TEF-1 que tem afinidade por uma classe de proteínas denominadas ATTS, a qual pertence a proteína ABAA. Assim parece bastante provável que estas sequências (TEF-1) sejam os sítios de ligação da proteína ABAA ao gene *yA*. O sequenciamento e a análise mutacional do sítio promotor do gene *yA* demonstrou que o Elemento I contém 3 sítios de ligação que respondem à proteína BRLA, este elemento não é fundamental para a expressão do gene, mas aumenta os níveis de transcrição do gene, sendo portanto um fator modulador da transcrição. Já o Elemento II contém uma sequência CAATC (CAT box) flanqueada por dois sítios TEF-1 os quais contêm as sequências específicas que tem afinidade pela proteína ABAA. A análise mutacional mostrou que o Elemento II é suficiente para desencadear a transcrição do locus *yA*, portanto pode-se concluir que este está sob o controle dos genes reguladores *brlA* e *abaA* (ARAMAYO & TIMBERLAKE, 1993).

Locus *wetA*

Primeiramente identificado por meio da mutação *wetA*₆. (CLUTTERBUCK, 1969) apresenta um fenótipo bastante peculiar. A formação do conidióforo não é atingida por esta mutação, porém os conídios tem parede celular despigmentada e após alguns dias sofrem lise, apesar de sua aparência

microscópica ser normal nos primeiros momentos de sua formação. Ao que parece os conídios provenientes de colônias com a mutação *wetA₆* não passam pelo processo de maturação normal, a membrana interna não se condensa durante o Estágio II de maturação. O estudo molecular deste locus demonstrou que o gene *wetA* codifica um mRNA de 2,1 kb. O transcrito não está presente nas células não diferenciadas das hifas, mas acumula-se durante o período de maturação do conídio.

Duas hipóteses foram formuladas para esclarecer o significado da proteína codificada pelo gene *wetA*. Na primeira delas foi sugerido que o produto gênico do locus *wetA* é requerido para a ativação de genes envolvidos na síntese de componentes da parede celular dos conídios. A segunda hipótese é de que o produto *wetA* seja necessário para o estabelecimento da dormência do conídio, e uma vez estando ausente no mutante, as substâncias que promovem a germinação do conídio, como por exemplo substâncias degradadoras de parede celular, não estariam sendo reprimidas e seriam responsáveis pela lise dos conídios que não estariam suficientemente maduros para a germinação, sendo lisados (TIMBERLAKE, 1987; ADAMS *et. al.*, 1988; TIMBERLAKE & MARSHALL, 1988). Análises citoquímicas e de microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que na transição entre o estágio II e o estágio III há deposição de duas camadas na parede celular, C3 e C4, as quais podem ser vistas no tipo selvagem, nos conídios do mutante *wetA₆* estas camadas nunca são formadas, o que é consistente com a primeira hipótese de que o produto gênico *wetA* é requerido para ativar genes necessários à deposição da parede celular e maturação dos conídios. Este resultado no entanto não descarta completamente a segunda hipótese de germinação

precoce, uma vez que dados experimentais demonstraram que a expressão forçada do gene *brlA* sob o controle do promotor do catabolismo da álcool-desidrogenase (*alcAp::brlA*) em linhagens *wetA*⁻ faz com que os conídios produzidos não passem pela fase de dormência e germinem imediatamente após sua formação (SEWALL *et. al.*, 1990). Quanto à dependência do gene *wetA* dos outros dois genes envolvidos na via Bristle, os dados indicam que *wetA* não necessita diretamente do locus *brlA*, mas requer o locus *abaA* para ser transcrito (MIRABITO *et. al.*, 1989).

2.5.5. Interação entre os genes do grupo "Bristle"

Os resultados de análise mutacional da reprodução assexual em *A. nidulans* indicam claramente que as relações entre um grupo de genes controla toda a via principal de formação do conidióforo, do conídio e sua maturação. Este grupo de genes é chamado grupo "Bristle" (MILLER *et. al.*, 1992) e é composto da seguinte cadeia, onde os membros da mesma se relacionam entre si por meio de uma epistasia: *brlA*→*abaA*→*wetA* (CLUTTERBUCK, 1969, 1977). Embora muitos outros genes contribuam para a complexidade estrutural e fisiológica do conidióforo, estes 3 genes são os únicos caracterizados como sendo específicos da conidiogênese e requeridos para a produção de conídios viáveis e dormentes. A interdependência destes 3 genes também está presente em termos da regulação dos mesmos, como foi demonstrado por MIRABITO *et. al.* (1989), a expressão de *brlA* em células vegetativas ativa *abaA* e direciona a formação dos conídios, *abaA* por sua vez ativa *wetA* e serve como regulador positivo da transcrição de *brlA*. A indução de

wetA não é diretamente dependente de *brlA*, mas sim de *abaA*, o que implica em uma possível regulação autógena de *wetA*.

Muitos genes específicos da conidiogênese podem ser ativados pelos membros do grupo Bristle. Estes genes são agrupados em classes de acordo com sua dependência em *brlA*, *abaA* ou *wetA*. Classe A: inclui genes que são ativados durante a formação do conidióforo e antes da formação dos conídios, e são dependentes de *brlA* e *abaA* para serem ativados. Classe B: estes genes são ativados por *abaA* e por *wetA*, sendo independentes de *brlA*; são ativados no início do desenvolvimento do conídio. Classe C é formada por genes que necessitam da ativação de *brlA*, *abaA* e *wetA*. Acontece uma ativação de genes em cascata iniciada pela transcrição do gene *brlA* e continua com as várias interações entre *brlA*, *abaA* e *wetA*. A ordem em que estes 3 genes são ativados também é muito importante, por exemplo na diferenciação das fiálides. Estas só são funcionais quando os genes são ativados na ordem correta: *brlA* e posteriormente *abaA* (MIRABITO *et. al.*, 1989).

2.5.6. O grupo "Stunted"

Além do grupo Bristle, foi identificado um outro grupo de genes que é capaz de alterar a complexidade do conidióforo. Deste grupo, chamado Stunted, foram identificados dois genes *stuA* e *medA*, os quais são considerados modificadores por causarem alterações na morfologia e na organização espacial do conidióforo sem, contudo impedir que seus componentes sejam formados (MILLER *et. al.*, 1992).

A mutação *stuA* causa a formação de conidióforos curtos que possuem métulas e fiálides anormais. Conídios defeituosos são frequentemente formados diretamente da vesícula do conidióforo. Os mutantes *stuA* são estéreis quando autofecundados (não são capazes de produzir cleistotécios). O gene *stuA* foi clonado por complementação de mutação, em um fragmento de 5,0 kb, que codifica um RNAm de 3,3 kb após a remoção de 3 pequenos íntrons. O nível de expressão deste locus ao longo do desenvolvimento do ciclo assexual do fungo foi estudado por MILLER *et. al.*, (1991). Os resultados indicaram que o transcrito do gene *stuA* encontra-se em níveis muito baixos no conídio, mas aumenta dramaticamente durante o intervalo entre a germinação do conídio e o tempo de aquisição de competência, mantendo-se elevado nas células competentes que não foram induzidas ainda. Após a indução os níveis deste transcrito mantem-se constante ao longo de todo desenvolvimento do conidióforo. Estes dados são consistentes com os dados de análise genética de MARTINELLI (1979) que sugerem que a atividade deste locus é requerida nos eventos precoces do desenvolvimento, mas não é especificamente requerido na diferenciação do conídio. Os dados de MILLER *et. al.*, (1991) também indicam que a transcrição do *stuA* não é afetada por nenhum dos genes ligados ao desenvolvimento, caracterizados até então, e que a ativação da transcrição de *stuA* deve estar relacionada a um locus ou loci ainda não identificado.

Quanto ao mutante *medA*, isolado por CLUTTERBUCK (1969), caracteriza-se por apresentar um número maior de esterígmata, geralmente 4 ou mais, de onde saem os conídios. Este mutante também não consegue reproduzir-se pelo ciclo sexual, devido a sua incapacidade de formar

cleistotécios. O efeito deste gene é autônomo em heterocários e recessivo em diplóides. A análise molecular do gene que acarreta este fenótipo ainda não foi realizada.

GEMS & CLUTTERBUCK (1994) detectou um loci chamado *sthenyo*, o qual tem a capacidade de potencializar os efeitos da mutação no locus *medA*. Dois genes com esta propriedade foram caracterizados e mapeados, porém estudos ao nível molecular não foram realizados.

ZIMMERMANN *et. al.* (1980) isolou um cluster de genes designado *SpoC1*. Os genes deste cluster codificam transcritos específicos encontrados nos conídios, por este motivo este cluster tem sido bastante estudado na tentativa de elucidar uma possível função durante o desenvolvimento do conidióforo e maturação do conídio. MILLER *et. al.*, (1987) estudou a regulação destes genes em função da posição ocupada por eles no cromossomo. Os dados deste autor mostram que os genes pertencentes ao cluster *SpoC1* tornam-se desregulados quando integrados em sítios cromossomais não homólogos, causando o aparecimento de alguns transcritos na hifa que normalmente não acontecem. ARAMAYO *et. al.*, (1989) realizou um estudo para detectar a funcionalidade deste cluster no desenvolvimento, e surpreendentemente quando toda a extensão do cluster é deletada (38 kb) não há alteração morfológica alguma. Portanto o cluster *SpoC1* não é essencial para o desenvolvimento do conídio. Este mesmo autor sugere que estes genes podem estar envolvidos na síntese de metabólitos secundários.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas:

As linhagens de ***A. nidulans*** utilizadas neste trabalho foram:

- a) Linhagem A: possui os marcadores: *proA*₁, *paba* A₆ e possui também um segmento duplicado I→II (NGA & ROPER, 1968).
- b) Linhagem MSE: *suA*₁*adE*₂₀, *wA*₃, *facA*₃₀₃, *galA*₁, *yA*₂, *adE*₂₀ *pyroA*₄, *sB*₃, *nicB*₆ e *riboB*₂ (McCULLY & FORBES, 1965).
- c) Linhagem PPY: *proA*₁, *pabaA*₆ e *yA*₂.
- d) Linhagem Abnc: *proA*₁, *pabaA*₆, *bncA* e duplicação I→II (PIZZIRANI, 1981)
- e) Linhagem MSEbnc: possui os mesmos marcadores da linhagem MSE e mais o gene *bncA* (PIZZIRANI, 1981).
- f) Variantes deteriorados originários da linhagem Abnc: VB1, VB2, VB3, VB4, VB5 e VB6. Variante deteriorado da linhagem A: V17.

As linhagens A, MSE, PPY são derivadas de uma linhagem selvagem de *A. nidulans* isolada por YUILL (1939) no Departamento de Genética da Universidade de Glasgow, Escócia. Estas linhagens foram cedidas pelo Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra. As linhagens MSEbnc e Abnc foram obtidas no Setor de Genética de Microrganismos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP).

Os mapas parciais de ligação de cada linhagem estão esquematizados nas figuras 1, 2, 3, 4 e 5.

Figura 1: Mapa de ligação e marcadores genéticos da linhagem A.

O = centrômero

proA₁ = requer prolina

pabaA₆ = requer ácido-p-aminobenzóico

yA₂ = conídios amarelos

adE₂₀ = requer adenina

biA₁ = requer biotina

Figura 2: Mapa de ligação e marcadores genéticos da linhagem MSE.

O = centrômero

suA₁adE₂₀ = supressor do mutante *adE₂₀*

wA₃ = conídios brancos

galA₁ = incapacidade para utilizar galactose

pyroA₄ = requer piridoxina

facA₃₀₃ = incapacidade para utilizar acetato

sB₃ = requer tiosulfato

nicB₈ = requer nicotinamida

riboB₂ = requer riboflavina

Figura 3: Mapa de ligação e marcadores genéticos da linhagem Abnc.

O = centrômero

proA₁ = requer prolina

pabaA₆ = requer ácido-p-aminobenzóico

yA₂ = conídios amarelos

adE₂₀ = requer adenina

biA₁ = requer biotina

bncA₁ = produz conídios bi e trinucleados

Figura 4: Mapa de ligação e marcadores genéticos da linhagem MSEbnc.

O = centrômero

suA₁adE₂₀ = supressor do mutante *adE₂₀*

wA₃ = conídios brancos

galA₁ = incapacidade para utilizar galactose

pyroA₄ = requer piridoxina

facA₃₀₃ = incapacidade para utilizar acetato

sB₃ = requer tiosulfato

nicB₈ = requer nicotinamida

riboB₂ = requer riboflavina

bncA₁ = produz conídios bi e trinucleados

Figura 5: Mapa de ligação e marcadores genéticos da linhagem PPY.

O = centrômero

proA₁ = requer prolina

pabaA₆ = requer ácido *p*-aminobenzóico

yA₂ = conídios amarelos

3.2. Meios de cultura e soluções

3.2.1. Meio Mínimo (PONTECORVO *et. al.*, 1953)

NaNO ₃	0,6 %
KH ₂ PO ₄	0,15 %
KCl.....	0,05%
MgSO ₄ . 7 H ₂ O.....	0,05%
FeSO ₄	0,0001%
ZnSO ₄	0,0001%
Glicose.....	1,0 %
Ágar.....	1,5 %

Adicionou-se água destilada e ajustou-se o pH para 6,8 com NaOH 1N.

3.2.2. Meio Completo Modificado (AZEVEDO e COSTA, 1973)

Adicionou-se ao meio mínimo:

Peptona.....	0,2%
Caseína hidrolisada.....	0,15%
Extrato de levedura.....	0,05%
Solução de vitaminas.....	0,1 %
Solução de ácidos nucleicos.....	0,25 %

Adicionou-se água destilada e ajustou-se o pH para 6,8 com NaOH 1N.

3.2.3. Meio Mínimo acrescido de Galactose (ROBERTS, 1959)

Galactose.....	1,0 %
Ágar.....	1,5 %

Adicionou-se Meio Mínimo líquido sem glicose, e ajustou-se o pH para 6,0 com NaOH 1N.

3.2.4. Meio mínimo de Acetato de Amônio (APIRION, 1962)

Acetato de amônio.....	1,2 %
KH ₂ PO ₄	4,3 %
NaCl.....	0,2 %
MgSO ₄ . 7 H ₂ O.....	0,05 %
FeSO ₄	0,001 %
ZnSO ₄	0,001 %
Ágar.....	15,00%

Adicionou-se água destilada e ajustou-se o pH para 6,1 com NaOH 1N.

3.2.5. Meio Completo Líquido

Preparado segundo o item 3.2.2. sem ágar.

3.2.6. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo (PONTECORVO *et. al.*, 1953)

Adicionou-se ao Meio Mínimo (item 3.2.1. sem ágar) 2% de Meio Completo Líquido (item 3.2.5.). Distribui-se em tubos de ensaio um volume de 2,5 ml e foi feita a autoclavagem.

3.2.7. Meio de Indução de Ascosporogênese (ACHA & VILLANUEVA, 1961)

Oxalato de Amônio.....	0,3 %
K ₂ HPO ₄	0,1 %
MgSO ₄	0,05 %
KCl.....	0,05 %
FeSO ₄	0,005 %
Sacarose.....	3,0 %
Ágar.....	1,5 %

Adicionou-se água destilada e ajustou-se o pH para 6,8 com NaOH 1N.

3.2.8. Solução Salina (NaCl 0,85 %):adicionou-se um volume de 9,0 ml por frasco e feita a autoclavagem.

3.2.9. Solução de Tween 80 (0,01 %): o tween foi diluído em água destilada. Foi adicionado um volume de 2,5 ml por frasco e feita a autoclavagem.

3.2.10. Solução de Vitaminas

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

A solução foi aquecida em banho-maria durante 15 minutos à 100° C e guardada em frasco escuro sob refrigeração.

3.2.11. Solução Estoque de Benlate (metil-butil-carbamoil-2-benzimidazole carbamato) (HASTIE, 1970)

Benlate (50% benomil).....	2,0 mg/ml
----------------------------	-----------

O benlate foi dissolvido em uma gota de acetona, e em seguida foi adicionada a água destilada. A solução foi aquecida em banho-maria durante 15 minutos à 100° C.

3.2.12. Solução de p-fluorfenilalanina (pFA) 1%

O pFA foi diluído em água destilada esterilizada, sendo aquecido em banho-maria durante 15 minutos à 100° C.e guardado sob refrigeração.

3.2.13. Tampão Fosfato 0,2 M pH 7,0

Solução A

0,2 M de Na_2HPO_4 em água destilada esterilizada.

Solução B

0,2 M de KH_2PO_4 em água destilada esterilizada.

O Tampão Fosfato 0,2 M pH 7,0 foi feito adicionando-se 7 partes da solução A à 3 partes da solução B. pH final 7,0. A esterilização foi feita por autoclavagem.

3.2.14. Tampão Fosfato 0,2 M pH 5,8

Solução A

0,2 M de NaH_2PO_4 em água destilada esterilizada.

Solução B

0,2 M de Na_2HPO_4 em água destilada esterilizada.

O Tampão Fosfato 0,2 M pH 5,8 foi feito adicionando-se 920 ml da solução A à 80 ml da solução B. pH final 5,8. A esterilização foi feita por autoclavagem.

3.2.15. Solução de HCl 1N: A solução foi conservada em frasco escuro, à temperatura ambiente.

3.2.16. Solução de Giemsa

1 g de Giemsa

66 ml de Glicerol

66 ml de Metanol

Foi adicionado Giemsa ao glicerol aquecido à 60° C. Após o resfriamento, foi acrescentado o metanol, e solução foi filtrada em gase. A conservação foi feita em frasco escuro à temperatura ambiente.

3.2.17. Solução de KCl 0,6 M diluído em Tampão Fosfato 0,2 M pH 5,8.

3.2.18. Tampão NDS

0,5 M de NaEDTA pH 8,0

10 mM de Tris-HCl pH 9,5

1% de Lauril Sarcosinato

3.2.19. Solução de EDTA 50 mM: o EDTA foi dissolvido em água destilada esterilizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e a estocagem da mesma foi feita à temperatura ambiente.

3.2.20. Tampão de Corrida TBE 5x

0,89 M Trizma Base

0,89 M H₃BO₃

0,08 M EDTA

O tampão foi filtrado em papel de filtro Whatman para retirada de qualquer precipitado e o pH corrigido para 8,3. A esterilização foi feita por autoclavagem e o tampão estocado sob refrigeração.

3.2.21. Solução de Fixação

6 ml de Etanol

1 ml de Ácido Acético Glacial

1 ml de Ácido Lático

A solução de Fixação foi preparada no momento do uso dentro da capela de exaustão.

3.2.22. Solução estoque de requisitos nutricionais

As soluções estoque foram preparadas adicionando-se água destilada esterilizada à cada uma das substâncias. As soluções foram aquecidas em banho-maria por 15 minutos e foram guardados sob refrigeração.

SOLUÇÃO ESTOQUE	mg/100ml de H ₂ O	Concentração final no meio de cultura (µg/ml)
Adenina	500,0	25,00
Ácido nicotínico	10,0	0,50
Ác. p-aminobenzóico	5,0	0,25
Biotina	4,0	0,20
Metionina	1000,0	50,00
Piridoxina	5,0	0,25
Prolina	1000,0	50,00
Riboflavina	10,0	0,50
Tiosulfato de Sódio	2000,0	100,00

3.3. Técnicas de análise genética

3.3.1. Isolamento dos setores deteriorados da linhagem Abnc

O isolamento dos setores deteriorados da linhagem Abnc foi feito por meio da inoculação de um ponto feito com palito esterilizado ou alça de platina na região central de uma placa de Petri contendo Meio Completo. As placas de Petri foram incubadas à 37° C durante 7 dias.

3.3.2. Obtenção de heterocário

Métodos de obtenção de película heterocariótica (análise genética via ciclo sexual e via ciclo parassexual):

a) Método do tubo de ensaio (PONTECORVO *et al.*, 1953): os conídios das duas linhagens a serem cruzadas (aproximadamente 1×10^7), foram colocados em um tubo de ensaio contendo Meio Mínimo mais 2% de Meio Completo Líquido. Esta mistura foi incubada durante 72 horas à 37° C.

b) Método da gota: foi feita uma suspensão de conídios das duas linhagens à serem cruzadas em Meio Mínimo mais 2% de Meio Completo Líquido. Com uma pipeta foram feitas gotas desta suspensão no fundo de uma placa de Petri de plástico esterilizada e vazia. Na tampa da placa foi colocado um papel de filtro umedecido com água destilada estéril com o objetivo de manter a umidade no ambiente interno da placa de Petri. As placas contendo as gotas foram incubadas por 24 horas à 37° C. Em seguida as películas formadas a partir das gotas foram transferidas para Meio Mínimo.

c) **Método do Poço:** em uma placa de Meio Mínimo foram feitos pequenos orifícios de diâmetro aproximado de 1 cm com auxílio de um tubo de ensaio com a extremidade esterilizada. Foi feita uma suspensão de conídios das duas linhagens que se desejava cruzar. Os poços foram preenchidos com esta suspensão e a placa incubada por 8 dias à 37°C.

d) **Método do Bloco:** as duas linhagens que se desejava cruzar foram inoculadas por ponto à 1 cm de distância uma da outra em uma mesma placa de Petri contendo Meio Completo. Após 72 horas de crescimento à 37° C, cortou-se um pequeno bloco do meio de cultura na linha de crescimento em que as duas linhagens se encontravam. Este bloco que continha as duas linhagens foi colocado em uma placa de Petri contendo Meio Mínimo.

3.3.3. Isolamento de Diplóides (ROPER, 1952)

Para o isolamento dos diplóides o método usado para obtenção dos heterocários foi o descrito na letra a) do item 3.3.2. Após a formação da película heterocariótica, esta foi transferida para uma placa de Petri contendo Meio Mínimo, a qual foi incubada durante 7 dias à 37° C. Após este período os conídios foram coletados com o auxílio de uma alça de platina, e colocados em um tubo de ensaio com Tween 80 a fim de se obter uma concentração de 1×10^7 . Esta suspensão de conídios foi diluída várias vezes e semeada em Meio Mínimo.

Os conídios que germinaram no Meio Mínimo ou eram diplóides ou heterocarióticos, sendo que as colônias provenientes de conídios heterocarióticos tem um fenótipo bastante característico e puderam ser

facilmente distinguidas das colônias provenientes de conídios diplóides. Os critérios usados para caracterizar os diplóides foram: a) capacidade de crescer em Meio Mínimo; b) coloração da colônia; c) tamanho do conídio. O diâmetro dos conídios foi calculado com base nas medidas obtidas por meio de ocular micrométrica e pela medida dos conídios em fotomicrografia.

3.3.4. Análise Mitótica via Ciclo Parassexual

As colônias haplóides usadas na análise mitótica foram obtidas por meio da haploidização dos diplóides isolados pela metodologia descrita no item 3.3.3. Uma forma de agilizar o processo de haploidização foi por meio do uso de agentes haploidizantes como o Benomyl (1,4 µg/ml) e o pFA (500 a 600 µg/ml) os quais agem na divisão mitótica provocando a perda de grupos de ligação das duas linhagens ao acaso. Estes agentes haploidizantes foram adicionados à placas de Petri com Meio Completo e os diplóides foram aí inoculados por ponto, os setores haplóides gerados no processo de haploidização foram purificados por, no mínimo, 2 ciclos de inoculação por estria em Meio Completo. Após 8 dias de incubação à 37° C as colônias selecionadas foram transferidas para uma placa mestra com 26 pontos e a mesma foi testada para todas os marcadores genéticos envolvidos na análise com auxílio de um replicador multifio (AZEVEDO *et. al.*, 1976). As leituras da análise genética foram feitas após 24 e 48 horas de crescimento à 37° C.

3.3.5. Análise Meiótica via Ciclo Sexual (PONTECORVO *et. al.*, 1953)

Para indução do ciclo sexual as placas de heterocário feitas segundo o item 3.3.2. foram vedadas com fita adesiva. Após 8 dias de crescimento à 37° C as placas foram analisadas sob microscópio estereoscópio com o intuito de se verificar a presença de corpos de frutificação (cleistotécios). Foram selecionados, os cleistotécios maiores e mais escuros, os quais foram transferidos para um tubo de ensaio contendo Tween 80. Os corpos de frutificação foram esmagados contra a parede do tubo com ajuda de uma pipeta esterilizada. Os ascósporos em suspensão foram então diluídos em 9 ml de solução salina, e um volume de 0,1 ml semeado em placas de Petri contendo Meio Completo. A incubação foi feita durante 72 horas. Após este período as colônias foram purificadas e inoculadas em placa mestra com 26 pontos, de onde foram transferidas com replicador multifio (AZEVEDO *et. al.*, 1976) para os meios seletivos para o teste de marcadores genéticos. Foram feitas 2 leituras, a primeira após 24 e a segunda após 48 horas de crescimento.

Os dados da análise genética pelo ciclo sexual permitiram a organização dos marcadores em grupos de ligação. Para saber se dois loci estavam ligados foi aplicada a fórmula abaixo. Foi feito teste do χ^2 para testar a segregação e feito o cálculo do desvio-padrão da média.

$$C = \frac{R}{T} \times 100 \quad \text{onde:}$$

C = frequência de recombinação

R = número de colônias recombinantes

T = número total de colônias analisadas

3.4. Conidiogênese

Para que as estruturas morfológicas envolvidas no desenvolvimento assexual do fungo ***A. nidulans*** pudessem ser analisadas ao longo do tempo foram realizados vários experimentos de conidiogênese. Para tanto os conídios do fungo foram semeados em placas de Petri contendo o Meio de Cultura desejado. Após espalhar os conídios pela superfície do meio com auxílio de uma alça de vidro, pequenos retângulos de 0,7 x 2,0 cm de membranas de diálise duplas, esterilizadas em autoclave foram gentilmente colocadas sobre o meio, de modo a possibilitar os conídios crescerem sobre as mesmas (teve-se o cuidado de evitar bolhas de ar entre a membrana de diálise e o Meio de Cultura). Este sistema foi colocado para crescer em estufa à 37° C. Nos tempos previamente determinados o crescimento foi interrompido recortando-se, com uma espátula esterilizada, os blocos de meio sobre os quais as membranas de diálise se encontravam posicionadas. Os blocos contendo as membranas foram guardados sob refrigeração até o momento de sua preparação e análise ao microscópio óptico, e as demais membranas retornadas à estufa para que o fungo continuasse crescendo sobre as mesmas até o próximo tempo pré-determinado.

Além da conidiogênese sobre membrana de diálise foi realizada conidiogênese sobre lamínula. Esta metodologia difere da primeira no que se refere ao inóculo. A lamínula esterilizada foi colocada sobre o Meio de Cultura e o inóculo foi feito por ponto no limite entre o Meio de Cultura e a lamínula. Nos tempos pré-determinados os blocos contendo as lamínulas foram recortados do

Meio de Cultura como foi descrito anteriormente para conidiogênese em membrana de diálise.

3.5. Coloração de Núcleos (LUNA, 1985)

Para coloração de núcleos em diferentes estágios de desenvolvimento assexuado, as colônias foram crescidas sobre membrana de diálise ou lamínula (item 3.4.), nos vários tempos determinados. A fixação foi feita com solução de álcool e ácidos (item 3.2.21.) durante 30 minutos. Em seguida as membranas ou lamínulas passaram por uma série alcoólica (etanol 90%, 70% e 50%) de 5 minutos para cada concentração. A hidrólise foi realizada em HCl 1N por 15 minutos à 63^o C em banho-maria. Esta etapa representou a parte mais delicada do processo de coloração de núcleos, uma vez não sendo precisa acarreta a lise das células. Imediatamente após este período de hidrólise as membranas foram lavadas em água destilada esterilizada, por 3 vezes durante 10 minutos. A tamponagem foi feita em tampão fosfato 0,2 M pH 7,0 (item 3.2.13.) durante no mínimo 1 hora. A coloração foi feita adicionando-se 2ml de Giemsa à 10 ml de Tampão Fosfato 0,2 M pH 7,0 (item 3.2.13) durante 15 minutos para membrana de diálise e 25 minutos para lamínula. Após a coloração as membranas e as lamínulas foram lavadas no Tampão Fosfato 0,2 M pH 7,0, até que o excesso do corante fosse eliminado. A montagem das lâminas foi feita colocando-se a lamínula corada sobre uma lâmina de vidro e o sistema foi vedado com parafina. A vedação da lâmina feita com membrana de diálise foi feita também com parafina e usou-se uma lamínula sobre a membrana para proteção do material corado.

A observação da morfologia das estruturas de desenvolvimento assexual foi feita em microscópio óptico, e as fotomicrografias feitas nos aumentos de 40 vezes e 100 vezes com óleo de imersão.

3.6. Obtenção de Protoplastos

Os conídios das linhagens a serem protoplastizadas foram inoculados em placa de Petri contendo Meio Completo, durante 4 dias à 37° C. Após este período os conídios foram coletados com auxílio de alça de platina esterilizada e foi feita uma suspensão de conídios em Tween 80 em uma concentração de aproximadamente 1×10^7 conídios/ml. Desta suspensão uma alíquota de 1 ml foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de Meio Completo Líquido (item 3.2.5.) os quais foram colocados sob agitação de 120 rpm durante 18 horas, à 37° C. O micélio foi coletado por filtração em filtro de Buchner, e pesado. A digestão da parede celular foi feita adicionando-se 1ml de Solução de KCl 0,6 M pH 5,8 para cada 40 mg de micélio e 5 % de enzima lítica (2mg de Novozym e 2 mg de celulase Onozuka), o período de digestão variou de 1,3 à 2 horas sob agitação branda à temperatura de 37° C. Ao final deste tempo a suspensão de células foi passada por uma seringa com lã de vidro esterilizada, para separar os protoplastos do micélio não digerido. Os protoplastos foram coletados em um tubo de centrífuga esterilizado previamente e passaram por uma bateria de 3 lavagens em Solução de KCl 0,6 M pH 5,8 e centrifugação em Centrífuga de mesa "Baby" à 4000 rpm durante 5 minutos. Ao final os protoplastos foram

ressuspensos em 500 µl da mesma Solução de KCl 0,6 M pH 5,8, de modo a se obter uma concentração, igual ou superiores à 1×10^8 protoplastos/ml.

3.7. Inclusão dos Protoplastos em Agarose LGT

Os protoplastos obtidos conforme a descrição no item 3.3.8. foram transferidos para tubo Eppendorf e mantidos à 42° C. A agarose LGT (Low gelling temperature) foi preparada em Solução de KCl 0,6 M pH 5,8 em uma concentração de 1,4%, dissolvida, e mantida à 42° C. Em seguida, volumes iguais da suspensão de protoplastos e de agarose LGT 1,4% foram misturados, homogeneizados e lentamente colocados em um molde próprio para a confecção dos "plugs", os quais foram submetidos à uma temperatura abaixo de zero durante 10 minutos para que solidificassem. Os "plugs" ou inclusões foram removidos do molde e colocados em tubo Falcon contendo Tampão NDS (item 3.2.18.) e Proteinase K na concentração de 0,1 %, este sistema de digestão foi mantido à 50° C durante 24 horas. Após este período os "plugs" foram retirados do NDS e lavados em Solução de EDTA 50 mM (item 3.2.19.) por 3 vezes. A primeira lavagem foi feita à 50° C durante 30 minutos e as demais foram feitas à temperatura ambiente também durante 30 minutos. A estocagem dos "plugs" foi feita nesta mesma solução de EDTA 50 mM à 4° C, permanecendo viável por um período de até 6 meses.

3.8. Preparo do Gel de Agarose para Eletroforese em Campo

Pulsado

O suporte utilizado para a Eletroforese em Campo Pulsado foi agarose da marca Sigma usada em uma concentração de 0,8%, preparada em Tampão TEB 0,5 x. Pequenas fatias dos plugs (4 mm x 7 mm) foram cortadas sobre uma placa de Petri esterilizada com auxílio de uma espátula igualmente esterilizada, estas amostras de plug foram colocadas uma a uma dentro das canaletas do gel. Uma vez que todas as canaletas foram preenchidas, vedou-se as mesmas com a agarose restante do preparo do gel. O tampão de corrida utilizado foi TEB 0,5 x. O volume necessário para a corrida foi de 2 litros. Os parâmetros eletroforéticos de corrida incluem 3 programas: o primeiro deles de 73 horas com pulsos de 3000 segundos; o segundo de 18 horas com pulsos de 2700 segundos e o último de 73 horas com pulsos de 2200 segundos. A voltagem usada foi de 48 volts. A coloração do gel após os 7 dias de corrida foi feito com Brometo de Etídio durante 30 minutos. O equipamento usado para realizar a eletroforese em campo pulsado foi o CHEF DRII Drive Module, da marca BIORAD.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Construção e Caracterização da Linhagem Abnc

4.1.1. Porcentagem de Conídios Bi e Trinucleados da Linhagem Abnc

Os variantes deteriorados estudados neste trabalho foram obtidos a partir da linhagem Abnc, a qual foi construída por meio de cruzamento entre a linhagem A e a linhagem MSEbnc (PIZZIRANI, 1977). Quando o gene foi transferido para a linhagem A, fez-se a contagem dos conídios bi e trinucleados, que é o principal caráter apresentado por este mutante. As porcentagens de conídios bi e trinucleados obtidos neste trabalho são concordantes com os dados de PIZZIRANI-KLEINER & AZEVEDO (1986a). Os resultados da Tabela 1 mostram que a linhagem Abnc apresenta o fenótipo característico da mutação *bncA1*. A preparação do material usado para esta análise foi Giemsa-HCl. Os resultados expressam a média de 3 repetições.

Segundo PIZZIRANI-KLEINER (1981) todas as linhagens com menos de 99% de conídios uninucleados são consideradas como sendo portadoras do gene *bncA*. No presente trabalho o mesmo será considerado,

apesar da linhagem controle apresentar uma porcentagem de conídios uninucleados de 100%.

Tabela 1. Porcentagem de conídios bi e trinucleados dos variantes deteriorados binucleados e da linhagem controle.

Linhagem	Uninucleado %	Binucleado %	Trinucleado %	Número total de conídios
A	100	0	0	627
Abnc	77,51	22,4	0,09	500
VB1	81,9	17,9	0,1	536
VB2	85,8	14	0,2	500
VB3	73,3	25,6	0,9	308
VB4	81,7	17,4	0,9	503
VB5	86,1	12,8	0,9	512
VB6	93,4	6,5	0	518

4.1.2. Análise Mitótica e Meiótica

A análise mitótica (Tabela 2) e meiótica (Tabela 3) da linhagem Abnc foi feita com o objetivo de localizar a transferência da mutação *bncA1* para a linhagem A duplicada.

Os dados da análise mitótica demonstram claramente que o gene *bncA* está localizado no grupo de ligação IV. Para chegar a esta conclusão foram consideradas 4 classes fenotípicas: conídios uninucleados/*pyroA4*⁻, conídios uninucleados/*pyroA4*⁺, conídios binucleados/*pyroA4*⁻, e conídios

binucleados/*pyroA4*⁺. Como o caráter binucleado segrega juntamente com o marcador *pyroA4*, e não há recombinantes entre as marcas pode-se concluir que ambos, *bncA1* e *pyroA4*, estão no mesmo grupo de ligação.

Para determinar a distância entre o gene *bncA* e o marcador *pyroA4*, foi realizado um cruzamento sexual entre a linhagem Abnc e a linhagem testadora MSE. Os resultados da Tabela 3 detectaram que os dois marcadores estão bastante distantes um do outro. Cerca de 40 unidades de recombinação separam *bncA1* de *pyroA4*. PIZZIRANI-KLEINER (1981) detectou um total de 41,9 unidades de recombinação entre *bncA1* e *pyroA4*. Esta diferença não parece ser significativa, principalmente pelo fato dos genes estarem muito distantes um do outro, estes valores podem sofrer desvios. Esta mesma autora utilizou um segundo marcador *methG1* que localiza-se a 22,7 unidades de recombinação de *bncA1*.

O auxonograma da linhagem Abnc (Tabela 4) demonstra que esta é auxotrofia para os marcadores *proA1* e *pabaA6*.

Quanto a mensuração do diâmetro dos conídios da linhagem Abnc, foi feita pela medida dos conídios fotografados. A preparação dos conídios usados para a tomada dos dados foi feita com Giemsa (item 3.5.) e os mesmos foram fotografados e posteriormente medidos, com exceção dos conídios trinucleados que foram medidos com auxílio de ocular micrométrica, medindo 5,23 x 5,25 μm , com desvio-padrão de $\pm 0,65 \times 0,42$. O mesmo método de coloração foi usado para a determinação da porcentagem de conídios bi e trinucleados (Tabela 5).

Tabela 2. Análise mitótica do cruzamento Abnc x MSE.

Grupo de ligação	marcador	normal	binucleado
I	<i>pro⁺ paba⁺</i>	20	5
	<i>pro⁻ paba⁻</i>	18	0
II	<i>w⁺</i>	14	2
	<i>w⁻</i>	24	3
III	<i>gal⁺</i>	9	2
	<i>gal⁻</i>	29	3
IV	<i>pyro⁺</i>	0	5
	<i>pyro⁻</i>	38	0
V	<i>fac⁺</i>	15	5
	<i>fac⁻</i>	23	0
VI	<i>tio⁺</i>	21	5
	<i>tio⁻</i>	17	0
VII	<i>nic⁺</i>	14	3
	<i>nic⁻</i>	24	2
VIII	<i>ribo⁺</i>	26	4
	<i>ribo⁻</i>	12	1
TOTAL DE COLÔNIAS ANALISADAS = 43			

Tabela 3. Análise meiótica do cruzamento *Abnc* x *MSE*.

Grupo de ligação	marcador	normais	binucleados
IV	pyro+	13	7
	pyro-	24	8
TOTAL		53 colônias	

Recombinantes: pyro+ uninucleado = 13

pyro- binucleado = 8

Frequência de recombinação: 0,40

Distância entre as marcas:

4.2. Isolamento e Caracterização Morfológica dos Setores

Deteriorados

A linhagem Abnc foi inoculada por ponto no centro de uma placa de Petri num total de 70 placas. O mesmo foi feito com a linhagem A, para que se pudesse fazer uma comparação entre as duas linhagens quanto aos tipos de setores emitidos, bem como a frequência dos mesmos. Os resultados estão na Tabela 6.

Alguns autores observaram o efeito das alterações ambientais sobre a instabilidade das linhagens duplicadas (NIFFINEGGER-SOUZA, 1979; PIZZIRANI-KLEINER, 1981; FAVRAUD, 1984). Esta sensibilidade às condições ambientais pode levar a uma variação muito grande na frequência de setores emitidos pelas linhagens duplicadas. AZEVEDO (1975) obteve uma média de 3,1 setores/placa para a linhagem A, MONTEIRO (1989) obteve um total de 1,26 setores/colônia inoculada e PIZZIRANI-KLEINER (1981) obteve cerca de 2,89 setores/placa para a linhagem A e 1,30 para a linhagem Abnc, sugerindo que o gene *bncA* poderia agir como um estabilizador parcial da linhagem.

Os números obtidos neste trabalho para a linhagem Abnc e para a linhagem A (Tabela 6) indicam uma redução na emissão de setores da linhagem A quando comparados aos dados obtidos por AZEVEDO (1975) e PIZZIRANI-KLEINER (1981). Para a linhagem Abnc os dados são concordantes, uma vez que os setores apareceram em um número aproximadamente de 1,45 setores/placa.

Com relação aos tipos de setores produzidos pela linhagem Abnc observa-se que os setores deteriorados e os setores com característica de

aneuplóide (KÄFFER & UPSHALL, 1973) são os mais frequentes. Estas diferenças entre os dados, provavelmente se devem a diferenças ambientais como preparação do meio de cultura e temperatura de incubação. O fato da linhagem usada neste trabalho não ter sido retirada do estoque do Laboratório de Genética de Microrganismos ESALQ/USP, e sim construída recentemente, portanto não é a mesma utilizada por PIZZIRANI-KLEINER (1981) poderia também justificar as discrepâncias observadas nos dados. Todos estes fatores podem ter sido suficientes para provocar os desvios de frequência apresentados aqui, uma vez que a linhagem com duplicação é extremamente susceptível às alterações do ambiente (LIEBER, 1976), e também é influenciada pelo "background" genético.

Com relação à instabilidade dos setores deteriorados isolados pode-se afirmar que dos 56 setores emitidos, 11 mostraram-se suficientemente estáveis para análise. Os demais reverteram ao fenótipo normal no decorrer das repicagens feitas para se obter colônias puras. Dentre estes 11 setores deteriorados estáveis foram escolhidos 6 que demonstraram possuir fenótipo deteriorado bastante característico, porém com o passar do tempo estes 6 que foram inicialmente considerados estáveis mudaram sua morfologia. A Figura 6 mostra o fenótipo dos 6 variantes deteriorados quando foram inicialmente isolados.

A Tabela 7 mostra a descrição morfológica destes 6 variantes deteriorados.

Foi feita a auxonografia dos 6 variantes deteriorados (Tabela 4) confirmando os marcadores auxotróficos para *proA1* e *pabaA6*.

Para melhor caracterizar os variantes deteriorados, foi medido o diâmetro dos conídios em função do número de núcleos presente (Tabela 5). Foi feita também a quantificação da esporulação dos variantes deteriorados incubados em Meio Completo e em Meio Completo suplementado de estabilizador osmótico, KCl 0,6M (Tabela 8).

A Tabela 5 mostra as médias de duas medidas do diâmetro dos conídios. Foram feitas duas medidas porque muitos dos conídios binucleados possuem um formato ovalado, então procedeu-se a medida do eixo maior, e do eixo menor. Este fato fica bastante claro quando se analisa a Tabela 5, pois o diâmetro dos conídios binucleados varia de 4,10 à 5,10 μ m, enquanto que os conídios uninucleados variam em diâmetro, no máximo de 3,50 à 3,60 μ m. Estas medidas foram feitas a partir da fotomicrografia dos conídios corados pelo método de Giemsa. PIZZIRANI-KLEINER (1981) obteve 3,47 μ m para conídios uninucleados e 4,21 μ m para conídios binucleados; os desvios-padrão foram menores: 0,25 para conídios uninucleados e 0,28 para conídios binucleados. Os conídios trinucleados foram medidos com ocular micrométrica e não a partir de fotomicrografias, por este motivo os dados foram excluídos da Tabela 5. Variaram de 5,06 x 5,37 μ m à 5,13 x 5,40 μ m dentre os 6 variantes deteriorados, com desvio-padrão entre $\pm 0,22 \times 0,34$ e $\pm 0,21 \times 0,27$.

A quantificação da esporulação foi calculada em função de uma área de 38,5mm². Os valores da Tabela 8 estão expressos em número de conídios/ml. Alguns variantes deteriorados tem uma produção de conídios que chega a ser quase 10 vezes menor que aquela apresentada pelas linhagens controle, com e sem o gene *bncA*, sugerindo que a presença do gene que conduz a formação de conídios bi e trinucleados não leva a uma menor

esporulação, talvez este caráter seja dado pelo determinante de deterioração, como já foi inúmeras vezes atribuído aos variantes deteriorados a característica de baixa taxa de esporulação (AZEVEDO & ROPER, 1970; NIFFINEGGER-SOUZA, 1979; QUEIRÓZ, 1988; MONTEIRO, 1989). O variante VB6 é o que apresenta menor taxa de esporulação, o que vem a confirmar as observações ao nível microscópico de que este variante esporula menos do que os demais. Porém quando em Meio Completo suplementado de estabilizador osmótico este variante tem maior esporulação. Este fato pode ser observado em quase todos os variantes, exceto VB1.

Tabela 4. Auxonografia da linhagem Abnc e dos variantes deteriorados binucleados.

Linhagem	<i>proA</i> ₁	<i>pabaA</i> ₆	<i>galA</i> ₁	<i>facA</i> ₃₀₃	<i>pyroA</i> ₄	<i>nicB</i> ₆	<i>sB</i> ₃	<i>riboB</i> ₂
MSE	+	+	-	-	-	-	-	-
Abnc	-	-	+	+	+	+	+	+
VB1	-	-	+	+	+	+	+	+
VB2	-	-	+	+	+	+	+	+
VB3	-	-	+	+	+	+	+	+
VB4	-	-	+	+	+	+	+	+
VB5	-	-	+	+	+	+	+	+
VB6	-	-	+	+	+	+	+	+

Tabela 5. Medida do diâmetro (em μm) dos conídios uni e binucleados.

Linhagem	Uninucleados		Binucleados	
	x	s	x	s
MSE	3,80 x 3,82	0,11; 0,23	-	-
A	3,83 x 3,84	0,33; 0,28	-	-
Abnc	3,95 x 3,95	0,28; 0,28	4,68 x 5,00	0,28 ; 0,53
VB1	3,54 x 3,53	0,26; 0,31	4,53 x 4,89	0,44; 0,60
VB2	3,50 x 3,50	0,35; 0,35	4,82 x 5,10	0,45; 0,55
VB3	3,67 x 3,67	0,23; 0,23	4,10 x 4,10	0,35; 0,35
VB4	3,60 x 3,50	0,32; 0,35	4,19 x 4,82	0,36; 0,67
VB5	3,62 x 3,67	0,29; 0,26	4,23 x 4,75	0,54; 0,41
VB6	3,78 x 3,78	0,35; 0,35	4,53 x 4,88	0,50; 0,41

Figura 6. a) Variantes deteriorados provenientes da linhagem Abnc, crescidos à 37°C por 8 dias. b) cadeias de conídios uninucleados e binucleados da linhagem Abnc.

Tabela 6. Número, frequência e tipos de setores emitidos pelas linhagens Abnc e A, em 70 colônias analisadas.

TIPOS DE SETORES	LINHAGEM	
	A	Abnc
MELHORADOS	57 (0,75)	26 (0,25)
DETERIORADOS	4 (0,05)	56 (0,55)
HETEROCARIÓTICOS	15 (0,20)	20 (0,20)
TOTAL	76	102
NÚMERO DE SETORES/COLÔNIA	1,08	1,45

Tabela 7. Descrição morfológica dos variantes deteriorados isolados.

VARIANTE	MORFOLOGIA
DETERIORADO	
VB1	Poucos esporos, granulados, coloração verde. Bordas regulares, micélio marrom claro. Fundo da placa avermelhado.
VB2	Esporulação mais intensa quando comparado aos outros. Esporos de coloração verde, bordas irregulares, micélio marrom claro.
VB3	Poucos esporos, coloração verde, bordas muito irregulares, crescimento reduzido, micélio marrom, fundo da placa avermelhado.
VB4	Poucos esporos de coloração verde, bordas levemente irregulares, micélio creme, fundo da placa levemente avermelhado.
VB5	Esporos um pouco mais abundantes, cor verde, micélio creme, bordas regulares, fundo da placa claro.
VB6	Poucos esporos, coloração branca, micélio rosa, fundo da placa rugoso e bastante róseo.

A descrição morfológica acima foi feita no início do trabalho, sendo que no decorrer das repicagens todos os variantes alteraram sua morfologia, principalmente no tocante à coloração e forma da colônia.

Tabela 8. Quantificação da esporulação das linhagens MSEbnc, Abnc, A, MSE e dos variantes deteriorados originários da linhagem Abnc, frente a dois Meios de cultura diferentes.

Linhagem	Meio Completo	Meio Completo + KCl
	Conídios/ml	Conídios/ml
A	$2,05 \times 10^6$	-
MSE	$2,15 \times 10^6$	$2,17 \times 10^6$
Abnc	$3,00 \times 10^5$	$7,25 \times 10^5$
MSEbnc	$2,17 \times 10^6$	$3,97 \times 10^6$
VB1	$8,56 \times 10^5$	$8,25 \times 10^5$
VB2	$2,30 \times 10^5$	$1,55 \times 10^6$
VB3	$1,15 \times 10^5$	$2,02 \times 10^6$
VB4	$3,00 \times 10^5$	$8,25 \times 10^5$
VB5	$8,30 \times 10^5$	$1,00 \times 10^6$
VB6	$8,00 \times 10^4$	$1,45 \times 10^6$

4.3. Cariótipo Eletroforético dos Variantes Deteriorados

A técnica de eletroforese em campo pulsado possibilitou a separação dos cromossomos de *A. nidulans* (BRODY & CARBON, 1989), e veio mais uma vez a corroborar as observações feitas por experimentos de Genética Clássica onde haviam sido identificados 8 grupos de ligação para este organismo. Pelo número de marcadores genéticos, pelos dados de ligação entre estes marcadores e pelos dados de estudos de linhagens com deleções foi possível traçar 8 cromossomos para este fungo.

Com o aprimoramento da técnica de cariótipo eletroforético, esta passou a ser usada também para localizar genes por meio da hibridização e para estudar as aberrações cromossômicas. QUEIRÓZ (1993) separou os cromossomos de linhagens duplicadas (A e B) de *A. nidulans* e constatou que na linhagem A, a duplicação do cromossomo I translocada para o cromossomo II, é constituída de cerca de 1400 Kb. Esta autora pode comprovar o tamanho do segmento em duplicata, pois este fazia com que a banda correspondente ao cromossomo II mudasse completamente de lugar, tendo um peso molecular muito maior. Na linhagem selvagem ou nos variantes melhorados o cromossomo II aparecia em uma banda correspondente à 4,2Mb, nos variantes deteriorados e nas linhagens com duplicação, A e B, o cromossomo II aparecia contido em uma banda de peso molecular de aproximadamente 5,5 Mb. Este padrão foi confirmado pela análise do gel de eletroforese em campo pulsado (Figura 7) realizado neste trabalho, comprovando que todos os 6 variantes deteriorados são portadores da duplicação. Como controle foi utilizado uma linhagem MSEbnc.

Figura 7. Separação de cromossomos em eletroforese de campo pulsado. c: linhagem controle MSEbnc. A numeração de 1 a 6 correspondem aos variantes deteriorados VB1, VB2, VB3, VB4, VB5 e VB6 respectivamente. A numeração à esquerda representa os cromossomos, e à direita o tamanho em megabases.

4.4. Análise Genética

4.4.1. Formação de Heterocário e Obtenção de Colônias

Diplóides

O objetivo de se fazer um heterocário é a obtenção de colônias que tenham núcleos diferentes em um único citoplasma, e que estes núcleos venham se fundir produzindo um diplóide ($2n$). Várias metodologias de obtenção de colônias heterocarióticas foram testadas para os cruzamentos entre os variantes deteriorados e a linhagem testadora MSE. O método da gota sobre uma placa de Petri de plástico (item 3.3.2. b) foi bastante eficiente para os 5 primeiros variantes deteriorados (VB1, VB2, VB3, VB4, VB5), sendo que os setores diplóides surgiram na própria placa do heterocário não havendo necessidade de coletar e semear os conídios em Meio Mínimo (item 3.2.1.). Posteriormente os diplóides foram purificados e a confirmação de que se tratava de uma colônia diplóide foi feita de duas formas: primeiro pela capacidade destas colônias crescerem em Meio Mínimo já que as linhagens parentais possuíam marcadores auxotróficos complementares, e em segundo lugar pela medida do diâmetro dos conídios. Segundo ROPER (1952), a relação de tamanho entre colônias haplóides e diplóides é de 1:1,3. Foi feita coloração de núcleos dos conídios diplóides para verificação do número de núcleos, constatou-se que os conídios são uninucleados na sua totalidade.

4.4.2. Haploidização

O processo de haploidização espontânea consiste na perda sucessiva de cromossomos durante as várias divisões mitóticas (KÄFFER,

1960). Algumas substâncias químicas como *p*-fluorfenilalanina (MORPURGO, 1961), benlate (HASTIE, 1970), e cloroneb (AZEVEDO E SANTANA, 1975) podem ser usadas para induzir a haploidização, geralmente estas drogas agem interferindo com as fibras do fuso mitótico.

Neste trabalho foram ensaiados dois agentes haploidizantes, o benlate (item 3.2.11.) e o *p*-fluorfenilalanina (item 3.2.12.). A haploidização com benlate foi feita adicionando-se ao Meio Completo 1,4µg/ml da droga. Os diplóides foram inoculados por ponto, e as placas de Petri foram incubadas em estufa à 37°C durante 7 dias. O crescimento inicial foi lento, mas de 4 a 6 dias surgiram setores haplóides bastante vigorosos.

Os resultados obtidos com benlate não foram satisfatórios. Pela análise genética das colônias estaria havendo um aumento na permuta mitótica entre os marcadores do cromossomo IV que chega a 3,9%. Uma situação parecida foi descrita por PACCOLA (1982) em que o cloroneb utilizado como agente haploidizante provocaria um aumento na frequência de permuta mitótica, além de selecionar preferencialmente alguns marcadores. Com esta interferência não seria possível localizar o determinante de deterioração nos variantes. Assim sendo outro haploidizante, o *p*-fluorfenilalanina, foi testado e usado na concentração de 500µg/ml. O procedimento usado para a haploidização com *p*-FA foi o mesmo utilizado para benlate. Os setores obtidos com *p*-FA mostraram ser menores e menos delimitados do que aqueles obtidos com benlate, portanto exigiram um maior esforço no momento da purificação.

É interessante notar que em ambas as haploidizações o fenótipo deteriorado sofreu uma pressão de seleção contrária, sendo que não foi possível selecionar nenhum variante deteriorado dentre todas as colônias

haploidizadas, tanto com benlate quanto com ρ -FA. Ao todo foram analisadas 125 colônias para o variante VB1 (111 com benlate, 14 com ρ -FA), 68 para VB2 (47 com benlate, 21 com ρ -FA), 142 para VB3 (128 com benlate, 14 com ρ -FA), 50 para VB4 (30 com benlate, 20 com ρ -FA), 137 para VB5 (121 com benlate, 16 com ρ -FA) e 50 para VB6, sendo que neste último caso não foi necessária a haploidização com ρ -FA devido à clareza da análise apresentada por este variante com haploidização induzida por benlate. A mesma seleção contrária foi obtida por FAVRAUD (1984), esta autora sugere que a ausência do fenótipo deteriorado deve-se à inibição destes haplóides pelo fungicida, ou à sua desvantagem adaptativa com relação aos outros segregantes.

4.4.3. Análise Mitótica

Os dados da análise mitótica que utilizou benlate como agente haploidizante não são aqui apresentados por não serem conclusivos. Apenas o variante VB6 pode ter seu determinante de deterioração localizado pelo ciclo parassexual usando o benlate como agente haploidizante. Este variante teve seu determinante de deterioração mais facilmente localizado porque este não apresentou pressão de seleção negativa tão intensa quanto nos outros variantes. Muitas colônias com o fenótipo deteriorado característico do variante VB6 foram recuperadas na haploidização, talvez isto tenha acontecido devido ao efeito menos drástico do determinante de deterioração deste variante.

Os dados da análise genética pelo ciclo parassexual para o variante VB6 encontram-se na Tabela 9. A partir destes dados fica bastante claro que o determinante de deterioração está presente no grupo de ligação I. Observa-se também que há uma seleção bastante forte contra o grupo de

ligação IV, o que poderia confundir os dados da análise mitótica caso as colônias com fenótipo deteriorado não estivessem presentes. Provavelmente, neste caso a seleção negativa para o cromossomo IV seja devido a um possível efeito deletério do gene *bncA*.

A Tabela 10 mostra a localização do determinante de deterioração dos demais variantes estudados, e a Tabela 11 mostra os números da análise mitótica. Em todos os 5 variantes a haploidização foi feita com p-FA. Entre os 6 variantes, 3 carregam determinante de deterioração no cromossomo I (VB1, VB3, VB6), um deles (VB4) no cromossomo V, e dois deles (VB2 e VB5) não permitiram uma localização precisa. Os resultados da Tabela 11 também demonstram que realmente o cromossomo IV aparece em uma frequência mais baixa que os demais cromossomos, é muito provável que este fato esteja relacionado à presença do gene *bncA*, o qual pode representar uma desvantagem para o fungo que o carrega.

Tabela 9- Análise mitótica do cruzamento VB6 x MSE.

GRUPO DE LIGAÇÃO	MARCADOR	TIPO DE COLÔNIA	
		Normais	Deteriorados
I	<i>pro⁺ paba⁺</i>	21	0
	<i>pro⁻ paba⁻</i>	0	29
II	<i>w⁺</i>	1	0
	<i>w⁻</i>	20	29
III	<i>gal⁺</i>	10	22
	<i>gal⁻</i>	11	7
IV	<i>pyro⁺ bnc⁻</i>	1	7
	<i>pyro⁻ bnc⁺</i>	20	22
V	<i>fac⁺</i>	18	3
	<i>fac⁻</i>	3	26
VI	<i>tio⁺</i>	13	5
	<i>tio⁻</i>	8	24
VII	<i>nic⁺</i>	11	13
	<i>nic⁻</i>	10	16
VIII	<i>ribo⁺</i>	15	20
	<i>ribo⁻</i>	6	9
Total de colônias analisada = 50			

Tabela 10. Localização dos determinantes genéticos de deterioração nos grupos de ligação, e número de colônias analisadas.

VARIANTE BINUCLEADO	GRUPO DE LIGAÇÃO	NÚMERO DE COLÔNIAS
VBI	I	14
VB2*	-	-
VB3	I	14
VB4	V	20
VB5*	-	-
VB6	I	50

* não foi possível determinar o grupo de ligação em que se encontra o determinante de deterioração.

Tabela 11- Análise mitótica dos segregantes VB1, VB2, VB3, VB4, VB5.

GRUPO DE LIGAÇÃO	MARCADOR	VARIANTES NORMAIS				
		VB1	VB2	VB3	VB4	VB5
I	<i>pro- paba-</i>	1	14	0	3	3
	<i>pro+ paba+</i>	13	7	14	17	13
II	<i>w-</i>	8	10	7	14	8
	<i>w+</i>	6	11	7	6	8
III	<i>gal-</i>	8	10	7	14	12
	<i>gal+</i>	6	11	7	6	4
IV	<i>pyro-</i>	10	16	11	15	13
	<i>pyro+</i>	4	5	3	5	3
V	<i>fac-</i>	7	15	8	18	13
	<i>fac+</i>	7	6	6	2	3
VI	<i>tio-</i>	4	11	8	2	8
	<i>tio+</i>	10	10	6	18	8
VII	<i>nic-</i>	5	5	4	1	8
	<i>nic+</i>	9	16	10	19	8
VIII	<i>ribo-</i>	9	7	3	14	8
	<i>ribo+</i>	5	14	11	6	8
Total		14	21	14	20	16

4.4.4. Análise Genética pelo Ciclo Sexual

A diferenciação sexual em *A. nidulans* não é comumente encontrada na natureza, precisa ser induzida, basta proporcionar uma situação de estresse ao fungo que este imediatamente responde com a formação de estruturas relacionadas com o ciclo sexual. A metodologia consiste em cruzar as linhagens parentais, induzir heterocariose e vedar a placa de Petri com fita adesiva, de modo a baixar a tensão de oxigênio no interior da placa (PONTECORVO et. al., 1954). Dentro de 10 a 15 dias aparecem os corpos de frutificação, chamados cleistotécios os quais contém ascos e ascósporos.

Para testar a ligação entre os determinantes de deterioração localizados pelo ciclo parassexual e os marcadores auxotróficos, cada variante estudado (VB1, VB2, VB3, VB4, VB5, VB6) foi cruzado com a linhagem testadora MSE e o ciclo sexual foi induzido. A análise dos cleistotécios na lupa revelou alguns detalhes, como por exemplo o tamanho dos cleistotécios, os quais eram bem menores que o controle (V17 x MSE). Quando o conteúdo dos cleistotécios provenientes do cruzamento entre um dos variantes e a linhagem testadora MSE foi semeado em Meio Completo, raras colônias cresceram sugerindo que os cleistotécios poderiam ser abortivos. Foi realizada uma análise para calcular a extensão deste fenômeno de abortão. Foram analisados centenas de cleistotécios de cada cruzamento entre os variantes e a linhagem testadora MSE, e a porcentagem de cleistotécios abortivos está representada na Tabela 12. Como controle foram utilizados cleistotécios provenientes de cruzamentos entre um variante deteriorado da linhagem A (V17) e a linhagem MSE, e também cleistotécios do cruzamentos entre a linhagem Abnc e a linhagem MSE. O experimento foi delineado de forma que

cleistotécios de várias placas de heterocário feitos por diferentes métodos (item 3.3.2.) fossem analisados. Foi constatado que o método de obtenção do heterocário não alterou a frequência de cleistotécios abortivos. O tempo de incubação variou de 8 a 20 dias sem alteração nos resultados. Para testar uma possível incompatibilidade entre os variantes deteriorados em estudo e a linhagem MSE, foram usadas outras linhagens, como a linhagem biA₁methG₁, linhagem MSEbnc e linhagem MSF. Também neste caso não foi possível obter corpos de frutificação férteis que possibilitassem realizar a análise genética por ciclo sexual.

ACHA & VILLANUEVA (1961) descreveram um meio de cultura seletivo para alta produção de ascósporos usando uréia ou oxalato de amônia como fonte de Nitrogênio (item 3.2.7), mas para este caso este meio não foi efetivo e não foi obtido sucesso. Os cleistotécios continuaram pequenos e vazios, apesar de se apresentarem em grande número.

Os resultados desta avaliação mostraram um grau muito alto de abortão para 5 dos variantes em estudo, chegando a 100% em alguns casos (VB2 e VB3). E mesmo naqueles variantes (VB1, VB4 e VB5) em que foram observados ascósporos, estes estavam presentes em número muito pequeno, não mais do que dez ascósporos por cleistotécio. Quanto ao variante VB6 em algumas placas de heterocário, este apresentou cleistotécios com um número de ascósporos que possibilitou a análise genética (Tabela 12). Os dados desta análise serão apresentados no próximo item.

KIRK e MORRIS (1991) descreveram um mutante (*tubB*) deficitante para o gene da α -tubulina, que é essencial para o desenvolvimento sexual de *A. nidulans*. Este mutante produz cleistotécios desprovidos de ascósporos.

Esta mutação foi classificada como recessiva pois quando a linhagem mutante é cruzada com uma linhagem selvagem para o gene *tubB* há segregantes com cleistotécios viáveis, e quando é auto fecundada produz cleistotécios abortivos.

A deficiência no processo de ascosporigênese dos variantes deteriorados parece não ser da mesma natureza descrita acima, apesar das características dos cleistotécios serem bastante parecidas em âmbos os casos. Porém, é provável que nos deteriorados binucleados o problema seja de carga genética e não de uma mutação. Ao que parece o fato da linhagem carregar o determinante de deterioração e o gene *bncA* confere desvantagem seletiva a linhagem, a ponto de interferir com sua capacidade de deixar descendentes pelo ciclo sexual.

Tabela 12. Porcentagem de ascósporos viáveis e abortivos dos variantes VB1, VB2, VB3, VB4, VB5, VB6.

LINHAGENS	ABORTIVOS (%)	VIÁVEIS (%)
CONTROLE (V17xMSE)	0	100
VB1	72	28
VB2	100	0
VB3	100	0
VB4	97	3
VB5	92	8
VB6	90	10

4.4.5. Análise Genética do Variante VB6

Este variante destacou-se dos outros 5 por vários fatores: o primeiro deles foi quanto à morfologia da colônia. Comparado aos demais é o único que possui micélio claro, os conídios são incolores, e as hifas quando observadas ao microscópio estereoscópico são mais longas que as demais linhagens deterioradas. Na análise mitótica mostrou ter maior vantagem adaptativa do que os outros 5, não sendo tão drasticamente eliminado durante a haploidização. Além disso também produz cleistotécios viáveis em uma frequência que permite a análise dos ascósporos.

O cálculo da segregação de colônias normais e deterioradas constatou que o caráter em questão segrega na proporção de 1:1. A segregação do gene *wA* que confere o caráter coloração de conídios, (conídios brancos possuem genótipo *w⁻* e conídios amarelos e verdes, *w⁺*) segrega conforme o esperado, 1:1; o gene *bncA* também segrega na proporção de 1 colônia binucleada para 1 colônia normal. A segregação dos demais marcadores auxotróficos pode ser vista na Tabela 13.

Os números do teste de 3 pontos, realizado para detectar a ordem dos 3 marcadores (*proA1*, *pabaA6* e o determinante de deterioração) no cromossomo I estão na Tabela 14, o mapa com a distância entre os marcadores e o cálculo da coincidência e da interferência estão logo em seguida.

Tabela 13. Análise meiótica do cruzamento entre VB6 X MSE.

Grupo de Ligação	Marcador	Normais	Deteriorado	Total	χ^2
I	<i>pro+</i>	31	22	53	0,086 n/s
	<i>pro-</i>	21	29	50	
	<i>paba+</i>	30	21	51	0,0096 n/s
	<i>paba-</i>	22	30	52	
II	<i>w+</i>	27	16	43	2,80 n/s
	<i>w-</i>	23	37	60	
III	<i>gal+</i>	28	15	43	2,80 n/s
	<i>gal-</i>	24	36	60	
IV	<i>pyro+</i>	28	35	63	5,12 *
	<i>pyro-</i>	24	16	40	
V	<i>fac+</i>	16	8	27	23,2 **
	<i>fac-</i>	33	43	76	
VI	<i>tio+</i>	28	23	51	0,0096 n/s
	<i>tio-</i>	24	28	52	
VII	<i>nic+</i>	25	17	42	3,50 n/s
	<i>nic-</i>	27	34	61	
VIII	<i>ribo+</i>	39	37	76	23,2 **
	<i>ribo-</i>	13	14	27	
Total		52	51	103	

$\alpha = 5\%$ com 1 g.l. χ^2 tabelado = 3,84

(*) significativo; (**) altamente significativo; n/s não significativo.

Tabela 14. Teste de 3 pontos envolvendo marcadores do cromossomo I (*proA*₁ *pabaA*₆ e det. VB6). Cruzamento entre variante VB6 x MSE.

Classes		Número de Segregantes	Total	Frequência de Classes
Parentais	<i>pro</i> ⁻ <i>paba</i> ⁻ det	28	57	0,52
	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺ normal	29		
Crossing-over Região I	<i>pro</i> ⁻ <i>paba</i> ⁺ normal	1	3	0,03
	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁻ det.	2		
Crossing-over Região II	<i>pro</i> ⁻ <i>paba</i> ⁻ normal	20	40	0,38
	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺ det	20		
Duplo Crossing- over	<i>pro</i> ⁻ <i>paba</i> ⁺ det	1	3	0,03
	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁻ normal	2		

Porcentagem de Crossing-over:

Região I: *proA1* - *pabaA6* = 6%

Região II: *pabaA6* - determinante de deterioração = 41,7%

Valor da Coincidência = 1

Valor da Interferência = 0

Distância entre os genes *proA1* *pabaA6* e determinante de deterioração.

4.5. Análise citológica

O fungo *A. nidulans* além de ser um organismo modelo para os estudos de fisiologia, bioquímica, metabolismo, genética clássica e molecular, é também ideal para os estudos de desenvolvimento e diferenciação celular. Os eventos que transcorrem desde a germinação do conídio até a formação dos esporos assexuais estão bem descritos no Capítulo 2 deste trabalho, oferecendo uma idéia detalhada de como acontece o desenvolvimento da fase assexuada deste organismo.

O que possibilitou a realização destes estudos de desenvolvimento e diferenciação é a existência de uma série de mutantes morfológicos que afetam a formação das estruturas vegetativas e a esporulação que ocorre ao longo do ciclo de vida assexual do fungo. Destes mutantes, os mais bem estudados são aqueles que afetam os eventos tardios do desenvolvimento (CLUTTERBUCK, 1969).

O mutante *bncA1* (PIZZIRANI-KLEINER e AZEVEDO, 1986a) é importante para o estudo de desenvolvimento, pois produz conídios bi e trinucleados por um processo de migração de mais de um núcleo para dentro do conídio em formação. A análise citológica realizada por estes autores sustenta esta hipótese de que os núcleos dividem-se e depois migram e não se dividem dentro do conídio formado. Pelos dados de análise de heterocários (entre linhagens com marcas auxotróficas complementares), mais de um núcleo passaria da vesícula para o esteríigma primário, o que nos passos subsequentes do desenvolvimento levaria a formação de conídios bi ou trinucleados com núcleos diferentes, que crescem em Meio Mínimo.

Para estudar o comportamento da linhagem MSEbnc e das linhagens deterioradas ao longo do seu desenvolvimento assexual foram conduzidos experimentos de conidiogênese e posterior coloração dos núcleos das estruturas relacionadas com a formação dos conídios.

A primeira fase deste estudo foi delineada de forma que o fungo crescesse sobre uma membrana de diálise, tendo como substrato Meio Completo (item 3.2.2.), à uma temperatura de 37°C, de forma a desenvolver-se plenamente sem interferências que pudessem levar à alterações de morfologia das estruturas devido à condições fisiológicas e não genéticas. Para esta etapa foram ensaiadas as linhagens MSEbnc, Abnc, e os 6 variantes deteriorados em estudo, como controle foram utilizadas as linhagens: MSE, A e PPY. A conidiogênese foi realizada sobre lamínulas de vidro para as linhagens MSEbnc e Abnc para testar a influência do suporte sobre o qual o fungo cresce.

Na segunda etapa, a conidiogênese foi realizada tendo como meio de cultura Meio Completo suplementado com estabilizador osmótico KCl 0,6M. Neste delineamento foram ensaiadas as linhagens deterioradas e a linhagem MSEbnc, como controle. O objetivo deste ciclo de conidiogêneses foi retratar o comportamento das linhagens deterioradas frente ao estabilizador osmótico, já que a reversão do fenótipo deteriorado está associado à presença do estabilizador osmótico no meio de cultura (MOLINA, 1993). Esta autora afirma que a presença de um estabilizador osmótico como o KCl em concentrações que vão de 0,2 à 0,8M é capaz de promover o aparecimento de fenocópias do normal. Concentrações que variam de 0,2 à 1,2M do mesmo estabilizador osmótico provocam uma maior esporulação dos variantes deteriorados e influenciam o diâmetro das colônias. Em vista destes dados o

interesse em se realizar a conidiogênese dos variantes deteriorados frente ao estabilizador KCl 0,6M foi verificar se o mesmo causa alterações na morfologia das estruturas do conidióforo, além das modificações na cor dos conídios, na esporulação e no diâmetro das colônias.

4.5.1. Avaliação Citológica das Linhagens MSEbnc e Abnc

A conidiogênese das linhagens contendo o gene *bncA* foi realizada com o intuito de observar o comportamento das mesmas contendo este gene, para que pudesse servir como controle da conidiogênese das linhagens deterioradas portadoras do gene *bncA*.

As linhagens MSEbnc e Abnc foram crescidas sobre membrana de diálise em Meio Completo (item 3.2.2.), usando os seguintes intervalos de tempo de crescimento: 16, 20, 24, 30, 38 e 48 horas. Como controle foram usadas as linhagens MSE, PPY e A. As mesmas linhagens foram crescidas durante os mesmos períodos e sob as mesmas condições sobre lamínulas de vidro.

Para as linhagens MSEbnc e Abnc, o tempo de 16 horas permite apenas a visualização de hifas, e por ter pouco material crescido sobre a membrana, na maioria das vezes este foi perdido durante o processo de coloração. Portanto as lâminas de 16 horas passaram a ser observadas à fresco. A partir de 20 horas de crescimento a coloração do material fica melhor, há predominância de hifas não diferenciadas que se espalham principalmente pelas bordas da membrana de diálise; com 24 horas de incubação aparecem as primeiras vesículas, e a partir daí as demais estruturas que compõe o conidióforo vão se diferenciando. Após 30 horas de crescimento as fiálides

estão maduras e os conídios começam a surgir, mas não se observa ainda formação de cadeias conidiais. Mesmo com 38 e 48 horas de incubação as cadeias de conídios não são uma característica peculiar das linhagens que contém o gene *bncA*, quando em comparação com as linhagens controle que a partir de 38 horas de crescimento possuem vários conídios organizados em cadeias. A ordem temporal de ocorrência destes eventos é a mesma encontrada para as linhagens controle, sugerindo que o gene *bncA* não retarda nem antecipa o desenvolvimento do conidióforo.

Ainda com relação à formação de cadeias de conídios foi feita uma observação interessante. Nota-se que as cadeias de conídios são compostas por conídios somente uninucleados ou somente binucleados. Raramente foram observadas cadeias de conídios mistos. Na Figura 6b as cadeias de conídios binucleados tem um formato ovalado ao contrário das cadeias uninucleadas, onde os conídios são redondos. Além disso a constrição que separa um conídios do outro parece não estar completamente delimitada, dando um formato alongado aos conídios binucleados e trinucleados. Esta informação é concordante com os dados de medição dos conídios bi e trinucleados, onde os conídios são medidos em dois eixos maior e menor devido ao seu formato ovalado (Tabela 5).

Estes dados de desenvolvimento temporal do conidióforo são condizentes com os propostos por AXELROD et. al. (1973), em que a diferenciação do conidióforo só ocorre depois de, no mínimo 20 horas de incubação, mesmo que haja indução da conidiogênese por aeração.

Algumas observações foram feitas com relação às modificações observadas na estruturação dos conidióforos que pudessem ser causadas pelo

gene *bncA*. Além da constatação de que este gene causa a formação de conídios bi e trinucleados em uma frequência alta, provavelmente por migração de mais de núcleo para dentro do conídio (PIZZIRANI-KLEINER, 1981), este estudo citológico demonstrou uma série de alterações: a primeira delas é que aparentemente o gene *bncA* causa uma profunda desorganização na distribuição das métulas e das fiálides, como pode ser visto na Figura 2. Em comparação com as linhagens controle vê-se claramente que as linhagens que contém o gene *bncA* possuem um número menor de esterígmas e que estes não são regularmente dispostos como nas linhagens uninucleadas. Uma segunda observação foi feita com relação às fiálides. Estas mostraram ser septadas (Fig.8d, 8e, 8f) contendo até 3 núcleos no interior de cada compartimento septado. Esta formação anômala foi amplamente observada em todas as boas preparações, onde as fiálides ficavam claras sem acúmulo de corante. As fotomicrografias da Figura 8 são exemplos de preparações que possibilitam uma boa visualização desta estrutura septada.

Para afastar qualquer possibilidade de um efeito fisiológico, este experimento foi realizado com 3 repetições, usando uma placa de Petri de cerca de 15cm de diâmetro onde foram colocados blocos de Meio Completo (2,0 x 1,0 x 1,0cm) contendo a membrana de diálise disposta sobre o fungo inoculado por semeadura. No centro da placa de Petri foi colocado um algodão umedecido com água destilada esterilizada para manter a umidade dentro da mesma. Dentro desta placa foram cultivadas todas as linhagens.

Não houve diferença entre as estruturas estudadas na linhagem MSEbnc e na linhagem Abnc, bem como para as linhagens controle MSE e A. Este fato vem corroborar a atribuição destas formações de conidióforo ao gene

bncA, uma vez que este seria o único fator variante entre as linhagens em estudo e as linhagens controle.

MILLER et. al. (1992) classificou os genes implicados no desenvolvimento do conidióforo em dois grupos: o grupo "BRISTLE" e o grupo "STUNTED". Neste último estão contidos os genes modificadores do conidióforo, isto é genes que não impedem que o conidióforo se forme, mas modificam a configuração espacial do mesmo. Seguindo o critério de classificação adotado por este autor o gene *bncA* faria parte deste grupo, como um gene modificador da organização do conidióforo.

Outro fator a ser comparado entre as linhagens binucleadas e as linhagens controle é no tocante à quantidade de núcleos existente nas linhagens portadoras do gene *bncA*, estas possuem mais núcleos. A simples observação das fotomicrografias das linhagens portadoras do gene *bnc* e as linhagens controle já mostra que há um excesso de núcleos. O tipo selvagem possui 1 núcleo na métula, o qual divide-se mandando um núcleo-filho para a fiálide, que por sua vez também sofre divisão mitótica. Um dos núcleos permanece na fiálide e o outro vai migrar para dentro do conídio imaturo. Este núcleo que permanece na fiálide vai dividir-se por mitose para formar outro conídio. A existência de tantos núcleos no mutante poderia ser explicada de duas formas: em primeiro lugar o ciclo mitótico pode estar desregulado, fazendo com que os núcleos entrem em mitose mais frequentemente, produzindo mais núcleos que o normal, o que explicaria também a alta frequência dos conídios bi e trinucleados, uma vez que existem mais núcleos na fiálides, dois ou mais podem migrar para dentro do conídio imaturo. Uma segunda hipótese seria a mutação *bncA* causar a formação de um septo

anômalo que permitisse um fluxo de núcleos entre as estruturas componentes do conidióforo.

Não se conhece o suficiente sobre a atuação do gene *bncA*, mas qualquer que seja a explicação para o mecanismo de ação do seu produto, parece claro que quando mutado este gene causa vários efeitos pleiotrópicos sobre a disposição espacial do conidióforo; este parece ser um efeito bastante comum entre os genes do grupo "STUNTED", as mutações *stuA* e *medA*, as quais pertencem ao grupo de genes modificadores, também tem efeito pleiotrópico, no que diz respeito a formação de corpos de frutificação (cleistotécios) durante a diferenciação sexual (CLUTTERBUCK, 1969; MILLER, 1992).

A coloração com Giemsa feita em membrana de diálise foi bem mais eficiente do que em lamínula, as lâminas ficaram melhor coradas, possibilitando uma visualização muito mais clara do material. Os conidióforos vistos sobre lamínula foram diferentes dos vistos sobre membrana de diálise, tanto para as linhagens MSEbnc e Abnc, quanto para as linhagens controle. A princípio a quantidade de material que se desenvolve sobre lamínula é bem menor do que sobre a membrana, limitando-se somente às bordas. Provavelmente o crescimento sobre uma superfície de vidro seja uma condição de estresse para o fungo, pois este só consegue crescer na superfície inferior da mesma, ao passo que sobre membrana de diálise as colônias desenvolvem-se tanto sob, quanto sobre a superfície e parecem ter um crescimento vigoroso, em condições mais propícias, como se estivessem crescendo somente sobre o meio de cultura. Os resultados sugerem que o crescimento sobre membrana de diálise se aproxima mais das condições em que o fungo cresce normalmente.

Uma vez que as linhagens portadoras do gene *bncA* e as linhagens controle foram bem caracterizadas do ponto de vista citológico, puderam então servir como controle dos experimentos de conidiogênese dos variantes deteriorados. A seguir será feita uma descrição das observações citológicas feitas para cada um dos variantes em estudo, levando em consideração a ocorrência dos eventos ligados ao desenvolvimento através dos tempos de incubação e as possíveis alterações estruturais em função dos meios de cultura usados: Meio Completo e Meio Completo suplementado de KCl 0,6M.

Figura 8. Linhagens controle. a) PPY linhagem controle, aumento de 176 vezes 38 horas; b) linhagem MSE, 38 horas; c) linhagem A, 38 horas ; d), e) linhagem MSEbnc, mostrando as fiálides septadas e compartimentos com 2 e 3 núcleos, 48 horas; f) linhagem Abnc com o mesmo padrão de desorganização dos esterígmata, fiálides multinucleadas e septadas, 48 horas. b) à f) aumento de 1400 vezes.

4.5.2. Avaliação Citológica do Variante VB1

Os tempos de incubação usados para análise de desenvolvimento dos variantes deteriorados foi o mesmo usado para as linhagens MSEbnc, Abnc, MSE e A, 16, 20, 24, 30, 38 e 48 horas. Observou-se que as estruturas componentes do conidióforo deste variante se desenvolvem basicamente no mesmo tempo que as linhagens usadas como controle.

Neste variante deteriorado a quantidade de hifas, e de estruturas diferenciadas é menor do que em todos os controles. A cada 2 vesículas encontradas para a linhagem controle MSEbnc e Abnc, encontra-se 1 para o variante VB1. As observações indicam que os conidióforos são mais raros, e as hifas também. É provável que o deteriorado tenha alguma deficiência que o torne menos apto a se desenvolver amplamente. Nas fotomicrografias da Figura 9 podemos ver vários estágios do desenvolvimento do variante VB1, desde hifas não diferenciada até o conidióforo maduro. Aqui também foram detectadas fiálides septadas em muitos conidióforos. A organização dos esterígmata acompanha o padrão observado para as linhagens portadoras do gene *bncA*.

A conidiogênese frente ao estabilizador osmótico KCl 0,6M foi realizada para o variante VB1 com apenas 4 tempos: 16, 20, 24 e 30 horas de incubação, porque o objetivo de se testar este meio de cultura foi constatar apenas alterações estruturais causadas por este estabilizador osmótico e não avaliar o desenvolvimento temporal do fungo. MOLINA, (1993) constatou o surgimento de fenocópias dos deteriorados frente ao uso dos estabilizadores osmóticos. A recuperação da coloração original ou próxima da original e o aumento na esporulação foram descritos também. A conidiogênese nestas

condições mostrou que os conidióforos são mais abundantes quando cultivados em 0,6M de KCl, o que era de se esperar já que os níveis de esporulação aumentam em função do estabilizador osmótico. No tocante à organização espacial do conidióforo foi observado o aumento no número de esterígmata. O variante deteriorado recuperou a coloração verde.

4.5.3. Avaliação Citológica do Variante VB2

Na figura 10 vários estágios de desenvolvimento estão representados para o variante VB2. Neste variante há uma defasagem na diferenciação temporal das estruturas de reprodução assexuada com relação aos controles e com relação ao variante VB1. O variante VB2 apresentou um ligeiro retardo para iniciar a diferenciação das estruturas do conidióforo. Neste, as métulas só começam a ser formadas depois de 28 horas de incubação. Para chegar a esta conclusão a análise teve que ser desdobrada em intervalos de tempos mais curtos, nos períodos entre 24 e 44 horas. Assim foi possível concluir que VB2 demora cerca de 4 horas a mais para polarizar seu crescimento.

Pela análise das lâminas pode-se ver que este variante possui muito poucas métulas e fiálides. A vesícula não é bem formada mostrando uma alteração no formato, a região apical da mesma é irregular. Nota-se também que os esterígmata são bem mais longos quando comparados com as linhagens controle e também com o variante VB1. Na fotomicrografia muitos núcleos estão se dividindo.

O mesmo variante cultivado em Meio Completo mais 0,6M de KCl também apresentou aumento no número de conidióforos, assim como VB1.

Houve aumento no número de esterígmias. Na Figura 10 observa-se que a cabeça dos conidióforos são mais cheias.

Provavelmente o determinante de deterioração do variante VB2 afete mais severamente a morfologia da colônia devido à sua localização ou mecanismo de ação, atuando de forma mais drástica sobre a formação do conidióforo deste variante.

4.5.4. Avaliação Citológica dos Variantes VB3, VB4 e VB5

A análise destes 3 variantes foi morfológicamente bastante semelhante à análise de VB1. As mesmas características estruturais foram detectadas: desorganização das mótulas e fiálides, fiálides septadas, e presença das estruturas de reprodução assexual em menor abundância.

O efeito do estabilizador osmótico também não se alterou, fazendo crescer o número dos conidióforos e de esterígmias.

Foram usados os mesmos tempos tanto para a análise em Meio Completo, como para a análise em meio com estabilizador osmótico.

As fotomicrografias das Figuras 11, 12 e 13 representam preparações feitas pela técnica de Giemsa-HCl e demonstram a morfologia dos variantes VB3, VB4 e VB5 quando crescidos somente em Meio Completo e quando crescidos em Meio Completo suplementado de estabilizador osmótico KCl 0,6M.

4.5.5. Avaliação Citológica do Variante VB6

VB6 demonstrou possuir um perfil peculiar enquanto variante deteriorado, mais parecido com VB2 do que com os demais deteriorados.

A análise do desenvolvimento nos vários tempos demonstrou que VB6 tem crescimento mais lento que os demais deteriorados e que as linhagens controle. O desdobramento dos intervalos de tempo de crescimento possibilitou detectar que o variante VB6 só desenvolve métulas a partir de 30 horas de crescimento, ou seja necessita de um tempo ainda maior do que VB2 que desenvolve métulas após 28 horas de incubação.

As fiálides organizam-se de forma bastante anômala, sendo em número muito pequeno e muito longas, como está demonstrado na Figura 14. As vesículas são, na maioria das vezes, bastante irregulares quanto ao seu formato. É interessante observar que muitas fiálides ainda imaturas possuem 2, 3 e até 4 núcleos em sua região apical. Estes núcleos podem ter se originado por divisão mitótica do núcleo da fiálide, ou então podem ser provenientes da métula, chegando à fiálide por migração através do poro central descontínuo que separa a métula da fiálide.

A quantidade de micélio e de conidióforos que crescem sobre a membrana de diálise também é bastante pequena. As lâminas feitas com o material dos primeiros intervalos de tempo (16 e 20 horas de incubação) possuem poucas hifas para serem observadas e na maioria das vezes que se tentou realizar uma preparação para coloração de núcleos o pouco material presente à princípio, perdeu-se durante a preparação. O fato da linhagem ser lenta para o crescimento, juntamente com o pouco volume que as hifas e conidióforos são normalmente produzidos, resulta na pequena quantidade de material e na baixa qualidade das lâminas obtidas nestes tempos.

Quanto ao crescimento deste variante em Meio Completo suplementado de KCl 0,6M segue o padrão dos demais. As cabeças dos

conidióforos se tornam mais cheias em virtude da maior abundância de esteríngmas, porém o tempo de crescimento continua o mesmo daquele observado para Meio Completo, nem mesmo na presença de estabilizador osmótico há recuperação da velocidade de desenvolvimento.

Figura 9. Variante deteriorado VB1. a) micélio e vesículas em início de formação, 20 horas; b) vesícula madura e primórdios de métulas, 30 horas; c) conidióforo maduro com 48 horas de crescimento; d) conidióforo maduro com 48 horas, conídios binucleados, núcleo em migração. Aumento de 1400 vezes.

Figura 10 Variante deteriorado VB2. a) hifa com célula-pé gerando o início de uma haste.(26 horas); b) vesícula com métulas imaturas e núcleos em migração (28 horas); c) conidióforo anormal, métulas e fiálides maduras, início da formação de conídios (48 horas); d) conidióforo com dois estrígmata apenas, início da formação de conídios (48 horas); e) conióforos maduros com 50 horas de crescimento; f) conidióforo maduro em Meio Completo mais KCl 0,6 M, conídios bi e trinucleados. Aumento de 1400 vezes.

Figura 11. Variante deteriorado VB3. a) e c) conidióforos maduros com 48 horas de crescimento; b) conidióforo maduro com 38 horas de crescimento em Meio Completo mais 0,6M de KCl. Aumento de 1400 vezes.

Figura 12. Variante deteriorado VB4. a) hifa com vesícula na extremidade, 20 horas de crescimento; b) conidióforos maduros em Meio Completo mais KCl 0,6M (48 horas); c) vesícula com métulas imaturas (24 horas); d) conidióforo maduro (48 horas). Aumento de 1400 vezes.

Figura 13 Variante deteriorado VB5. a) conidióforos maduros crescidos em Meio Completo mais KCl 0,6M (38 horas); b e c) conidióforos maduros (48 horas), fiálides septadas binucleadas e conídios binucleados em formação. Aumento de 1400 vezes.

Figura 14. Variante deteriorado VB6. a) hifa e vesícula (24 horas); b) formação das métulas e fiálides com núcleos em posição apical (38 horas); c e d) métulas e fiálides maduras com conídios binucleados formados (48 horas); e) conidióforo com 50 horas. Aumento de 1400 vezes.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados discutidos no capítulo anterior foi possível concluir que:

1. A linhagem Abnc usada neste trabalho apresenta maior instabilidade do que a linhagem A da qual teve origem; produz mais setores deteriorados do que qualquer outro tipo de setor, comumente emitido pelas linhagens duplicadas.
2. Os 6 setores deteriorados analisados neste trabalho demonstraram carregar a duplicação cromossômica no grupo de ligação II e o gene *bncA* no cromossomo IV, além das características peculiares do fenótipo deteriorado (micélio marrom, baixa esporulação, bordas da colônia irregulares).
3. Os determinantes de deterioração nos 6 variantes analisados, encontram-se distribuídos da seguinte maneira: VB1, VB3 e VB6 no cromossomo I, VB4 no cromossomo V. Não foi possível caracterizar o cromossomo em que se encontram os determinantes de deterioração dos variantes VB2 e VB5.
4. Com exceção do variante VB6 todos os demais deteriorados apresentaram uma taxa muito alta de aborção dos seus corpos de frutificação.

5. O gene *bncA* causa profundas modificações na estrutura dos conidióforos das colônias que o carregam, e que este gene funciona como um modificador do conidióforo, levando alterações como: septação das fiálides, formação de conídios ovalados bi e trinucleados, e desorganização dos esterígmata.
6. O Meio Completo suplementado com KCl é capaz de alterar a morfologia dos variantes deteriorados, fazendo com que os conidióforos se tornem mais ricos em termos de quantidade de esterígmata, embora as características ditadas pelo gene *bncA* continuem as mesmas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, I. E. & VILLANUEVA, J. R. A selective medium for the formation of ascospores by *Aspergillus nidulans*. **Nature**, London, **189**: 328, 1961.
- ADAMS, T. H.; BOYLAND, M. T.; TIMBERLAKE, W. E. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. **Cell**, Cambridge, **54**:353-62, 1988.
- ADAMS, T.H. & TIMBERLAKE, W. E. Upstream elements repress premature expression of an *Aspergillus* developmental regulatory gene. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, **10**:4912-9, 1990.
- APIRION, D. A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice-versa in microorganisms. **Nature**, London, **195**:959-61, 1962
- ARAMAYO, R.; ADAMS, T.H. & TIMBERLAKE, W.E. A large cluster of highly expressed genes is dispensable for growth and development in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, Princeton, **122**:65-71, 1989.
- ARAMAYO, R. & TIMBERLAKE, W.E. The *Aspergillus nidulans* *yA* gene is regulated by *abaA*. **EMBO Journal**, Oxford, **12**:2039-48, 1993.
- ARLETT, C.F.; GRINDLE, M.; JIBKIS, J.L. The red cytoplasmic variant of *Aspergillus nidulans*. **Heredity**, London, **17**:197-209, 1962.

- AXELROD, D.E.; GEALT, M.; PASTUSHOCK, M. Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. **Developmental Biology**, New York, **34**:9-15, 1973.
- AZEVEDO, J.L. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. England, 1971, 240p. (Ph.D. - University of Sheffield.).
- AZEVEDO, J.L. Altered instability due to genetic changes in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, London, **26**:55-61, 1975.
- AZEVEDO, J.L. & ROPER, J.A. Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: successive and transposable genetic changes. **Genetical Research**, London, **16**:79-93, 1970.
- AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. **Exercícios Práticos de Genética**. São Paulo, Editora Nacional, 1973. 288 p.
- AZEVEDO, J.L. & SANTANA, E.P. The use of cloroneb to obtain haploids segregants from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. **Aspergillus News Letter**, Sheffield, **13**:6, 1975.
- AZEVEDO, J.L.; OLIVEIRA, A.; ROCHA CAMPOS, A.J. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, **2**:237-41, 1976.
- AZEVEDO, J.L.; SANTANA, E.P.; BONATELLI, R.Jr. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. **Mutation Research**, **48**:163-172, 1977.
- BAINBRIDGE, B.W. & ROPER, J.A. Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, London, **42**:417-24, 1966.

- BENJAMIN, C.R. Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. **Mycologia**, Lancaster, **47**:669-87, 1955.
- BERG, D.E. & HOWE, M.M. **Mobile DNA**. Washington, American Society for Microbiology, 1989. 972 p.
- BERGEN, L.G. & MORRIS, N.R. Kinetics of nuclear division cycle of *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, **156**:155-60, 1983.
- BONATELLI, R.Jr. & AZEVEDO, J.L. Effects of ethidium bromide in diploids and duplication strains of *Aspergillus nidulans*. **Experientia**, Basel, **33**:311-2, 1977.
- BOYLAN, M.T.; MIRABITO, P.M.; WILLETT, C.E.; ZIMMERMAN, C.R.; TIMBERLAKE, W.E. Isolation and physical characterization of three sequential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. **Molecular and Cell Biology**, Washington, **7**:3113-8, 1987.
- BRODY, H. & CARBON, J. Eletrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, **86**:6260-3, 1989.
- BURR, K.W.; ROPER, J.A.; RELTON, J. Modification of chromosome instability in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, London, **128**:2899-907, 1982.
- CLUTTERBUCK, A.J. A mutacional analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, Princeton, **63**:317-27, 1969.
- CLUTTERBUCK, A.J. Absence of laccase from yellow-spores mutants of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, London, **70**:423-35, 1972.

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

CLUTTERBUCK, A.J. The genetics of conidiation in *Aspergillus nidulans*. In: Smith, J.E. & Pateman, J.A. **Genetics and Physiology of Aspergillus**. London, Academic Press, 1977. p. 305-17.

CLUTTERBUCK, A.J. & SPATHAS, D.H. Genetic and environmental modification of gene expression in the *brlA12* variegated position effect mutants of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, London, **43**:123-38, 1984.

COOKE, P.; ROPER, J.A.; WATMOUGH, W. Trypan blue-induced deletions in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. **Nature**, London, **226**:276-7, 1970.

DABOUSSI, M.J.; LANGIN, T.; BRYGOO, Y. Fot1, a new family of fungal transposable elements. **Molecular and General Genetics**, New York, **232**:12-6, 1992.

DECARIS, B.; FRANCOU, F.; LEFORT, C.; RIZET, G. Unstable ascospore color mutants of *Ascobollus immersus*. I. Temporal occurrence and modalities of back mutations. **Molecular and General Genetics**, New York, **162**:68-81, 1981.

DOONAN, J.H. Cell division in *Aspergillus*. **Journal of Cell Science**, New York, **103**:599-611, 1992.

EVANS, R.M. & HOLLENBERG, S.M. Zinc finger: gilt by association. **Cell**, Cambridge, **52**:1-3, 1988.

FAVRAUD, L. Instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans* com duplicação cromossômica. Piracicaba, 1984. 160 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"/USP).

- GEMS, D.H. & CLUTTERBUCK, A.J. Enhancers of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, Princeton, **137**:79-85, 1994.
- GOODAY, G.W. The hyphal tip. In: Smith, J.E. **Fungal Differentiation. A Contemporary Synthesis**. New York, Dekker, 1983. p. 315-56.
- HASTIE, A.C. Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. **Nature**, London, **226**:771, 1970.
- JINKS, J.L. Somatic selection in fungi. **Nature**, London, **174**:209, 1954.
- JOHNSTONE, I.L.; HUGHES, S.G.; CLUTTERBUCK, A.J. Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. **EMBO Journal**, Oxford, **4**:1307-11, 1985.
- KÄFER, E. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. **Nature**, London, **186**:619-20, 1960.
- KÄFER, E. & Upshall, A. The phenotype of the eight disomics and trisomics of *Aspergillus nidulans*. **The Journal of Heredity**, Baltimore, **64**:35-8, 1973.
- KÄFER, E. Disruptive effects of ethyl alcohol on mitotic chromosome segregation in diploids and haploids strains of *Aspergillus nidulans*. **Mutation Research**, Amsterdam, **135**:53-75, 1984.
- KINSEY, J.A. & HELBER, J. Isolation of a transposable element from *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, Washington, **86**:1929-33, 1989.
- KINSEY, J.A. Tad, a LINE-like transposable element of *Neurospora crassa*, can transpose between nuclei in heterokaryons. **Genetics**, Princeton, **126**:317-23, 1990.
- KIRK, K.E. & MORRIS, N.R. The *tubB* α -tubulin gene is essential for sexual

- development in *Aspergillus nidulans*. **Genes and Development**, New York, **5**:2014-23, 1991.
- LAW, D.J. & TIMBERLAKE, W.E. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, **144**:509-17, 1980.
- LIEBER, M.M. The effects of temperature on genetic instability in *Aspergillus nidulans*. **Mutation Research**, Amsterdam, **34**:93-122, 1976.
- LHOAS, P. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with p-fluorfenilalanina. **Nature**, London, **190**:744, 1961.
- LUNA, E.A. Características citológicas e genéticas de linhagens. Rio de Janeiro, 1985. 259 p. (Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- MARTINELLI, S.D. & CLUTTERBUCK, A.J. A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, London, **69**:261-8, 1971.
- MARTINELLI, S.D. Phenotypes of double conidiation mutants of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, London, **144**:277-87, 1979.
- MAYORGA, M.E. & TIMBERLAKE, W.E. Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *wA* gene. **Genetics**, Princeton, **126**:73-9, 1990.
- McCLINTOCK, B. Chromosome organization and gene expression. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, New York, **16**:13-47, 1951.
- McCLINTOCK, B. The control of gene action in maize. **Brookhaven Symposia on Biology**, New York, **18**:162-84, 1965.

- McCULLY, K.S. & FORBES, E. The use of p-fluorfenilalanine with "master" strain of *Aspergillus nidulans* to assigne genes to linkage groups. **Genetical Research**, London, **6**:352-9, 1965.
- MENEZES, E. Análise genética de variantes deteriorados e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, 1974. 114 p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- MILLER, B.L. The developmental genetics of asexual reproduction in *Aspergillus nidulans*. **Seminars in Developmental Biology**, Moscow, **1**:207-19, 1990.
- MILLER, B.L.; MILLER, K.Y.; ROBERTI, K.A.; TIMBERLAKE, W.E. Position-dependent and -independent mechanisms regulate cell-specific expression of the SpoC1 gene cluster of *Aspergillus nidulans*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, **7**:427-34, 1987.
- MILLER, K.Y.; TOENNIS, T.M.; ADAMS, T.H.; MILLER, B.L. Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans stunted (stuA)* gene. **Molecular and General Genetics**, New York, **227**:285-92, 1991.
- MILLER, K.Y.; Wu, J.; MILLER, B.L. StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. **Genes and Development**, NewYork, **6**:1770-82, 1992.
- MIMS, C.W.; RICHARDSON, E.A.; TIMBERLAKE, W.E. Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. **Protoplasma**, Leipizig, **144**:132-41, 1988.
- MIRABITO, P.M.; ADAMS, T.H.; TIMBERLAKE, W.E. Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. **Cell**, Cambridge, **57**:859-68, 1989.

- MOLINA, S.M.G. Estudos de fenocópias em variantes com determinantes de deterioração em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1993. 269p. (Mestrado - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- MONTEIRO, C.B. Avaliação da instabilidade mitótica de *Aspergillus nidulans* através de técnicas de genética clássica e fusão de protoplastos. Piracicaba, 1989. 135 p. (Mestrado - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- MOONEY, J.L; HASSETT, D.E.; YAGER, L.N. Gentic analysis of suppressors of the veA1 mutation in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, Princeton, **126**:869-74, 1990.
- MORPURGO, G. Somatic segregation induced by p-fluorfenilalanina. **Aspergillus News Letters**, Sheffield, **2**:10, 1961.
- MORRIS, N.R. Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, London, **26**:237-57, 1976.
- MORRIS, N.R.; OSMANI, S.A; ENGLE, D.B.; DOONAN, J.H. The genetic analysis of mitosis in *Aspergillus nidulans*. **BioEssays**, Cambridge, **10**:196-201, 1989.
- NEWMEYER, D. & GALEAZZI, D.R. The instability of *Neurospora* duplication Dp (1L → 1R) H4250, and its genetic control. **Genetics**, Princeton, **85**:461-88, 1977.
- NGA, B.H. & ROPER, J.A. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, Princeton, **58**:193-209, 1968.
- NGA, B.H. & ROPER, J.A. A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, Amsterdam, **14**:63-70, 1969.

- NICOLAS, A.; HAMZA, H.; MEKKI-BERRADA, A.; KALOGEROPOULOS, A.; ROSSIGNOL, J.L. Premeiotic and meiotic instability generates numerous b2 mutation derivatives in *Ascobolus*. **Genetics**, Princeton, **116**:33-43, 1987.
- NIFFINEGGER-SOUZA, D.R. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1979. 224 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- O'HARA, E.B. & TIMBERLAKE, W.E. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* yA locus. **Genetics**, Princeton, **121**:249-54, 1989.
- PACCOLA, L.D. Estudos genéticos e citológicos em variantes deteriorados de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1982. 131 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- PASTUSHOK, M. & AXELROD, D.E. Effect of glucose, ammonium and media maintenance initiation by surface colonies of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, London, **94**:221-4, 1976.
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Efeito do gen bncA1 na formação de conídios de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1981. 141 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A. & AZEVEDO, J.L. Characterization and genetical analysis of an *Aspergillus nidulans* strain that produces multinucleate conidia. **Transaction of the British Mycological Society**, London, **86**:123-30, 1986a.
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A. & AZEVEDO, J.L. Effect of the bncA gene on the instability of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, London, **48**:145-150, 1986b.

- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; McDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, **5**:141-238, 1953.
- PONTECORVO, G.; TARR-GLOOR, E.; FORBES, E. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Genetics**, London, **52**:226-37, 1954.
- QUEIRÓZ, M.V. O efeito da protoplastização na instabilidade mitótica de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1988. 136 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- QUEIRÓZ, M.V. Transformação e clonagem de genes em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1992. 101 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- ROBERTS, C.F. A replica plating technique for the isolation of nutritionally exacting mutants of a filamentous fungus (*Aspergillus nidulans*). **Journal of General Microbiology**, London, **20**:540-8, 1959.
- ROPER, J.A. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. **Experientia**, Basel, **8**:14-5, 1952.
- ROSATO, Y.B. & AZEVEDO, J.L. Acriflavina and ethyl methanesulfonate induces mutants of *Aspergillus nidulans* strains with chromosome duplications. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, **1**:247-62, 1978.
- SEWALL, T.C.; MIMS, C.W.; TIMBERLAKE, W.E. *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. **Plant Cell**, Baltimore, **2**:731-9, 1990.

- SWANSON, C.P.; MERZ, T.; YOUNG, J. W. **Cytogenetics**. The chromosome in division, inheritance, and evolution. 2. ed. Englewood Cliffs, Prentice Hall, 1981. 577 p.
- TILBURN, J.; ROUSSEL, F.; SCAZZOCCHIO, C. Isertional inactivation and cloning of the *wA* gene of *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, Princeton, **126**:81-90, 1990.
- TIMBERLAKE, W.E. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. **Developmental Biology**, New York, **78**:497-510, 1980.
- TIMBERLAKE, W.E. Molecular genetic analysis of development in *Aspergillus nidulans*. In: Loomis, W.F. **Genetic Regulation of Development**. New York, Liss, 1987. 63-82 p.
- TIMBERLAKE, W.E. & MARSHALL, M.A. Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. **Trends in Genetics**, Cambridge, **4**:163-9, 1988.
- TIMBERLAKE, W.E. Molecular genetics of *Aspergillus* development. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, **24**:5-36, 1990.
- YAGER, L.N. Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. In: Bennett, J.W. & Klein, M.A. **Aspergillus Biology and Industrial Applications**. Slonehom, Butterwourth-Heinemann, 1990. p. 19-41.
- Yuill, E. Two new *Aspergillus* mutants. **Journal of Botany**, New York, **77**:174-5, 1939.
- ZIMMERMANN, C.R.; ORR, W.C.; LECLERC, R.F.; BARNARD, E.C.;
TIMBERLAKE, W.E. Molecular cloning and selection of genes regulated in *Aspergillus* development. **Cell**, Cambridge, **21**:709-15, 1980.