

ANÁLISE GENÉTICA DE SETORES MELHORADOS DE  
*Aspergillus nidulans*

FLÁVIA MARIA DE OLIVEIRA

Orientador: PROF.DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada à Escola Superior de  
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Uni-  
versidade de São Paulo, para obtenção  
do título de Doutor em Agronomia. Área  
de Concentração: Genética e Melhoramen-  
to de Plantas.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Agosto - 1982

## AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram na elaboração deste trabalho estamos muito agradecidos, sobretudo:

Ao Dr. João Lúcio de Azevedo do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura, USP, à Profa. Dulce Regina Niffinegger e Souza do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG e Profa. Lídia Favraud do Instituto de Biologia, UFRJ.

Aos professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e aos funcionários do Instituto de Genética, ESALQ/USP; colegas do Departamento de Biologia Geral, ICB/UFMG.

Agradecemos ao Setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética da ESALQ/USP onde este trabalho foi realizado com o auxílio do CNPq, através do Plano Integrado de Genética. Também agradecemos à CAPES pela bolsa concedida através do Plano Integrado de Capacitação Docente e à Comissão Permanente de Pessoal Docente da UFMG.

## ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO . . . . .	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA . . . . .	3
2.1. Introdução . . . . .	3
2.2. Aberrações cromossômicas . . . . .	5
2.2.1. Aberrações cromossômicas numéricas . . . . .	5
2.2.2. Trocas cromossômicas estruturais . . . . .	5
2.2.3. Duplicações cromossômicas gerando instabilidade genética . . . . .	7
3. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	13
3.1. Linhagens . . . . .	13
3.1.1. Linhagens utilizadas . . . . .	13
3.1.2. Soluções utilizadas . . . . .	16
3.1.3. Meios de cultura . . . . .	19
3.2. Métodos . . . . .	21
3.2.1. Caracterização das linhagens de <i>A. nidulans</i> . . . . .	21
3.2.2. Placas com meio de análise . . . . .	21
3.2.3. Obtenção de microcolônias monospóricas . . . . .	21
3.2.4. Instabilidade das linhagens A e A//MSE crescidas em diferentes temperaturas . . . . .	22
3.2.5. Taxa de crescimento de variantes melhorados da linhagem A . . . . .	23
3.2.6. Diâmetro de conídios e núcleos dos variantes do diploide A//MSE . . . . .	23
3.2.7. Obtenção de heterocários ( <i>PONTECORVO e col., 1953</i> ) . .	24

	<u>Página</u>
3.2.8. Análise meiótica ( <i>PONTECORVO e col.</i> , 1953) . . . . .	24
3.2.9. Isolamento de diplóides ( <i>ROPER</i> , 1952) . . . . .	25
3.2.10. Análise genética através do ciclo parassexual. . . . .	26
 4. RESULTADOS . . . . .	27
4.1. Linhagem A: Instabilidade e análise genética . . . . .	27
4.1.1. Instabilidade genética da linhagem A crescida em diferentes temperaturas . . . . .	27
4.1.2. Caracterização dos setores melhorados originados da linhagem A . . . . .	29
4.1.3. Características fenotípicas dos variantes melhorados da linhagem A, isolados para análise genética . . . . .	29
4.1.4. Análise genética dos variantes melhorados originados da linhagem A, em diferentes temperaturas de incubação . . . . .	38
4.2. Diplóide A//MSE instabilidade e análise genética. . . . .	61
4.2.1. Instabilidade genética do diplóide A//MSE crescido em diferentes temperaturas . . . . .	61
4.2.2. Caracterização dos setores melhorados do diplóide A//MSE, obtidos espontaneamente . . . . .	64
4.2.3. Medida do diâmetro dos conídios e respectivos núcleos de setores auxotróficos e prototróficos e de linhagens controle . . . . .	64
4.2.4. Análise genética dos variantes melhorados derivados do diplóide A//MSE de <i>A. nidulans</i> , obtidos espontaneamente em diferentes temperaturas de incubação. . . . .	65
 5. DISCUSSÃO . . . . .	72
5.1. Instabilidade da linhagem duplicada Dp(I-II) . . . . .	72
5.1.1. Análise genética dos variantes amarelos . . . . .	75
5.1.2. Análise genética dos variantes melhorados verdes . .	77

Página

5.2. Instabilidade de diploide heterozigoto Dp(I-II) . . . . .	83
6. CONCLUSÕES . . . . .	86
7. LITERATURA CITADA . . . . .	88

## LISTA DAS TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Genótipos, fenótipos e localização dos marcadores genéticos utilizados segundo CLUTTERBUCK, 1974 . . . . .	14
2 - Linhagens utilizadas . . . . .	15
3 - Número de setores originados das linhagens A e <i>propababyde A. nidulans</i> , em diferentes temperaturas de incubação (40 repetições) . . . . .	28
4 - Número e tipos de setores produzidos pela linhagem A de <i>A. nidulans</i> em diferentes temperaturas de incubação (40 repetições) . . . . .	28
5 - Freqüência de setores melhorados da linhagem A que requerem adenina e biotina . . . . .	29
6 - Características dos variantes melhorados da linhagem A . . .	31
7 - Número e tipos de setores produzidos pelos variantes melhorados, incubados seis dias a 37°C (4 repetições) . . . . .	32
8 - Médias dos diâmetros em centímetros, de quatro colônias de variantes melhorados originados da linhagem A e de linhagens controles, crescidas a 37°C. . . . .	34
9 - Análise da variância para os valores médios dos diâmetros das colônias de variantes melhorados e de linhagens controles, obtidos para o 2º e 5º dias de crescimento, a 37°C . . . . .	35
10 - Comparação entre tratamentos, entre tratamentos e as testemunhas e entre testemunhas, pelo teste de Tukey com relação aos valores médios dos diâmetros de quatro colônias dos derivados melhorados no segundo dia de crescimento, a 37°C . . . . .	36
11 - Comparação entre tratamentos, entre tratamentos e as testemunhas pelo teste de Tukey com relação aos valores médios dos diâmetros de quatro colônias dos derivados melhorados no quinto dia de crescimento, a 37°C . . . . .	37

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
12 - Análise mitótica dos diplóides <i>pro paba y//MSE e A//MSE</i> . . . . .	39
13 - Análise meiótica do cruzamento entre a linhagem <i>pro paba y</i> e a MSE . . . . .	40
14 - Análise meiótica do cruzamento entre a linhagem A e a MSE de <i>A. nidulans</i> . . . . .	41
15 - Análise mitótica dos diplóides resultantes dos cruzamentos entre os variantes melhorados amarelos da linhagem A, originados a 28°C, e a linhagem MSE . . . . .	44
16 - Segregantes meióticos resultantes dos cruzamentos entre os variantes melhorados da linhagem A, obtidos a 28°C e a linhagem MSE . . . . .	45
17 - Análises meióticas dos cruzamentos entre variantes melhorados amarelos originados da linhagem A, a 28°C e a linhagem MSE . . . . .	46
18 - Análise mitótica dos diplóides resultantes dos cruzamentos entre os variantes melhorados da linhagem A, originados a 37°C e a linhagem MSE . . . . .	47
19 - Segregantes meióticos resultantes dos cruzamentos entre os variantes melhorados da linhagem A, originados à 37°C, e a linhagem MSE . . . . .	48
20 - Análises meióticas dos cruzamentos entre os variantes melhorados da linhagem A, originados a 37°C, e a linhagem MSE . . . . .	49
21 - Análises mitóticas dos diplóides resultantes dos cruzamentos entre os variantes melhorados amarelos da linhagem A, originados a 42°C e, a linhagem MSE . . . . .	50
22 - Segregantes meióticos resultantes dos cruzamentos entre os variantes melhorados da linhagem A, originados a 42°C e, a linhagem MSE . . . . .	51

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
23 - Análise meiótica dos cruzamentos entre os variantes melhora dos amarelos originados da linhagem A a 42°C e a linhagem MSE . . . . .	52
24 - Análises mitóticas dos diplóides resultantes dos cruzamentos entre os variantes melhorados verdes originados da linhagem A a 42°C e a linhagem MSE . . . . .	53
25 - Análise meiótica do cruzamento entre o variante melhorado M42.6 e a linhagem MSE . . . . .	54
26 - Análise meiótica do cruzamento entre o variante melhorado M42.7 e a linhagem MSE . . . . .	55
27 - Análise meiótica do cruzamento entre o variante melhorado M42.8 e a linhagem MSE . . . . .	56
28 - Análise meiótica do cruzamento entre o variante melhorado M42.81 e a linhagem MSE . . . . .	57
29 - Análise meiótica do cruzamento entre o variante melhorado M42.9 e a linhagem MSE . . . . .	58
30 - Análise meiótica do cruzamento entre o variante melhorado M42.10 e a linhagem MSE . . . . .	59
31 - Análise meiótica do cruzamento entre o variante melhorado M42.11 e a linhagem MSE . . . . .	60
32 - Instabilidade genética do diplóide A//MSE de <i>A. nidulans</i> crescido por oito dias, em diferentes temperaturas (40 repetições) . . . . .	62
33 - Instabilidade genética do diplóide controle bi//MSE de <i>A. nidulans</i> , crescidos por oito dias em diferentes temperaturas (40 repetições) . . . . .	63

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
34 - Freqüência de setores melhorados prototróficos e auxotróficos produzidos pelo diploide A//MSE crescido por oito dias em diferentes temperaturas . . . . .	64
35 - Valores médios ( $\bar{m}$ ) do diâmetro de 31 conídios e núcleos dos setores do diploide A//MSE e de linhagens controles, com seus respectivos desvios padrões(s) . . . . .	66
36 - Análise da variância dos valores médios obtidos para diâmetro de conídios e, núcleos de setores do diploide A//MSE e linhagens controles . . . . .	67
37 - Comparação entre tratamentos, entre tratamentos e as testemunhas e entre testemunhas, pelo teste de Tukey com relação aos valores médios dos diâmetros dos conídios dos variantes melhorados do diploide A//MSE . . . . .	68
38 - Análise mitótica dos derivados diplóides da linhagem A//MSE, originados espontaneamente a $28^{\circ}\text{C}$ . . . . .	69
39 - Análise mitótica dos derivados diplóides da linhagem A//MSE originados espontaneamente a $37^{\circ}\text{C}$ . . . . .	70
40 - Análise mitótica dos derivados diplóides da linhagem A//MSE, originados espontaneamente a $42^{\circ}\text{C}$ . . . . .	71

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Linhagem A e o diplóide A//MSE de <i>A. nidulans</i> . Representam-se os centrômeros por círculos . . . . .	15
2 - Tipos de segregantes diplóides e haplóides, originados de uma permuta mitótica no cromossomo I, na região entre o centrômero e o loco <i>suAl adE20</i> , em núcleos resultantes em meio mínimo de heterocários formados entre os variantes M42.6 e MSE e, M42.7 e MSE de <i>A. nidulans</i> . . . . .	81

## Análise genética de setores melhorados de *Aspergillus nidulans*

Flávia Maria de Oliveira

Orientador: Prof.Dr. João Lucio de Azevedo

### RESUMO

Linhagens de *Aspergillus nidulans* duplicadas são instáveis na mitose. Linhagem Dp(I-II) com segmento terminal do grupo de ligação I translocado ao grupo II origina setores melhorados amarelos e verdes. A origem dos variantes melhorados está ligada à eliminação do material duplicado. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar se ocorrem diferenças genéticas entre os setores melhorados originados da linhagem Dp(I-II) e do diplóide heterozigoto para esta duplicação, em diferentes temperaturas de crescimento. Em temperaturas mais altas de incubação ocorre aumento da freqüência dos segregantes amarelos. A média do diâmetro das colônias, auxotrofia e análise genética dos variantes melhorados mostraram que segregantes amarelos na grande maioria (85%) apresentam per-

da total do segmento translocado. Variantes verdes resultaram freqüentemente da perda total ou parcial do segmento duplicado na posição normal. Estes apresentam anomalias na segregação meiótica e mitótica revelando que essa perda deve ser causada por processos que levam a consideráveis rearranjos de material genético. Diploídes heterozigotos não balanceados foram mais instáveis sob temperaturas mais altas, produzindo setores melhorados haploídes e diploídes. Em comparação com o diploide não portador de duplicação cromossômica o diploide com Dp(I-II) apresenta a propriedade de produzir um número maior de setores haploídes. Isso pode servir para se obter segregantes haploídes de diploídes com duplicação, sem usar um agente haploidizante.

## GENETIC ANALYSIS OF IMPROVED SECTORS FROM *Aspergillus nidulans*

*Flávia Maria de Oliveira*

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

### SUMMARY

Strains of *A. nidulans* carrying a chromosome duplication are mitotically unstable. A strain Dp(I-II) with a terminal segment of linkage group I translocated to linkage group II produces improved sectors which could be yellow and green. The origin of these improved variants is related to the loss of the duplicate genetic material. The present work was carried out aiming to study the possible genetic differences among improved sectors derived from strain Dp(I-II), and from heterozygous diploid for the duplication at different temperatures. It was shown that incubation of the Dp(I-II) strain at higher temperatures results in an increase of the number of yellow sectors. The diameter of the colonies, the nutritional requirements and the genetic analysis of the improved variants have shown that improved yellow sectors are due, in the great majority of the cases (85%), to the complete loss of the duplicate translocate segment. Green sectors were due mainly to total or partial loss of the duplicate segment in a normal position. These sectors have also shown severe anomalies when analysed meiotically and mitotically, which indicate that loss of part of

linkage group I must be caused by processes which produce considerable chromosomal rearrangements of the genetic material. Heterozygous diploids bearing a duplication were more unstable at higher temperatures producing both haploid and diploid improved sectors. A comparison between sectors produced by diploids with and without duplication have also shown that the great ones produce a larger amount of haploid segregants which make them favorable for the production of haploid segregants in the absence of an haploidizing agent.

## 1. INTRODUÇÃO

Pesquisas sobre instabilidade genética em procariotos e euriotos evidenciaram a importância da recombinação genética por rearranjos cromossômicos na diferenciação e controle gênico. Esse tipo de recombinação que foi denominada de "ilegítima" por FLANKIN (1971) está atualmente relacionada com a evolução e controle gênico dos genomas, reação sexual em leveduras, mobilidade de segmentos genéticos durante o desenvolvimento, produção de clones de linfócitos e outros fenômenos biológicos.

É freqüente, em fungos filamentosos, o aparecimento de linhagens instáveis que formam colônias variegadas ou com setores, sendo que as causas da instabilidade muitas vezes não estão bem definidas.

Em *Aspergillus nidulans* instabilidade genética tem sido correlacionada em alguns casos à duplicações cromossômicas derivadas de translocações. O material duplicado é eliminado total ou parcialmente dando origem a setores vigorosos (variantes melhorados) e o padrão dessa perda pode ser modificado por agentes físicos, químicos e genéticos. Em adição à insta**bilidade** inicial, esse sistema favorece também o aparecimento de outros va-

riantes instáveis com morfologia alterada (setores deteriorados) por trans-  
locações cromossômicas.

Embora essas linhagens tenham sido muito pesquisadas genetica-  
mente, não se determinaram ainda os processos intragenéticos responsáveis  
pela perda e rearranjo do material genético das porções duplicadas.

Este trabalho tem por objetivos:

- Pesquisar a natureza genética de setores melhorados em linhagem duplicada haplóide e no diplóide heterozigoto de *Aspergillus nidulans*, obtidos em diferentes temperaturas de incubação.
- Determinar a freqüência de setores melhorados haplóides e diplóides em di-  
ploídes com duplicações cromossômicas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Introdução

Fungos filamentosos constituem material propício para investigações sobre a origem e efeitos de rearranjos cromossômicos em eucariotos, pois representam uma classe com nível de complexidade intermediária entre as formas unicelulares das leveduras e organismos pluricelulares como as plantas e animais. Têm genoma pequeno (*HUDSPETH e col.*, 1977; *TIMBERLAKE*, 1978; *KRUMLAUF e MARZLUF*, 1979) e núcleos com nucléolo e cromossomas com histonas (*FELDEN e col.*, 1976) sendo que todos os componentes químicos do núcleo estão bem caracterizados (*MORRIS e col.*, 1977).

*Aspergillus nidulans* tem sido utilizado para essas investigações, pois além de ter condições de cultivo bem definidas, apresenta também ciclo sexual e parassexual (*PONTECORVO e col.*, 1953, 1954; *PONTECORVO*, 1956) com a formação de diplóides estáveis (*ROPER*, 1952).

Diplóides heterozigotos resultantes do cruzamento entre duas linhagens, são obtidos em condições de laboratório usando meio seletivo e

os conídios são maiores que os haplóides (*HEAGY e ROPER, 1952; PONTECORVO e col., 1953*) entretanto têm sido isolados de populações naturais linhagens diplóides (*UPSHALL, 1981*).

A freqüência de recombinação mitótica nesse eucoríoto é baixa (*PONTECORVO, 1954; ROPER, 1966*). Foi sugerido por *KÄFER (1961, 1976)* a ocorrência de dois mecanismos responsáveis pela recombinação mitótica em *Aspergillus*: a não disjunção cromossômica que através da formação de aneuplóides instáveis resulta em segregantes haplóides e, a permuta mitótica que origina diplóides recombinantes. Entre os segregantes, os haplóides distinguem-se pelo tamanho dos conídios e pela segregação dos alelos em heterozigose de um grupo de ligação enquanto que nos diplóides, ocorre segregação de um ou de poucos marcadores ligados, permanecendo heterozigotos para os outros genes do cromossomo (*FINCHAM e col., 1979*).

Maior incidência de recombinação mitótica pode ser obtida pelo emprego de agentes químicos tais como *p*-fluorfenilalanina (*McCULLY e FORBES, 1965*), arsenato (*VAN ARKEL, 1963*), benilate (*HASTIE, 1970; KAPPAS, 1978*), compostos benzimidazóicos, tiofanatos (*KAPPAS e col., 1973, 1974*), fluoro-deoxiuridina, nitrosoguanidina (*SCHANFIELD e KÄFER, 1971*), griseofulvina (*KAPAS e GEORGPOULOS, 1974*), cloroneb (*AZEVEDO e SANTANA, 1975; AZEVEDO e col., 1977*), actinomicina D (*KAPPAS, 1978*) e outros. Tratamento com ultra-som, raio X e partículas  $\alpha$  e  $\beta$  também desestabilizam os diplóides (*HOUGHTON e O'DOWD, 1979*) e mutantes *uvr* apresentam freqüência de recombinação alterada (*JANSEN, 1970, a - b; FORTUIN, 1971, a - b*).

O aumento de segregantes haplóides e diplóides pode resultar do mesmo efeito primário que aumenta a não disjunção mitótica, mas uma maior incidência de segregantes diplóides é proveniente de alta freqüência de

permuta mitótica (*KAPPAS e col.*, 1974). Mostrou-se que permuta mitótica em *A. nidulans* ocorre no estágio de quatro fios (*ROPER e PRITCHARD*, 1955) o que também foi observado em *Drosophila* (*STERN*, 1936) mas em levedura, foi descrita a ocorrência de permuta mitótica no estágio de dois fios envolvendo a recombinação de cromossomos não duplicados (*ESPOSITO*, 1978).

## 2.2. Aberrações cromossômicas.

### 2.2.1. Aberrações cromossômicas numéricas.

*AZEVEDO* (1966) constatou a formação de triplopôides em *A. nidulans*, apesar de que casos de poliplóides serem raros nessa espécie, embora ocorra em outros gêneros (*LU*, 1964; *RODGERS*, 1968; *ROMAN e col.*, 1955).

Aneuplopôides ocorrem com freqüência aproximadamente de um por cento (1%) e originam-se de não disjunção mitótica de haplopôides e diplóides (*KÄFER*, 1960; 1961). Têm crescimento mais lento do que o haplopôide e produzem setores muitas vezes instáveis. Dissômicos para os diferentes grupos de ligação de *A. nidulans* apresentam fenótipos bem característicos (*KÄFER e UPSHALL*, 1973).

### 2.2.2. Trocas cromossômicas estruturais.

Rupturas cromossômicas, aparentemente espontâneas ou determinadas por agentes físicos e químicos ocorrem em fungos como em outros organismos (*SYBENGA*, 1972). As regiões envolvidas nessas quebras tendem a se

unir resultando em novas seqüências cromossômicas. Esses rearranjos são detectados por desvios nas proporções de segregantes meióticos e modificações na relação de ligação dos marcadores genéticos (AZEVEDO, 1971; PERKINS, 1974; KAFER, 1975; PERKINS e BARRY, 1977; BIRKETT e ROPER, 1977).

O fato das inversões cromossômicas estarem pouco caracterizadas em *A. nidulans* (KAFER - BOOTHROYD, 1964; KAFER, 1966) é atribuído à dificuldade de observação dos cromossomos meióticos (ELLIOT, 1960), embora esse rearranjo esteja bem estudado em *Neurospora crassa* (NEWMEYER e TAYLOR, 1967; PERKINS e BARRY, 1977). Entretanto, translocações e elisões estão documentadas pois são detectadas pela análise meiótica e/ou mitótica (KAFER, 1962, 1975; MA e KAFER, 1974; PERKINS e BARRY, 1977). O fragmento cromossômico resultante de duas quebras pode ser inserido em outro cromossomo (translocação) ou pode ser transposto no mesmo grupo de ligação (transposição) sendo que a translocação pode ser recíproca e não recíproca (FINCHAM e col., 1979).

Em *A. nidulans* é mais freqüente a translocação não recíproca (KAFER, 1962; 1965; UPSHALL e KAFER, 1974; BIRKETT e ROPER, 1977; ALMEIDA, 1976) embora translocação recíproca tenha sido encontrada entre os grupos de ligação I e VIII (MA e KAFER, 1974; KAFER, 1975).

Duplicações cromossômicas são originadas freqüentemente de translocações não recíprocas e são muito úteis no estudo do efeito de posição, da interação gênica e de complementação aléllica (BALL, 1967; CLUTTER-BUCK, 1970; MYLYK, 1975) pois permitem a observação do fenótipo resultante de um genótipo duplo, em um genoma haplóide.

A primeira linhagem duplicada em *A. nidulans* foi isolada por

*Pritchard* (1956 ; Apud *Birkett e Roper*, 1977) quando pesquisava reversão espontânea em uma linhagem *adE20*. Constatou que uma reversão era devida a uma duplicação cromossômica heterozigota envolvendo o loco *adE20*. Desde então, linhagens duplicadas têm sido produzidas em laboratório a partir de translocações determinadas por radiação (*NGA e Roper*, 1968; *ALMEIDA*, 1976; *ORTORI*, Apud *Birkett e Roper*, 1977 ) e algumas estão bem caracterizadas (*Bainbridge e Roper*, 1966; *BALL*, 1967; *NGA e Roper*, 1968; *CLUTTERBUCK*, 1970; *Azevedo*, 1971; *ZUCCHI e AZEVEDO*, 1979).

### 2.2.3. Duplicações cromossômicas gerando instabilidade genética

É característico de linhagens duplicadas de *A. nidulans* um crescimento mais lento da colônia e a produção de setores com crescimento vigoroso. Em *N. crassa* a presença de duplicações cromossômicas está associada também à instabilidade genética (*TURNER*, 1977; *NEWMEYER e TAYLOR*, 1967; *NEWMEYER e GALEAZZI*, 1977) mas não altera a morfologia e o crescimento da colônia (*TURNER*, 1977).

A análise genética de uma linhagem de *A. nidulans* com uma duplicação III-VIII, revelou que os setores resultavam de elisão total ou parcial do material duplicado, sendo que a quebra ocorria aparentemente em vários pontos dos segmentos duplicados e com pouca especificidade (*BAINBRIDGE e ROPER*, 1966).

Outra linhagem bem caracterizada sob o ponto de vista genético é a linhagem portadora de uma duplicação I-II. Apresenta um segmento terminal do braço direito do cromossomo I translocado para a extremidade do cromossomo II, não é estável e por um processo ainda não esclarecido de

instabilidade mitótica, ganha ou perde material genético durante o crescimento vegetativo dando origem por elisão, adição e/ou translocação a setores segregantes (NGA e ROPER, 1968; 1969; CLUTTERBUCK, 1970; AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971).

O padrão de instabilidade da duplicação é alterado por mutação *uvr* (BURR, PALMER e ROPER, 1971; JANSEN, 1970; PARAG e PARAG, 1975; MAJERFELD e ROPER, 1978a), por um fator genético situado no cromossomo VIII (AZEVEDO, 1975), em presença de cafeína (ROPER e cols, 1972), azul de tripan (COOK e col., 1970), DNA exógeno (MENEZES, 1974), brometo de etídio (BONATELLI e AZEVEDO, 1977); coumarim (MAJERFELD e ROPER, 1978b); pela temperatura (LIEBER, 1976; NIFFINEGGER-SOUZA, 1979) e outros fatores.

A perda total ou parcial da duplicação determina a formação de setores melhorados (NGA e ROPER, 1968; 1969) enquanto que rearranjos do material duplicado resultam em setores deteriorados caracterizados por uma morfologia variada, padrões de instabilidades diferentes, crescimento linear em geral, menor do que o parental, conidiação reduzida e diversos graus de pigmentação (NGA e ROPER, 1968; AZEVEDO, 1971). Um terceiro tipo de segregantes é constituído por setores heterocarióticos que apresentam conídios amarelos e verdes (ROPER e NGA, 1969) e a análise genética destes setores revelou que um dos componentes é hipo-haplóide (ROPER e NGA, 1969; NIFFINEGGER-SOUZA, 1979).

A análise genética dos setores deteriorados revelou que modificações genéticas como duplicações, translocações e transposições estão envolvidas na instabilidade destes setores (AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971; ROSATO, 1973; MENEZES, 1974; PAES DE BARROS, 1977; NIFFINEGGER-SOUZA, 1979).

Em linhagem duplicada Dp (I-II) elisões ocorrem em uma entre  $10^4$ - $10^6$  mitoses (BIRKETT, apud BIRKETT e ROPER, 1977) e os diplóides não balancem. São mais instáveis do que a linhagem haplóide (NGA e ROPER, 1969; CASE e ROPER, 1975; CASE e ROPER, 1981). O segmento translocado é perdido preferencialmente, sendo que a elisão no segmento normal é pouco frequente (NGA e ROPER, 1968; LIEBER, 1976; MAJERFELD e ROPER, 1978b) e a quebra cromossómica é imprecisa. Supõe-se que resulta algumas vezes após a elisão parcial, uma porção de material duplicado próxima ao local de inserção da translocação, a qual poderia participar ocasionalmente, de permuta mitótica, regenerando assim a duplicação (BAINBRIDGE e ROPER, 1966; NGA e ROPER, 1968). Entretanto, algumas elisões em linhagens com duplicações Dp (I-II) excepcionam a região duplicada e translocada ao cromossomo II (ROPER e NGA, 1969; NIFFINEGGER-SOUZA, 1979).

Há ausência de dados acerca da ocorrência de recombinação mitótica na região da duplicação, embora os segregantes de diplóides heterozigotos para a translocação, originam-se de permuta mitótica no cromossoma II (CASE e ROPER, 1981). A incidência de recombinação meiótica dentro da duplicação é maior do que em linhagens normais e este aumento interfere com a recombinação nas regiões adjacentes à duplicação (VAN DE VATE e JANSEN, 1978).

Tem sido muito discutido o processo que gera elisões nas duplicações. Como as linhagens de *A. nidulans* pesquisadas apresentam padrões característicos de instabilidade (BAINBRIDGE e ROPER, 1966; BIRKETT e ROPER, 1976; ZUCCHI e AZEVEDO, 1979) e linhagens duplicadas haplóides e diplóides diferem também quanto à instabilidade (CASE e ROPER, 1975; 1981), questiona-se se o processo é basicamente o mesmo nos diversos casos ou, se o

fator determinante da instabilidade é primariamente apenas um, mas que se manifesta por processos diferentes.

Em *N. crassa* ocorre também perda preferencial do segmento translocado e entre as linhagens geneticamente estudadas apenas uma não mostrou esse comportamento (NEWMAYER e TAYLOR, 1967; TURNER, 1977; NEWMAYER e GALEAZZI, 1977).

O fato da linhagem haplóide com duplicação Dp (I-II) ser mais estável que o diplóide heterozigoto para a translocação, foi atribuído à presença de segmentos em triplicata (NGA e ROPER, 1969). Realmente, o problema da dosagem de material cromossômico influí no mecanismo que gera instabilidade pois em diplóides heterozigotos para translocação, segregantes são produtos de permuta mitótica e, em diplóides homozigotos é a elisão na duplicação que está envolvida na produção de setores (CASE e ROPER, 1975 ; 1981).

A eliminação do material duplicado foi explicada inicialmente pela ocorrência de permuta dentro da alça cromossônica (NGA e ROPER , 1968) e que, seria também uma fonte de elementos transponíveis (NGA e ROPER, 1968; AZEVEDO e ROPER, 1970) mas não ficou esclarecida a excisão imprecisa que ocorre em muitos casos. Poder-se-ia supor então a ocorrência de permuta desigual (NGA e ROPER, 1968) mas não há evidências que comprovem esta hipótese. Esses autores também sugeriram que a lesão no material duplicado pode ser decorrente da competição dos segmentos duplicados por sítios de replicação localizados na membrana nuclear.

Em alguns organismos, instabilidade cromossômica encontra - se associada à presença de heterocromatina (BURNS e GERSTEL, 1967; BEERMAN ,

1966). Embora não haja evidências citológicas de heterocromatina em Aspergillus poder-se-ia supor que a duplicação induziria a formação de heterocromatina que seria subsequentemente eliminada (LIEBER, 1976).

Baseando-se na ocorrência de rDNA 5S nas extremidades dos cromossomos de *Xenopus* (PARDUE e cols., 1973) e no material corado por Giemsa nas extremidades cromossômicas de *Allium* (STACK e CLARKE, 1973), NEWMEYER e GALLEAZZI, (1977), correlacionaram a eliminação de duplicações em *N. crassa* à existência de DNA repetitivo e homólogo nas pontas dos cromossomos. Permuta entre esse material e o homólogo na região da implantação da translocação resultaria na elisão preferencial do segmento translocado. Maior ou menor facilidade em eliminar a duplicação dependeria da soma de material repetitivo próximo ao ponto de quebra e de outros fatores afetando a ocorrência de permuta, o que por conseguinte explicaria o comportamento das diferentes duplicações.

A existência de DNA palindrômico em *A. nidulans* foi também admitida por ROPER e BIRKETT (1977) sendo que a região de soldadura da translocação seria um telômero modificado produzido provavelmente por permuta entre seqüências palindrômicas do telômero e seqüências internas.

Aumento da instabilidade genética das linhagens duplicadas é causado por agentes que interferem no reparo de DNA (BURR e col., 1971; ROPER e col., 1972) indicando que lesões no sistema de reparo do DNA podem constituir-se no processo primário da instabilidade.

Melhores esclarecimentos sobre o fenômeno da instabilidade das linhagens duplicadas em *A. nidulans*, podem advir da análise da estrutura cromossômica particularmente do DNA repetitivo; de pesquisas sobre a fidelidade

dade mitótica na organização do genoma, do efeito da dosage dos segmentos cromossômicos em diferentes ploidias e também, do controle da replicação do DNA (*FINCHAM e cols., 1979; CASE e ROPER, 1981*).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens

##### 3.1.1. Linhagens utilizadas

A Tabela 1 relaciona os marcadores genéticos usados no presente trabalho. Os símbolos dos genótipos seguem a recomendação de CLUTTERBUCK (1974). Definir-se-ão os fenótipos pelos símbolos dos genótipos correspondentes.

Tabela 1 - Genótipos, fenótipos e localização dos marcadores genéticos utilizados segundo CLUTTERBUCK, 1974.

Símbolo do gene	Grupo de ligação	Fenótipo <sup>1/</sup>
<i>adE20</i>	I	req. adenina
<i>biA1</i>	I	req. biotina
<i>facA303</i>	V	nut. acetato
<i>galA1</i>	III	nut. galactose
<i>nicB8</i>	VII	req. ácido nicotínico
<i>pabaA6</i>	I	req. ácido <i>p</i> -aminobenzoíco
<i>proA1</i>	I	req. prolina
<i>pyroA4</i>	IV	req. piridoxina
<i>riboB2</i>	VIII	req. riboflavina
<i>sB</i>	VI	nut. sulfato
<i>sua adE20</i>	I .	supressor <i>adE20</i>
<i>wA3</i>	II	conídios brancos
<i>yA1</i>	I	conídios amarelos

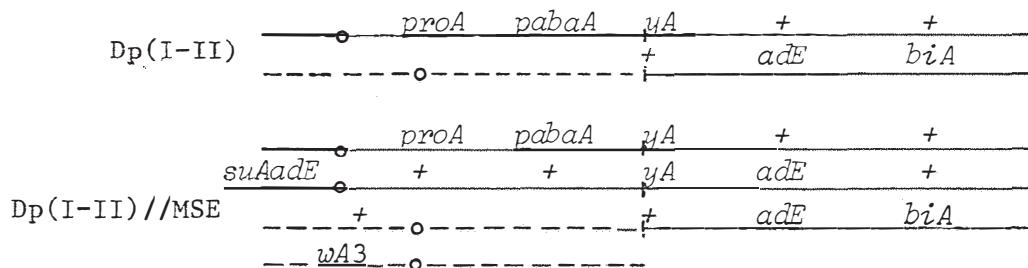
<sup>1</sup> req = requer; nut = não utiliza.

Utilizaram-se linhagens da coleção do Setor de Microrganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo (Tabela 2 e Figura 1). Para simplificar, os números e letras dos alelos serão excluídos do texto, das tabelas e figuras.

Tabela 2 - Linhagens utilizadas

Linhagem	Genótipo <sup>1/</sup>	Referência
A	<i>proA1 pabaA6 yA2; TB1(I,II)</i> <i>adE20 biA1</i>	<i>NGA e ROPER, 1968</i>
MSE	<i>suA1 adE20 ;yA6 adE20 ; wA3;</i> <i>galA1; pyroA4; facA303; sB3;</i> <i>nicB6; riboB5</i>	<i>MC CULLY e FORBES, 1965</i>
<i>pro paba y</i>	<i>proA1 pabaA6 yA2</i>	
<i>bi, meth</i>	<i>biA1 ; methG1</i>	
<i>bi//MSE</i>	<i>biA1;suA1 adE20 ;yA6 adE20;wA3;</i> <i>galA1; pyroA4; facA303; sB3;</i> <i>nicB6; riboB5</i>	

<sup>1/</sup> Nomenclatura segundo CLUTTERBUCK (1974).

Figura 1 - Linhagem A e o diplóide A//MSE de *A. nidulans*.

Representaram-se os centrómeros por círculos.

### 3.1.2. Soluções utilizadas

### Albumina (5%)

Conservou-se a solução em frasco escuro a 4°C.

Benlate (Methyl-1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazole carbamate)

Giemsa

Adicionou-se o corante à glicerina a 60°C e após resfriamento acrescentou-se o metanol. Filtrou-se a solução, a qual foi conservada em frasco escuro.

Helly

Salina (0,85%)

### Formol neutro (saturada)

Adicionou-se uma parte de carbonato de cálcio em três partes de for  
malina. Agitou-se esporadicamente, por 10 dias.

Tampão fosfato pH 6,9

## Solução A

Água destilada . . . . . 1000 ml

## Solução B

Água destilada . . . . . 1000 ml

Adicionou-se 45 ml da solução A em 55 ml da solução B e completou -se para 200 ml com água destilada.

Tween "80" (0.1% v/v)

Tween 80 . . . . . 1 ml

Água destilada . . . . . 1000 ml

Autoclavou-se à 120°C, por 20 minutos.

## Vitaminas

Ácido nicotínico . . . . .	100,00 mg
Ácido <i>p</i> -aminobenzoíco . . . . .	10,00 mg
Biotina . . . . .	0,20 mg
Piridoxina . . . . .	50,00 mg
Riboflavina . . . . .	100,00 mg
Tiamina . . . . .	50,00 mg
Água destilada esterilizada . . . . .	100,00 mg

Aqueceu-se a solução em banho-maria por 15 minutos e conservou-se em frasco escuro a 4°C, sob clorofórmio.

Suplementos adicionados ao meio mínimo.

Substância	Concentração final no meio de cultura (μg/ml)
Adenina	25,00
Ácido nicotínico	0,50
Ácido <i>p</i> -aminobenzoíco	0,25
Biotina	0,20
Metionina	50,00
Piridoxina	0,25
Prolina	50,00
Riboflavina	0,50

As soluções de suplementos foram dissolvidas em água destilada esterilizada, em seguida aquecidas em banho-maria por 15 minutos e conservadas no refrigerador a 4°C.

### 3.1.3. Meios de cultura

Usaram-se os seguintes meios de cultura:

Mínimo (*PONTECORVO e col., 1953*).

NaNO <sub>3</sub>	6,00 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,50 g
KCl	0,50 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,50 g
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g
ZnSO <sub>4</sub>	0,01 g
Glicose	10,00 g
Ágar	15,00 g
Água destilada	1000ml
pH final	6,8

Autoclavou-se a 120°C por 20 minutos.

Completo (*PONTECORVO e col., 1953; modificado*).

Peptona	2,00 g
Caseína hidrolisada	1,50 g
Extrato de levedura	0,50 g
Solução de vitaminas	1,00ml
Meio mínimo	1000ml
pH final	6,8

Mínimo líquido mais 2% de meio completo

Meio completo líquido	2 ml
Meio mínimo líquido	100 ml
pH final	6,8

Autoclavou-se a 120°C por 20 minutos.

Acetato de amônio (*APIRION, 1962*)

$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	12,00 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,00 g
NaCl	2,00 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50 g
$\text{FeSO}_4$	0,01 g
$\text{ZnSO}_4$	0,01 g
Ágar	15,00 g
Água destilada	1000 ml
pH final	6,1

Autoclavou-se a 120ºC por 20 minutos.

## Mínimo de galactose

No meio mínimo (item 3.1.3) substitui-se a glicose por galactose na mesma proporção. Ajustou-se o pH a 6,8. Autoclavou-se a 120ºC por 20 minutos.

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Caracterização das linhagens de *A. nidulans*

As linhagens a serem utilizadas foram semeadas em meio sólido em diluições, tais que produzissem colônias isoladas. Usou-se meio completo para as linhagens haplóides e mínimo para as diplóides. Após incubação a 37°C por 72 horas, caracterizou-se uma colônia de cada linhagem para as marcas genéticas de que eram portadoras em placas de meio mínimo, com combinações adequadas de requerimentos nutricionais. Observaram-se os resultados após 24-48 horas de incubação. As linhagens haplóides foram conservadas em tubos de ensaio com meio completo sólido e as diplóides em placas de Petri com meio mínimo sólido, a 4°C.

#### 3.2.2. Placas com meio de análise

Determinaram-se os requisitos nutricionais das colônias analisadas em placas de Petri com meio completo (MC), meio mínimo (MM), meio mínimo (MM) mais todos os requisitos envolvidos no cruzamento e com meio mínimo mais todos os requerimentos exceto, o que estava sob análise. Utilizou-se também, quando necessário, uma placa com meio de galactose e outra com meio de acetato mais todos os requisitos nutricionais.

#### 3.2.3. Obtenção de microcolônias monospóricas

Semearam-se as linhagens A e *pro paba y* em placas com MC em diluições apropriadas. Após 12-15 horas de incubação a 37°C, as placas fo-

ram examinadas sob uma lupa e transferiram-se microcolônias monospóricas de cada linhagem, para o centro de placas de Petri contendo MC sólido. Utilizou-se o mesmo método para obtenção de microcolônias das linhagens A//MSE empregando-se entretanto MM sólido para selecionar microcolônias diplóides.

### 3.2.4. Instabilidade das linhagens A e A//MSE crescidas em diferentes temperaturas

Microcolônias monospóricas das linhagens A e *pro paba y* ou A//MSE e *bi*//MSE foram incubadas em estufa BOD nas temperaturas de 28, 37 e 42°C. Foram feitas 40 repetições, tanto das linhagens teste quanto das controles e, o delineamento foi inteiramente casualizado.

Nas linhagens diplóides, a contagem dos setores formados foi feita após oito dias de crescimento em cada temperatura e nas haplóides, após 10 dias de incubação. Em seguida variantes melhorados, escolhidos ao acaso e originados em cada temperatura da linhagem A e do diplóide A//MSE, foram purificados por estria em placas com meio completo.

Após 72 horas a 37°C, foram transferidos por inoculação de ponto para uma placa contendo meio completo, placas mestres. Após isolamento, os variantes foram transferidos por meio de um replicador de níquel-cromo para placas de análise (AZEVEDO *e col.*, 1976) objetivando a caracterização auxotrófica dos setores e em seguida foram estocados em tubos e placas de Petri contendo meio completo

Para estimar o grau de ploidia mediram-se com ocular micrométrica dez cadeias de conídios a fresco as quais foram comparadas com o tamanho das cadeias de conídios das linhagens A//MSE, e *pro paba y*.

### 3.2.5. Taxa de crescimento de variantes melhorados da linhagem A

Microcolônias obtidas de variantes melhorados provenientes de diferentes temperaturas foram transferidas para placas de Petri contendo meio completo e incubadas a 37ºC. Como controle utilizaram-se também, microcolônias das linhagens A, *pro paba y* e MSE. As placas foram dispostas nas prateleiras de uma incubadora tipo BOD, FANEM e distribuídas ao acaso. Os diâmetros das colônias foram medidos após dois e cinco dias de incubação. Tomaram-se duas medidas independentes em cada temperatura e foi utilizada a média dessas medidas.

### 3.2.6. Diâmetro de conídios e núcleos dos variantes do diplóide A//MSE

Para a coloração dos núcleos foi utilizada a técnica descrita por ROBINOW e CATEN (1969) com HCl-Giemsa, modificada por PAES DE BARROS (1977).

Utilizando-se uma alça de níquel-cromo, conídios de colônias com 72-96 horas de incubação a 37ºC, foram colocados sobre uma lâminula à qual adicionou-se uma gota de solução de albumina e foi feito um esfregaço. Após uma hora de secagem, fixou-se o material em 5 ml de solução de Helly, acrescida de 0,3 ml de formol neutro, por 15 minutos. Após este período, as lâminas foram transferidas para álcool etílico 70% e foram submetidas à hidrólise em ácido clorídrico 1N a 63ºC, por 20 minutos. Em seguida foram lavadas duas vezes em água destilada. A coloração foi feita em solução de Giemsa em tempo que variou de 15 a 25 minutos. Lavou-se a seguir a

preparação em tampão fosfato (pH 6,9) e colocou-se a lamínula sobre uma lâmina com uma gota do tampão. No caso de uso não imediato, as lâminas foram mantidas em refrigerador, no interior de placas de Petri contendo papel de filtro embebido na solução fosfato.

Fizeram-se medidas ao acaso, do diâmetro de 31 conídios e de seus respectivos núcleos. Para tais medidas utilizou-se ocular micrométrica (Carl Zeiss, 8X) e objetiva de imersão.

### 3.2.7. Obtenção de heterocários (*PONTECORVO e col., 1953*)

Os heterocários foram formados inoculando-se cerca de  $10^6$  conídios de cada uma das linhagens com diferentes requisitos nutricionais, em 2,5 ml de meio mínimo líquido mais 2% de meio completo o que permite a germinação inicial. Após 72 horas de incubação, formou-se uma película. Transferiu-se esta película para uma placa com meio mínimo, a qual foi dividida em quatro partes colocando-se uma parte em cada quadrante da placa.

### 3.2.8. Análise meiótica (*PONTECORVO e col., 1953*)

Cleistotécios foram obtidos de heterocários incubados a 37°C, por sete a 10 dias em placas vedadas com fita celulósica, o que favorece a formação dos mesmos. Foram escolhidos sob lupa os cleistotécios maiores por terem maior probabilidade de serem híbridos (*BARACHO e col., 1970*). Em placas com ágar 3%, os cleistotécios foram "rolados" para eliminar células de Hülle, conídios e hifas aderentes. Em seguida, foram transferidos, um a um com a alça de níquel-cromo para a parede de tubos com solução de tween e esmagados

com a ponta da pipeta contra a parede do tubo. Após a homogeneização das suspensões de esporos semeou-se por estria em placas de Petri com meio completo, cada suspensão de esporo para verificar se os cleistotécios eram híbridos. Transferiu-se 1 ml das suspensões de esporos para frascos com 9 ml de salina. Estas foram conservadas em refrigerador a 4°C. De cada cruzamento foi escolhido um cleistotécio híbrido. Semeou-se 0,1 ml da diluição apropriada da suspensão de ascósporos, em placas com meio completo. Após 72 horas de incubação a 37°C contaram-se os segregantes e colônias foram transferidas para placas com meio completo. Inocularam-se 26 colônias por placa, que foram incubadas por 72 horas a 37°C. Replicaram-se as placas mestras por meio de um replicador multifio, para os meios de análise. As leituras foram realizadas com 24 e 48 horas de crescimento.

### 3.2.9. Isolamento de diplóides (ROPER, 1952)

Retiram-se conídios dos heterocários obtidos (item 3.2.7) e estes foram suspensos em 5 ml de solução de tween. Após contagem do número de esporos no hemacitômetro semearam-se em 10 placas contendo MM, alíquotas dessa suspensão. Em cada placa foram semeados aproximadamente  $1 \times 10^7$  conídios. Após 72 horas de incubação os diplóides heterozigotos foram isolados, sendo reconhecidos pela coloração uniforme e tamanho dos seus conídios. A medição dos conídios foi feita com ocular micrométrica, tomando-se cadeias de cinco conídios em lâminas com lisol (1:10, lisofórmio, água destilada). Os diplóides assim isolados foram purificados em placas contendo meio mínimo e estocados em tubos de ensaio com meio mínimo.

### 3.2.10. Análise genética através do ciclo parassexual

Objetivando a localização de marcadores genéticos nos respeitivos grupos de ligação, foi feita a análise genética dos diplóides.

Inocularam-se conídios diplóides em quatro pontos de placas de Petri com meio completo acrescido de benlate ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) para se obter segregantes haplóides (HASTIE, 1970). Após sete a 10 dias de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$ , os setores originados foram purificados por estria, em MC e a seguir transferidos um a um para 26 pontos fixos em placas com meio completo. Após 72 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  as colônias foram replicadas para os meios de análise utilizando-se o replicador multifio. As leituras das placas foram feitas com 16 e 36 horas de incubação, anotando-se as colônias que cresceram e que não cresceram.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Linhagem A: Instabilidade e análise genética

#### 4.1.1. Instabilidade genética da linhagem A crescida em diferentes temperaturas .

A Tabela 3 apresenta o número total de setores produzidos pe la linhagem A de *A. nidulans* geneticamente instável, em diferentes temperaturas de incubação e compara com a linhagem *pro paba y*, não portadora de duplicação cromossómica. Na Tabela 4 estão discriminados os números e diferen tes tipos de setores originados espontaneamente da linhagem A, em diferentes temperaturas. O teste não paramétrico de Friedman (STEEL e TORRIE, 1960) foi utilizado para analisar os resultados obtidos.

Tabela 3 - Número de setores originados das linhagens A e *propabay* de *A. nidulans*, em diferentes temperaturas de incubação(40 repetições)

Linhagens	Temperatura (°C)			Total
	28	37	42	
A	15	150	235	419
<i>pro paba y</i>	00	00	00	00

Tabela 4 - Número e tipos de setores produzidos pela linhagem A de *A. nidulans* em diferentes temperaturas de incubação (40 repetições)

Setores	Tratamentos (°C)			Total	$\chi^2$ 1/ $\chi^2_r$
	28	37	42		
Amarelos	03	111	204	318	61,51**
Verdes	12	27	25	64	3,09 ns
Deteriorados	00	10	06	16	1,74 ns
Heterocarióticos	00	02	00	02	0,15 ns
Total	15	150	235	400	57,99**
Média de setor por placa	0,37	3,75	5,87	-	-

1/ Calculado pelo teste de Friedman (STEEL e TORRIE, 1960).

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

4.1.2. Caracterização dos setores melhorados originados da linhagem A.

Entre os setores da linhagem A analisados quanto à auxotrofia, um grupo de setores verdes mais claros do que a linhagem parental, requeria além de prolina e ácido *p*-aminobenzóico, também adenina e biotina como fatores de crescimento (Tabela 5).

Tabela 5 - Freqüência de setores melhorados da linhagem A que requerem adenina e biotina

Tratamento	Setores			
	Amarelos		Verdes	
	Total de setores analisados	ad <sup>-</sup> bi <sup>-</sup> (%)	Total de setores analisados	ad <sup>-</sup> bi <sup>-</sup> (%)
28°C	3	0	0	-
37°C	20	0	7	42,85
42°C	204	0	16	43,75

4.1.3. Características fenotípicas dos variantes melhorados da linhagem A, isolados para análise genética

a. Auxotrofia dos derivados melhorados

Setores melhorados, escolhidos ao acaso e provenientes de co

lônias diferentes, foram isolados e caracterizados para análise genética. Es-  
ses setores provieram de colônias crescidas a 28°, 37° e 42°C (setores a-  
marelos e verdes). Usou-se para designar os variantes melhorados a letra Eme  
(M) seguida da temperatura na qual foi obtido o setor, mais o número do se-  
tor; assim o primeiro derivado amarelo isolado de colônias crescidas a 37°C,  
é referido como M 37.1. Setor derivado de outro setor (derivativo de 1ª or-  
dem) é designado por um índice: M 37.1<sub>x</sub>. A Tabela 6 relaciona os variantes  
isolados.

Tabela 6 - Características dos variantes melhorados da linhagem A

Variante	Temperatura de obtenção ( $^{\circ}$ C)	Fenótipo		Instabilidade <sup>1/</sup>
		Cor	Auxotrofia	
M 28.1	28	Amarelo	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	-
M 28.2	28	Amarelo	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	-
M 28.3	28	Amarelo	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	+
M 37.1	37	Amarelo	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	-
M 37.2	37	Amarelo	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	-
M 37.3	37	Amarelo	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	-
M 37.4	37	Amarelo	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	-
M 37.5	37	Amarelo	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	-
M 37.6	37	Amarelo	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	-
M 37.7	37	Amar.claro	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	+
M 42.1	42	Amarelo	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	-
M 42.2	42	Amarelo	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	-
M 42.3	42	Amarelo	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	-
M 42.4	42	Amarelo	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	-
M 42.5	42	Amarelo	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	-
M 42.6	42	Verde claro	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup> ad <sup>-</sup> bi <sup>-</sup>	+
M 42.7	42	Verde claro	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup> ad <sup>-</sup> bi <sup>-</sup>	-
M 42.8	42	Verde	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	+
M 42.8 <sub>1</sub>	42	Verde claro	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup> ad <sup>-</sup> bi <sup>-</sup>	-
M 42.9	42	Verde claro	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup> ad <sup>-</sup> bi <sup>-</sup>	+
M 42.10	42	Verde	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup>	+
M 42.11	42	Verde claro	pro <sup>-</sup> paba <sup>-</sup> ad <sup>-</sup> bi <sup>-</sup>	-

+ Significa produção de setores.

Entre os setores amarelos, o M 37.2 apresentou aspecto "crinkled" mas esta característica não foi conservada depois do isolamento. O variante M 37.7 é proveniente de um setor amarelo claro com aspecto granulos. Quando foram semeados conídios desse setor originaram-se colônias verdes e amarelas claras, com bordos irregulares e que produziam setores amarelos de coloração semelhante à linhagem *pro paba y*.

Verificou-se também o grau de instabilidade das linhagens ensaiadas (Tabela 6). A Tabela 7 relaciona os tipos de setores encontrados. Os setores pardos apresentaram o mesmo crescimento da colônia original e os amarelos e verdes eram setores melhorados.

Tabela 7 - Número e tipos de setores produzidos pelos variantes melhorados, incubados seis dias a 37°C (4 repetições)

Variantes	Cor do variante	Número de setores produzidos	Fenótipo(s)
M 28.3	Amarelo	1	Amarelo
M 37.7	Amarelo claro	1	Amarelo
M 42.6	Verde claro	2	Deteriorado
M 42.8	Verde	3	Amarelo e verde
M 42.9	Verde claro	2	Pardo
M 42.10	Verde	1	Amarelo

b. Crescimento das colônias dos derivados melhorados

Para verificar se os variantes melhorados cresciam com uma mesma velocidade, mediu-se o diâmetro das colônias de 21 variantes da linha gem A, dos quais posteriormente, fez-se a análise genética. A Tabela 8 apresenta a média do crescimento desses variantes e das linhagens controles com dois, quatro e cinco dias de crescimento, a 37°C. A análise de variância para os valores obtidos com 2 e 5 dias de incubação estão na Tabela 9 e as comparações entre cada variante com as linhagens testemunhas, obtidas através do teste de Tukey (*STEEL e TORRIE, 1960*), encontram-se nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 8 - Médias dos diâmetros em centímetros, de quatro colônias de variantes melhorados originados da linhagem A e de linhagens controlares, crescidas a 37°C

Variantes	Médias dos diâmetros (cm)		
	2	4	5 (dias)
M 28.1	2,82	6,37	7,75
M 28.2	2,80	6,42	7,87
M 28.3	2,87	6,20	7,57
M 37.1	2,70	6,22	7,67
M 37.2	2,60	5,62	7,20
M 37.3	2,75	6,05	7,57
M 37.5	2,92	6,40	7,60
M 37.6	2,92	6,35	7,75
M 37.7	2,00	5,42	7,40
M 42.1	2,80	6,12	7,37
M 42.2	2,82	6,05	7,52
M 42.3	2,85	6,37	7,75
M 42.4	3,00	6,27	7,75
M 42.5	2,95	6,55	7,40
M 42.6	3,20	7,00	8,25
M 42.7	3,10	6,75	8,10
M 42.8	2,05	4,60	5,97
M 42.8 <sub>1</sub>	2,52	5,12	6,92
M 42.9	2,25	5,45	7,02
M 42.10	2,45	5,87	7,37
M 42.11	2,60	5,87	7,47
A	2,27	4,75	6,05
<i>propabay</i>	2,92	6,80	8,15
MSE	3,02	6,95	8,27

Tabela 9 - Análise da variância para os valores médios dos diâmetros das colônias de variantes melhoradas e de linhagens controles, obtidos para o 2º e 5º dias de crescimento, a 37°C

Dias de crescimento	FV	GL	SQ	QM	F	CV
2	Tratamento	23	9,31	0,40	3,08**	16,54%
	Resíduo	72	9,63	0,13		
	Total	95	18,94			
5	Tratamento	23	29,58	1,29	6,99**	8,94%
	Resíduo	.72	13,28	0,18		
	Total	95	42,86			

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

Tabela 10 - Comparaçao entre tratamentos, entre tratamentos e as testemunhas, pelo teste de Tukey com relação aos valores médios dos diâmetros dos quatro colônias dos derivados melhorados no segundo dia de crescimento, a 37°C

Tratamentos	M28.1	M28.2	M28.3	M27.1	M27.2	M27.3	M27.5	M27.6	M27.7	M22.1	M22.2	M22.3	M22.4	M22.5	M22.6	M22.7	M22.8	M22.9	M22.10	M22.11	A propab.
M28.2	ns																				
M28.3	ns	ns																			
M37.1	ns	ns	ns																		
M37.2	ns	ns	ns	ns																	
M37.3	ns	ns	ns	ns	ns																
M37.5	ns	ns	ns	ns	ns	ns															
M37.6	ns																				
M37.7	ns																				
M42.1	ns																				
M42.2	ns																				
M42.3	ns																				
M42.4	ns																				
M42.5	ns																				
M42.6	ns																				
M42.7	ns																				
M42.8	ns																				
M42.9	ns																				
M42.10	ns																				
M42.11	ns																				
A	ns	ns																			
propab.	ns	ns																			
HSE	ns	ns																			

$\delta = 0,978$  (52). \* Significativo a 5% de probabilidade.

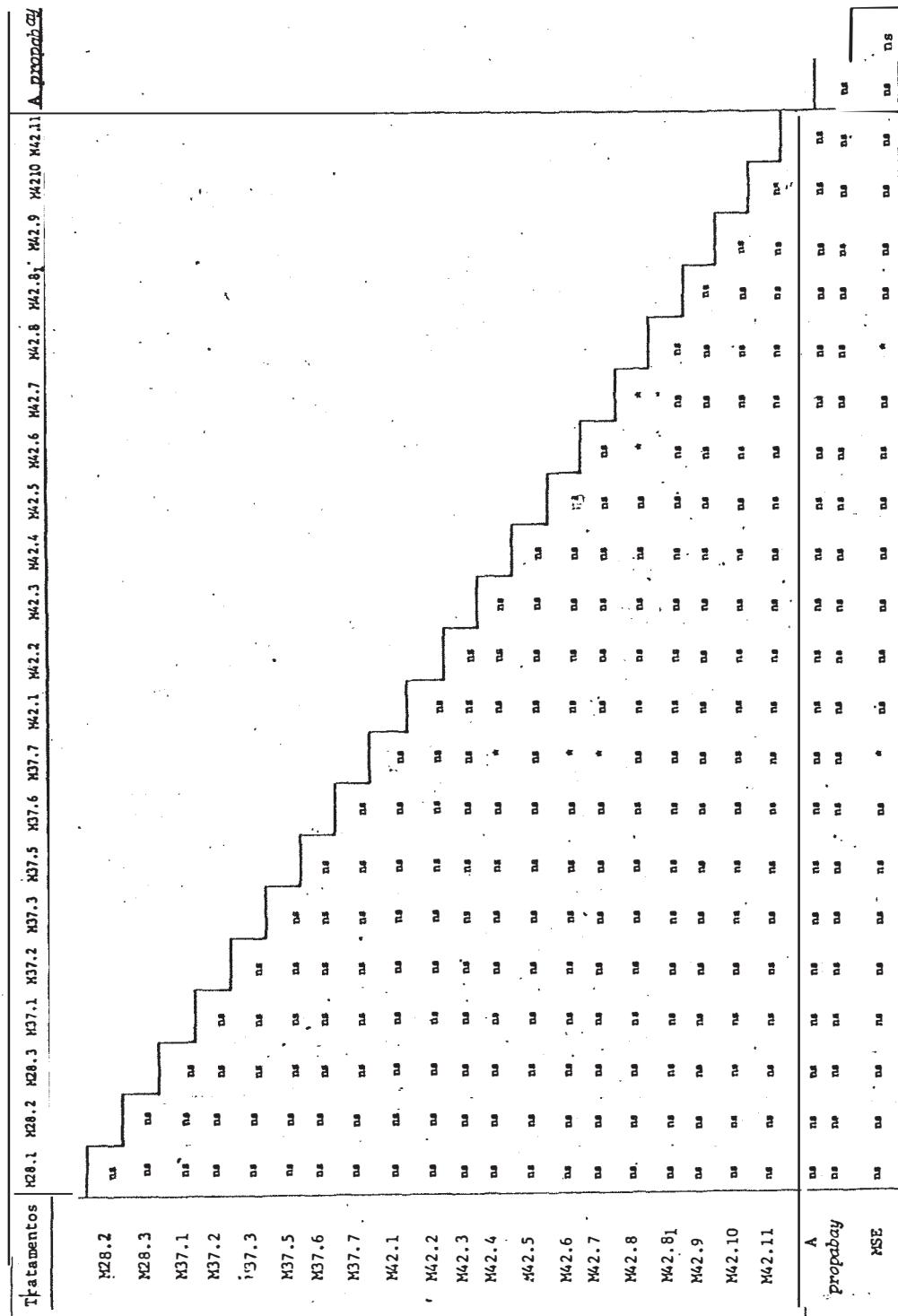


Tabela 11 - Comparação entre tratamentos, entre temunhas e entre testemunhas pelo teste de Tukey com relação aos valores médios dos diâmetros de quatro colônias dos derivados melhorados no quinto dia de crescimento, a 37°C

Tratamentos	M28.1	M28.2	M28.3	M37.1	M37.2	M37.3	M37.4	M37.5	M37.6	M37.7	M42.1	M42.2	M42.3	M42.4	M42.5	M42.6	M42.7	M42.8	M42.9	M42.10	M42.11	A probabilidade
M28.2	ns																					
M28.3	ns	ns																				
M37.1	ns	ns	ns																			
M37.2	ns	ns	ns	ns																		
M37.3	ns	ns	ns	ns	ns																	
M37.5	ns	ns	ns	ns	ns	ns																
M37.6	ns																					
M37.7	ns																					
M42.1	ns																					
M42.2	ns																					
M42.3	ns																					
M42.4	ns																					
M42.5	ns																					
M42.6	ns																					
M42.7	ns																					
M42.8	*	ns																				
M42.81	ns																					
M42.9	ns																					
M42.10	ns																					
M42.11	ns																					
A probabilidade	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
NSSE	ns	ns																				

$\Delta = 1,149$  (5%). \* Significativo a 5% de probabilidade.

4.1.4. Análise genética dos variantes melhorados originados da linhagem A, em diferentes temperaturas de incubação.

a) Análise genética dos cruzamentos controles

Objetivando comparar o comportamento meiótico e mitótico dos variantes melhorados com as linhagens controles, foi realizada em primeiro lugar a análise genética dos cruzamentos *pro paba y X MSE* e *A x MSE* (Tabelas 12, 13, 14).

Tabela 12 - Análise mitótica dos diplóides *pro paba y//MSE* e *A//MSE*

Grupos de ligação	Marcadores genéticos	Diplóides			
		<i>pro paba y//MSE</i>		<i>A//MSE</i>	
		Segregantes		Segregantes	
		Amarelo	Branco	Amarelo	Branco
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	07	03	01	13
	<i>pro</i>	04	07	02	10
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	07	03	01	13
	<i>paba</i>	04	07	02	10
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	11	10	03	22
	<i>ad</i>	00	00	00	01
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	11	10	03	23
	<i>bi</i>	00	00	00	00
II	<i>w</i> <sup>+</sup>	11	—	03	—
	<i>w</i>	—	10	—	23
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	05	08	03	12
	<i>gal</i>	06	02	00	11
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	05	04	03	08
	<i>pyro</i>	06	06	00	15
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	07	04	03	13
	<i>fac</i>	04	06	00	10
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	07	05	02	09
	<i>s</i>	04	05	01	14
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	05	06	03	12
	<i>nic</i>	06	04	00	11
	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	08	06	01	13
VIII	<i>ribo</i>	03	04	02	10

Tabela 13 - Análise meiotica do cruzamento entre a linhagem *pro paba y* e a MSE

Cruzamento <i>pro paba y</i> X MSE					
Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Segregantes		Total	$\chi^2$ <sup>1/</sup>
		Amarelos	Brancos		
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	14	11	25	
	<i>pro</i>	12	14	26	ns
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	13	10	23	
	<i>paba</i>	13	15	28	ns
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	23	22	45	
	<i>ad</i>	03	03	06	**
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	12	12	24	
	<i>gal</i>	14	13	27	ns
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	12	16	28	
	<i>pyro</i>	14	09	23	ns
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	12	17	29	
	<i>fac</i>	14	08	22	ns
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	13	16	29	
	<i>s</i>	13	09	22	ns
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	18	08	26	
	<i>nic</i>	08	17	25	ns
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	13	16	29	
	<i>ribo</i>	13	09	22	ns

1/ Valores do  $\chi^2$  considerando a proporção 1:1.

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

Tabela 14 - Análise meiótica do cruzamento entre a linhagem A e a MSE de *A. nidulans*

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Cruzamento A x MSE			Total	$\chi^2$ <sup>1/</sup>		
		Segregantes						
		Amarelo	Verde	Branco				
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	04	05	14	23			
	<i>pro</i>	09	08	12	29	ns		
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	05	05	15	25			
	<i>paba</i>	08	08	11	27	ns		
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	10	10	22	42			
	<i>ad</i>	03	03	04	10	**		
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	13	13	25	51			
	<i>bi</i>	00	00	01	01	**		
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	07	07	15	29			
	<i>gal</i>	06	06	11	23	ns		
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	06	06	12	24			
	<i>pyro</i>	07	07	14	28	ns		
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	08	08	10	26			
	<i>fac</i>	05	05	16	26	ns		
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	09	05	13	27			
	<i>s</i>	04	08	13	25	ns		
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	07	05	18	30			
	<i>nic</i>	06	08	08	22	ns		
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	06	08	16	30			
	<i>ribo</i>	07	05	10	22	ns		

<sup>1/</sup> Valores do  $\chi^2$  considerando a proporção de 1:1.

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

b. Análise genética dos variantes melhorados da linhagem A de *A. nidulans*, obtidos em diferentes temperaturas de incubação

Os resultados das análises mitótica e meiótica dos cruzamentos entre os variantes melhorados obtidos a 28°C encontram-se nas Tabelas 15, 16, 17. O nível de significância dos resultados das análises meióticas desses variantes e dos obtidos sob outras temperaturas foram determinados pelo Teste do  $\chi^2$ .

Nas análises genéticas dos variantes originados a 37°C (Tabelas 18, 19 e 20), o cruzamento entre o variante M 37.7 e a linhagem MSE produziu cleistotécios tanto abortivos quanto férteis. Entre os segregantes de cinco cleistotécios analisados, não se detectaram colônias com o fenótipo amarelo claro do variante M 37.7 descrito no item 4.13.

As Tabelas 21, 22 e 23 contêm os resultados da análise genética dos cruzamentos entre os variantes melhorados amarelos obtidos a 42°C e os resultados das análises dos variantes verdes, encontram-se nas Tabelas 22 e 24 a 31.

Dos heterocários formados pelos variantes M 42.10 e M 42.11 com a linhagem MSE originaram-se além de diplóides verdes, colônias brancas e amarelas que cresciam em MM; entretanto analisaram-se somente as colônias verdes. Não se obtiveram diplóides verdes do cruzamento entre o variante M 42.9 e a linhagem MSE e neste caso analisaram-se segregantes do diploide amarelo.

Observando-se a Tabela 22, vê-se que a segregação dos cruzamentos entre os variantes melhorados amarelos originados à 42ºC está de acordo com a proporção 1:1. Entretanto, os cruzamentos entre variantes melhorados verdes com a linhagem MSE apresentaram segregações anômalas, o que reflete alguma interferência na meiose.

Entre os segregantes dos cruzamentos M 42.7 x MSE e M 42.8<sub>1</sub> x MSE, detectaram-se apenas duas classes fenotípicas embora se esperasse a ocorrência de três classes: amarelas, verdes e brancas. Nesses casos, pesquisaram-se os ascóporos de oito cleistotécios em separado, com o objetivo de verificar a ocorrência dos três fenótipos.

Nos cruzamentos entre os variantes verdes M 42.6 e M 42.11 e a linhagem MSE, formaram-se dois tipos de cleistotécios: um mais frequente, produziu colônias amarelas e brancas, na proporção de 1:1 e o segundo tipo originando também, segregantes verdes.

Tabela 15 - Análise mitótica dos diplóides resultantes dos cruzamentos entre os variantes melhorados amarelos da linhagem A, originados a 28°C, e a linhagem MSE

Grupos de ligação	Marcadores genéticos	Variantes melhorados //MSE					
		M 28.1		M 28.2		M 28.3	
		Amarelo	Branco	Amarelo	Branco	Amarelo	Branco
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	08	11	08	08	03	10
	<i>pro</i>	04	01	05	03	01	09
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	08	11	08	08	03	10
	<i>paba</i>	04	01	05	03	01	09
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	12	12	13	11	04	19
	<i>ad</i>	00	00	00	00	00	00
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	12	12	13	11	04	19
	<i>bi</i>	00	00	00	00	00	00
II	<i>w</i> <sup>+</sup>	12	-	13	-	04	-
	<i>w</i>	-	12	-	11	-	19
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	04	07	06	04	03	12
	<i>gal</i>	08	05	07	07	01	07
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	08	03	06	09	02	09
	<i>pyro</i>	04	09	07	02	02	10
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	10	04	06	03	03	13
	<i>fac</i>	02	08	07	08	01	06
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	07	05	11	06	01	12
	<i>s</i>	05	07	02	05	03	07
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	03	06	06	06	01	12
	<i>nic</i>	09	06	07	05	03	07
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	09	04	08	07	02	10
	<i>ribo</i>	03	08	05	04	02	09

Tabela 16 - Segregantes meióticos resultantes dos cruzamentos entre os vari  
antes melhorados originados da linhagem A a 28°C e a linhagem  
MSE

Cruzamentos	Segregantes		Total	$\chi^2$ <sup>1/</sup>
	Amarelos	Brancos		
M 28.1	250	256	506	0,07 ns
M 28.2	236	232	468	0,03 ns
M 28.3	83	87	170	0,09 ns

<sup>1/</sup> Valores do  $\chi^2$  considerando a proporção 1:1.

Tabela 17 - Análises meióticas dos cruzamentos entre variantes melhorados a marelos originados da linhagem A a 28°C e a linhagem MSE

Grupos de ligação	Marcadores genéticos	Variantes melhorados x MSE		
		M 28.1	M 28.2	M 28.3
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	54	46	44
	<i>pro</i>	44	56	56
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	55	47	43
	<i>paba</i>	43	55	57
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	83	84	95
	<i>ad</i>	15**	18**	05**
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	98	102	100
	<i>bi</i>	00**	00**	00**
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	58	53	53
	<i>gal</i>	40	49	47
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	44	56	53
	<i>pyro</i>	54	46	47
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	64	56	57
	<i>fac</i>	34**	46	43
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	64	52	54
	<i>s</i>	34**	50	46
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	45	46	47
	<i>nic</i>	53	56	53
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	55	70	54
	<i>ribo</i>	43	32**	46

\*\* Teste do  $\chi^2$  significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 18 - Análise mitótica dos diplóides resultantes dos cruzamentos entre os variante melhorados originados da linhagem A a 37°C e a linhagem MSE

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Variante melhorado//NSE									
		M 37.1		M 37.2		M 37.3		M 37.4		M 37.5	
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	04	16	00	07	05	06	04	08	00	15
	<i>Pro</i>	02	05	01	11	04	05	06	00	02	05
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	04	16	00	07	05	06	04	08	00	15
	<i>paba</i>	02	05	01	11	04	05	06	00	02	05
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	06	21	01	17	09	11	10	08	02	20
	<i>ad</i>	00	00	00	01	00	00	00	00	00	01
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	06	21	01	18	09	10	10	08	02	20
	<i>bi</i>	00	00	00	00	00	01	00	00	00	00
II	<i>w</i> <sup>+</sup>	06	-	01	-	09	-	10	-	02	-
	<i>w</i>	-	21	-	18	-	11	-	08	-	20
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	03	08	00	08	04	06	02	03	02	09
	<i>gal</i>	03	13	01	10	05	05	08	05	00	11
IV	<i>Fyro</i> <sup>+</sup>	04	12	00	09	06	03	05	02	02	13
	<i>Fyro</i>	02	09	01	09	03	08	05	06	00	07
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	02	08	00	04	03	01	10	03	01	14
	<i>fac</i>	04	13	01	14	06	10	00	05	01	06
VI	<i>g</i> <sup>+</sup>	02	12	00	04	04	02	06	05	01	09
	<i>g</i>	04	09	01	14	05	09	04	03	01	11
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	04	14	00	10	04	05	06	07	02	12
	<i>nic</i>	02	07	01	08	05	06	04	01	00	08
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	02	09	00	10	06	05	06	04	02	10
	<i>ribo</i>	04	12	01	08	03	06	04	04	00	10

1/ a Significa segregantes amarelos  
b Significa segregantes brancos.

Tabela 19 - Segregantes meióticos resultantes dos cruzamentos entre os varianteis melhorados originados da linhagem A a 37ºC, e a linhagem MSE

Cruzamentos	Segregantes		Total	$\chi^2$	1/
	Amarelos	Brancos			
M 37.1 x MSE	104	102	206	0,02	ns
M 37.2 x MSE	214	190	404	1,42	ns
M 37.3 x MSE	112	128	240	1,06	ns
M 37.4 x MSE	50	64	114	1,72	ns
M 37.5 x MSE	64	68	132	0,12	ns
M 37.6 x MSE	166	179	358	1,89	ns
M 37.7 x MSE	123	117	240	0,15	ns

1/ Valores do  $\chi^2$  considerando a proporção 1:1.

Tabela 20 - Análises meióticas dos cruzamentos entre os variantes melhorados originados da linhagem A a 37°C e a linhagem MSE

Grupos de ligação	Marcadores genéticos	Variantes melhorados x MSE						
		M 37.1	M 37.2	M 37.3	M 37.4	M 37.5	M 37.6	M 37.7
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	52	44	45	51	47	60	46
	<i>pro</i>	52	58	57	53	55	44	58
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	50	46	43	54	49	62	44
	<i>paba</i>	54	56	59	50	53	42*	60
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	94	93	100	78	77	80	87
	<i>ad</i>	10**	09**	02**	26**	25**	24**	17**
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	104	99	102	104	100	104	104
	<i>bi</i>	00**	03**	00**	00**	03**	00**	00**
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	48	58	53	58	56	58	61
	<i>gal</i>	56	44	49	46	46	46	43
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	62	59	56	63	56	52	53
	<i>pyro</i>	42*	43	46	41*	46	52	51
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	54	58	51	47	40	53	61
	<i>fac</i>	50	44	51	57	62*	51	43
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	50	50	44	52	48	50	57
	<i>s</i>	54	52	58	52	54	54	47
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	52	60	56	57	56	58	47
	<i>nic</i>	52	42	46	47	46	46	57
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	43	53	52	49	60	46	53
	<i>ribo</i>	61	49	50	55	42	58	51

\* Teste do  $\chi^2$  significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* Teste do  $\chi^2$  significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 21 - Análises mitóticas dos diplóides resultantes dos cruzamentos entre os variantes melhorados amarelos originados da linhagem A a 42°C e a linhagem MSE

Grupos de ligação	Marcadores genéticos	Variantes melhorados //MSE									
		M 42.1 <sup>1/</sup>		M 42.2		M 42.3		M 42.4		M 42.5	
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	03	14	10	10	01	18	05	26	11	08
	<i>pro</i>	01	07	00	05	02	07	03	12	03	04
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	03	14	10	10	01	18	05	27	11	08
	<i>paba</i>	01	07	00	05	02	07	03	11	03	04
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	04	21	09	15	03	25	08	38	14	12
	<i>ad</i>	00	00	01	00	00	00	00	00	00	00
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	04	21	09	15	03	25	08	38	14	12
	<i>bi</i>	00	00	01	00	00	00	00	00	00	00
II	<i>w</i> <sup>+</sup>	04	-	10	-	03	-	08	-	14	-
	<i>w</i>	-	21	-	15	-	25	-	38	-	12
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	03	13	04	09	02	11	07	25	07	06
	<i>gal</i>	01	08	06	06	01	14	01	13	07	06
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	01	10	06	08	00	13	03	19	05	08
	<i>pyro</i>	03	11	04	07	03	12	05	19	09	04
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	02	07	03	05	02	07	07	25	09	04
	<i>fac</i>	02	14	07	10	01	18	01	13	05	08
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	02	08	06	08	00	12	04	18	08	07
	<i>s</i>	02	13	04	07	03	13	04	20	06	05
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	01	14	06	08	01	12	03	21	09	06
	<i>nic</i>	03	07	04	07	02	13	05	17	05	06
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	03	13	05	08	01	11	04	27	09	06
	<i>ribo</i>	01	08	05	07	02	14	04	11	05	06

<sup>1/</sup> a Significa segregantes amarelos

b Significa segregantes brancos.

Tabela 22 - Segregantes meióticos resultantes dos cruzamentos entre os variantes melhorados originados da linhagem A a 42°C e a linha gem MSE

Cruzamentos	Segregantes			Total	Proporção esperada	$\chi^2$
	Brancos	Verdes	Amarelos			
M 42.1 x MSE	174	-	162	336	1:1	ns
M 42.2 x MSE	84	-	93	177	1:1	ns
M 42.3 x MSE	157	-	159	316	1:1	ns
M 42.4 x MSE	160	-	159	319	1:1	ns
M 42.5 x MSE	136	-	144	280	1:1	ns
M 42.6 x MSE	165	97	74	336	2:1:1	ns
M 42.6 x MSE <sup>1/</sup>	107	00	116	223	1:1	**
						ns
M 42.7 x MSE	166	00	153	319	2:1:1	**
					1:1	ns
M 42.8 x MSE	207	76	157	440	2:1:1	**
M 42.8 <sub>1</sub> x MSE	467	00	441	903	2:1:1	**
					1:1	ns
M 42.9 x MSE	197	77	76	350	2:1:1	ns
M 42.10 x MSE	312	138	223	673	2:1:1	**
M 42.11 x MSE	43	47	27	117	2:1:1	**
M 42.11 x MSE <sup>1/</sup>	349	00	383	732	2:1:1	**
					1:1	ns

<sup>1/</sup> Analisaram-se, nesse caso, cleistotécios originados de dois cruzamentos.

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

Tabela 23 - Análise meiótica dos cruzamentos entre os variantes melhorados amarelos originados da linhagem A a 42°C e a linhagem MSE

Grupos de ligação	Marcadores genéticos	Variantes melhorados x MSE				
		M 42.1	M 42.2	M 42.3	M 42.4	M 42.5
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	52	54	55	48	56
	<i>pro</i>	50	50	49	56	48
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	48	51	54	52	54
	<i>paba</i>	54	53	50	52	50
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	76	93	87	97	97
	<i>ad</i>	26 **	11 **	17 **	07 **	07 **
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	101	102	103	104	103
	<i>bi</i>	01 **	02 **	01 **	00 **	01 **
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	62	69	56	64	52
	<i>gal</i>	40 *	35 **	48	40 *	52
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	56	48	58	56	57
	<i>pyro</i>	46	56	46	48	47
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	58	55	60	51	56
	<i>fac</i>	44	49	44	53	48
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	64	54	53	54	58
	<i>s</i>	38 **	50	51	50	46
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	56	58	55	49	58
	<i>nic</i>	46	46	49	55	46
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	48	59	59	56	69
	<i>ribo</i>	54	45	45	48	35 **

\* Teste do  $\chi^2$  significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* Teste do  $\chi^2$  significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 24 - Análises mitóticas dos diploïdes resultantes dos cruzamentos entre os variântes melhorados verdes originados da linhagem A a 42°C e a linhagem MSE

Grupos de ligação	Marcadores genéticos	Variantes melhorados // MSE																			
		M 42.6.1/			M 42.7			M 42.8			M 42.9			M 42.10			M 42.11				
		a	v	b	a	v	b	a	v	b	a	v	b	a	v	b	a	v	b		
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	01	00	12	02	01	17	02	02	10	02	00	12	02	16	04	03	10	00	00	30
	<i>pro</i>	00	10	00	00	05	00	01	01	05	00	08	00	00	03	00	01	10	01	00	00
	<i>poba</i> <sup>+</sup>	01	00	12	02	01	17	02	02	10	02	00	12	02	16	04	03	10	00	00	30
	<i>poba</i>	00	10	00	00	05	00	01	01	05	00	08	00	00	03	00	01	10	01	00	00
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	01	10	12	02	06	17	03	03	14	02	01	12	02	19	04	04	20	01	00	30
	<i>ad</i>	00	00	00	00	00	00	00	00	01	00	07	00	00	00	00	00	00	00	00	00
	<i>bt</i> <sup>+</sup>	01	00	12	02	00	17	03	02	15	02	00	12	02	19	04	04	20	01	00	30
	<i>bt</i>	00	10	00	00	06	00	00	01	00	00	08	00	00	00	00	00	00	00	00	00
II	<i>w</i> <sup>+</sup>	01	10	00	02	06	-	03	03	-	02	08	-	02	-	04	04	-	01	00	-
	<i>w</i>	-	-	12	-	-	17	-	-	15	-	-	12	-	19	-	-	20	-	00	30
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	01	05	07	01	04	10	02	02	08	00	02	07	01	12	02	03	05	01	00	15
	<i>gal</i>	00	05	05	01	02	07	01	01	07	02	06	05	01	07	02	01	15	00	00	15
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	00	04	05	00	06	06	03	03	06	02	01	04	00	14	01	03	11	01	00	17
	<i>pyro</i>	01	06	07	02	00	11	00	00	09	00	07	08	02	05	03	01	09	00	00	13
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	01	03	03	00	01	09	00	01	06	00	03	09	01	12	01	04	11	01	00	12
	<i>fac</i>	00	07	09	02	05	08	03	02	09	02	05	03	01	07	03	00	09	00	00	18
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	00	03	07	02	07	00	02	09	00	06	07	01	18	02	03	10	01	00	17	
	<i>s</i>	01	07	05	00	04	10	03	01	06	02	02	05	01	01	02	01	10	00	00	13
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	01	04	09	01	03	09	02	02	06	02	07	09	01	13	03	03	10	01	00	16
	<i>nic</i>	00	06	03	01	03	08	01	01	09	00	01	03	01	06	01	01	10	00	00	14
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	00	03	11	02	03	10	01	02	09	02	07	01	14	03	04	09	01	00	12	
	<i>ribo</i>	01	07	01	00	03	07	02	01	06	00	01	05	01	05	01	00	11	00	00	18

1/ a Significa segregantes amarelos;

b Significa segregantes verdes;

c Significa segregantes brancos.

Tabela 25 - Análise meiótica do cruzamento entre o variante melhorado M42.6 e a linhagem MSE

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Segregantes			Total	$\chi^2$
		Amarelos	Verdes	Brancos		
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	26	03	30	59	
	<i>pro</i>	00	22	22	44	ns
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	25	03	29	57	
	<i>paba</i>	01	22	23	46	ns
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	26	19	39	84	
	<i>ad</i>	00	06	13	19	**
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	26	12	32	70	
	<i>bi</i>	00	13	20	33	**
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	13	14	26	53	
	<i>gal</i>	13	11	26	50	ns
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	15	13	22	50	
	<i>pyro</i>	11	12	30	53	ns
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	14	13	23	50	
	<i>fac</i>	12	12	29	53	ns
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	11	10	20	41	
	<i>s</i>	15	15	32	62	*
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	11	14	24	49	
	<i>nic</i>	15	11	28	54	ns
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	18	13	16	47	.
	<i>ribo</i>	08	12	36	56	ns

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

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

Tabela 26 - Análise meiótica do cruzamento entre o variante melhorado M42.7 e a linhagem MSE

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Amarelo	Segregantes <sup>1/</sup>		Total	$\chi^2$
			Branco			
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	33	35	68		
	<i>pro</i>	30	31	61	ns	
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	33	33	66		
	<i>paba</i>	30	33	63	ns	
	<i>ad</i> <sup>†</sup>	51	52	103		
	<i>ad</i>	12	14	26	**	
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	63	66	129		
	<i>bi</i>	00	00	00	**	
II	<i>gal</i> <sup>+</sup>	27	35	62		
	<i>gal</i>	36	31	67	ns	
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	33	28	61		
	<i>pyro</i>	30	38	68	ns	
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	34	33	67		
	<i>fac</i>	29	33	62	ns	
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	37	39	76		
	<i>s</i>	26	27	53	*	
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	33	32	65		
	<i>nic</i>	30	34	64	ns	
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	37	26	63		
	<i>ribo</i>	26	40	66	ns	

<sup>1/</sup> Não ocorreram segregantes verdes.

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

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

Tabela 27 - Análise meiótica do cruzamento entre o variante melhorado M42.8 e a linhagem MSE

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Segregantes			Total	$\chi^2$
		Amarelos	Verdes	Brancos		
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	10	13	16	39	
	<i>pro</i>	16	9	36	61	*
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	10	13	16	39	
	<i>paba</i>	16	9	36	61	*
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	26	14	39	79	
	<i>ad</i>	00	08	13	21	**
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	26	17	48	91	
	<i>bi</i>	00	05	04	09	**
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	10	08	23	41	
	<i>gal</i>	16	14	29	59	*
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	15	07	25	47	
	<i>pyro</i>	11	15	27	53	ns
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	07	13	25	45	
	<i>fac</i>	19	9	27	55	ns
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	11	11	28	50	
	<i>s</i>	15	11	24	50	ns
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	15	06	23	44	
	<i>nic</i>	11	16	29	56	ns
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	15	08	27	50	
	<i>ribo</i>	11	14	25	50	

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

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

Tabela 28 - Análise meiótica do cruzamento entre o variante melhorado M42.8<sub>1</sub>  
e a linhagem MSE

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Segregantes <sup>1/</sup>		Total	$\chi^2$
		Amarelos	Brancos		
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	32	25	57	ns
	<i>pro</i>	19	27	46	
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	30	22	52	ns
	<i>paba</i>	21	30	51	
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	50	50	100	**
	<i>ad</i>	01	02	03	
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	50	51	101	**
	<i>bi</i>	01	01	02	
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	25	21	46	ns
	<i>gal</i>	26	31	57	
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	33	26	59	ns
	<i>pyro</i>	18	26	44	
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	26	32	58	ns
	<i>fac</i>	25	20	45	
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	37	21	58	ns
	<i>s</i>	14	31	45	
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	28	28	56	ns
	<i>nic</i>	23	24	47	
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	35	28	63	*
	<i>ribo</i>	16	24	40	

<sup>1/</sup> Não ocorreram segregantes verdes.

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

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

Tabela 29 - Análise meiótica do cruzamento entre o variante melhorado M42.9 e a linhagem MSE

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Segregantes			Total	$\chi^2$
		Amarelos	Verdes	Brancos		
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	24	10	24	58	
	<i>pro</i>	01	14	28	43	ns
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	24	10	28	62	
	<i>paba</i>	01	14	24	39	*
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	23	22	40	85	
	<i>ad</i>	02	02	12	16	**
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	22	10	30	62	
	<i>bi</i>	03	14	22	39	*
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	17	19	22	58	
	<i>gal</i>	08	05	30	43	ns
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	11	14	26	51	
	<i>pyro</i>	14	10	26	50	ns
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	13	12	21	46	
	<i>fac</i>	12	12	31	55	ns
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	11	10	28	49	
	<i>s</i>	14	14	24	52	ns
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	13	15	28	56	
	<i>nic</i>	12	19	24	45	ns
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	15	08	32	55	
	<i>ribo</i>	10	16	20	46	ns

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

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

Tabela 30 - Análise meiótica do cruzamento entre o variante melhorado M42.10 e a linhagem MSE

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Segregantes			Total	$\chi^2$
		Amarelos	Verdes	Brancos		
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	09	07	26	42	.
	<i>pro</i>	17	17	26	60	ns
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	08	11	21	40	
	<i>paba</i>	18	13	31	62	*
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	26	21	49	96	
	<i>ad</i>	00	03	03	06	**
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	25	11	35	71	
	<i>bi</i>	01	13	17	31	**
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	14	13	25	52	
	<i>gal</i>	12	11	27	50	ns
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	13	09	31	53	
	<i>pyro</i>	13	15	21	49	ns
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	16	10	28	54	
	<i>fac</i>	10	14	24	48	ns
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	19	09	27	55	
	<i>s</i>	07	15	25	47	ns
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	19	15	29	63	
	<i>nic</i>	07	09	23	39	*
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	16	09	30	53	
	<i>ribo</i>	10	15	22	57	ns

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

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

Tabela 31 - Análise meiótica do cruzamento entre o variante melhorado M 42.11 e a linhagem MSE

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Segregantes			Total	$\chi^2$
		Amarelos	Verdes	Brancos		
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	19	07	33	59	**
	<i>pro</i>	04	16	13	33	
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	19	06	34	59	**
	<i>paba</i>	04	17	12	33	
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	23	18	31	72	**
	<i>ad</i>	00	05	15	20	
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	23	12	35	70	**
	<i>bi</i>	00	11	11	22	
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	11	12	21	44	ns
	<i>gal</i>	12	11	25	48	
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	12	13	25	50	ns
	<i>pyro</i>	11	10	21	42	
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	13	14	24	51	ns
	<i>fac</i>	10	09	22	41	
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	12	16	21	49	ns
	<i>s</i>	11	07	25	43	
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	14	15	25	54	ns
	<i>nic</i>	09	08	21	38	
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	10	14	25	49	ns
	<i>ribo</i>	13	09	21	43	

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

## 4.2. Diploide A//MSE instabilidade e análise genética

### 4.2.1. Instabilidade genética do diploide A//MSE crescido em diferentes temperaturas.

Nas Tabelas 32 e 33 estão relacionados os tipos e os números de setores originados das linhagens A//MSE e *bi//MSE*, incubados por oito dias a 28°C, 37°C e 42°C.

Na temperatura de 42°C, os setores amarelos originaram-se juntos, o que não permitiu a estimativa do nº de setores produzidos. Isso não traduz necessariamente um aumento significativo com relação ao número de melhorados detectados a 37°C.

Nas colônias do diploide A//MSE, além de setores melhorados amarelos, brancos e verdes ocorreram setores com micélio "flufly" ou mosqueados, sendo que os últimos deram por semeadura, origem a colônias cor de vinho, amarelas e brancas.

Tabela 32 - Instabilidade genética do diplóide A//MSE de *A. midulans* cresci  
do por oito dias, em diferentes temperaturas (40 repetições)

Setores	Tratamentos			Total
	28°C	37°C	42°C	
Amarelos	290	428	... <sup>1/</sup>	...
Brancos	20	68	63	151
Verdes	00	01	01	02
Deteriorados	08	02	00	10
Outros	04	04	01	09
Total	322	503	...	...
Média de setor por placa	8,05	12,67	-	-

<sup>1/</sup> Não foi possível a contagem do número de setores.

Tabela 33 - Instabilidade genética do diplóide controle *bi*//MSE de *A. nidulans*, crescidos por oito dias em diferentes temperaturas (40 repetições)

Setores	Tratamentos			Total	$\chi^2_r$ <sup>1/</sup>
	28°C	37°C	42°C		
Amarelos	07	20	37	64	1,55 ns
Brancos	08	16	06	30	0,61 ns
Verdes	07	14	03	24	0,49 ns
Deteriorados	00	00	00	00	-
Outros	06	00	00	06	0,94 ns
Total	28	50	46	124	2,29 ns
Média de setor por placa	0,70	1,27	1,15	-	

<sup>1/</sup> Calculado pelo Teste de Friedman (STEEL e TORRIE, 1960)

#### 4.2.2. Caracterização dos setores melhorados do diplóide A//MSE, obtidos espontaneamente

Setores melhorados amarelos e brancos, originados do diplóide A//MSE em cada temperatura e escolhidos ao acaso, foram caracterizados para marcadores auxotróficos (Tabela 34).

Tabela 34 - Freqüência de setores melhorados prototróficos e auxotróficos produzidos pelo diplóide A//MSE crescido por oito dias, em diferentes temperaturas

Temperatura	Total de setores analisados	Setores (%)					
		Prototróficos			Auxotróficos		
		Amarelo	Branco	Verde	Amarelo	Branco	Verde
28°C	76	51,31	3,95	21,05	1,31	22,37	0,0
37°C	219	74,43	3,20	0,46	5,48	16,44	0,0
42°C	101	71,29	1,98	1,98	9,90	14,85	0,0

#### 4.2.3. Medida do diâmetro dos conídios e respectivos núcleos de setores auxotróficos e prototróficos e de linhagens controle

Com o objetivo de verificar o grau de ploidia dos setores auxotróficos, mediu-se o diâmetro dos conídios e núcleos de setores amarelos e brancos auxotróficos e prototróficos, assim como das linhagens controle. Na Tabela 35 os setores dos quais mediram-se os diâmetros dos núcleos e conídios são numerados de um a treze e esta mesma designação é usada na Tabe-

la 37. A análise de variância dos dados mostrou haver diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 36).

A comparação das médias dos diâmetros de conídios dos setores melhorados da linhagem A//MSE e dos controles, foi feita pelo teste de Tukey (Tabela 37) sendo que nesta Tabela usaram-se como testemunhas as linhagens *pro paba y*, A e, os diplóides *pro paba y* //MSE e A//MSE.

Na comparação das médias dos núcleos dos variantes e das linhagens controles pelo teste de Tukey, não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos e os controles.

#### 4.2.4. Análise genética dos variantes melhorados derivados do diplóide A//MSE de *A. nidulans*, obtidos espontaneamente em diferentes temperaturas de incubação.

Analisaram-se, através do ciclo parassexual, setores melhorados amarelos originados do diplóide A//MSE sob diferentes temperaturas (Tabelas 38, 39 e 40).

Escolheram-se setores prototróficos e que apresentavam o comprimento das cadeias de cinco conídios próximo ao tamanho das cadeias do diplóide parental. Estes setores mostraram-se estáveis quando cresciam a 37°C e foram haploidizados com benlate. Alguns variantes apresentaram uma certa resistência à haploidização, produzindo poucos setores embora tivessem um crescimento próximo ao normal nas placas com meio completo mais benlate.

Tabela 35 - Valores médios ( $\bar{m}$ ) do diâmetro de 31 conídios e núcleos dos setores do diplóide A//MSE e de linhagens controles, com seus respectivos desvios padrões (s)

Setores	Fenótipos dos setores		Diâmetro ( $\text{m}\mu$ )				
	Cor dos conídios	Requerimentos nutricionais	Conídios		Núcleos		
			$\bar{m}$	s	$\bar{m}$	s	
1	Amarelo	prototrófico	3,44	0,3030	1,48	0,1824	
2	Amarelo	prototrófico	3,49	0,3166	1,52	0,2336	
3	Amarelo	prototrófico	3,45	0,2320	1,43	0,1575	
4	Amarelo	pro, paba	2,95	0,2595	1,31	0,2009	
5	Amarelo	pro, paba, gal,s,nic	2,95	0,2308	1,20	0,2002	
6	Amarelo	nic	3,60	0,2280	1,64	0,1640	
7	Amarelo	ad, nic	3,19	0,2628	1,44	0,1728	
8	Amarelo	s	3,52	0,3068	1,52	0,1717	
9	Branco	prototrófico	3,20	0,2496	1,62	0,1744	
10	Branco	paba,pro,gal,pyro, fac,s,nic	3,11	0,2976	1,42	0,1452	
11	Branco	gal, pyro,fac,ribo	2,77	0,2971	1,27	0,2092	
12	Branco	gal,pyro,fac,s,nic, ribo	2,85	0,2073	1,40	0,1750	
13	Branco	pyro, fac	2,95	0,2590	1,36	0,1546	
<i>pro paba y</i>		Amarelo	pro,paba	2,85	0,3008	1,18	0,1238
A	Verde	pro,paba	3,18	0,2581	1,35	0,1473	
<i>pro paba//</i>							
MSE	Amarelo	prototrófico	3,52	0,2389	1,65	0,1471	
A//MSE	Verde	prototrófico	3,58	0,2545	1,43	0,1978	

Tabela 36 - Análise da variância dos valores médios obtidos para diâmetro de conídios e, núcleos de setores do diploide A//MSE e linhagens controles

Diâmetro	FV	GL	SQ	QM	F	CV
Conídio	Tratamento	16	52,5201	3,2825	45,91**	
	Resíduo	510	36,4913	0,0715		12,82%
	Total	526	89,0114	-		
Núcleo	Tratamento	16	9,6560	0,6035	1,93*	
	Resíduo	510	15,9703	0,3131		15,60%
	Total	526	25,6263	0,0487		

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

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

Tabela 37 - Comparação entre tratamentos, entre testemunhas e entre testemunhas, pelo teste de Tukey com relação aos valores médios dos diâmetros dos conídios dos variantes melhorados do diplóide A//MSE.

Tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	pro paba y // pro paba y // MSE
2	ns													
3	ns	ns												
4	*	*	*											
5	*	*	*	*	ns									
6	ns	ns	ns	*	*	*								
7	*	ns	*	*	*	*								
8	ns	ns	ns	*	*	*	ns	*						
9	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	*					
10	*	*	*	*	ns	ns	*	*	*	*				
11	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns			
12	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	ns	*	*			
13	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*		
pro paba y	*	*	*	ns	ns	*	*	*	*	ns	ns	*		
A	*	*	*	ns	ns	*	ns	*	ns	*	*	*	*	
pro paba y // MSE	ns	ns	ns	*	*	ns	*	ns	*	*	*	*	*	
A // MSE	ns	ns	ns	*	*	ns	*	ns	*	*	*	*	*	ns

$\Delta=0,2348$  \* Médias diferentes ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 38 - Análise mitótica dos derivados diplóides da linhagem A//MSE, originados espontaneamente a 28°C.

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Derivados melhorados //MSE															
		D28.1 <sup>1/</sup>				D28.2				D28.3				D28.4			
		b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	
I	pro <sup>*</sup>	0.3	0.7	0.3	0.9	0.9	0.0	0.9	0.6	0.9	0.5	1.0	0.8	0.9	0.7	0.7	
	pro	0.3	0.7	0.5	0.2	1.0	0.1	0.3	0.6	0.7	0.4	0.6	0.0	0.4	0.5	0.3	
	pab <sub>1</sub> <sup>*</sup>	0.3	0.7	0.3	0.9	0.9	0.0	0.9	0.6	0.9	0.5	0.9	0.8	0.7	0.6	0.3	
	pab <sub>2</sub>	0.3	0.7	0.5	0.2	1.0	0.1	0.3	0.6	0.7	0.4	0.7	0.0	0.4	0.2	0.5	
	ad <sup>*</sup>	0.6	1.4	0.8	1.1	1.9	0.1	1.2	1.1	1.6	0.9	1.6	0.8	1.3	1.0	1.2	
	ad	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	bi <sup>*</sup>	0.6	1.4	0.8	1.1	1.9	0.1	1.2	1.1	1.6	0.8	1.6	0.6	1.0	1.2	1.2	
	bi	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0	
II	ω <sup>*</sup>	0.6	-	0.8	-	1.9	-	1.2	-	1.6	-	1.6	-	1.3	-	-	
	ω	-	1.4	-	1.1	0.0	0.1	-	1.2	-	0.9	-	0.8	-	1.0	-	
III	gal <sup>*</sup>	0.4	1.1	0.4	0.6	0.9	0.0	0.8	0.9	0.7	0.3	0.6	0.3	0.8	0.3	0.5	
	gal	0.2	0.3	0.4	0.5	1.0	0.1	0.4	0.3	0.9	0.6	1.0	0.5	0.7	0.7	0.4	
IV	Fy <sub>1</sub> o <sup>*</sup>	0.3	0.7	0.1	0.5	1.1	0.1	0.8	0.4	1.1	0.4	0.9	0.5	0.6	0.5	0.6	
	Fy <sub>2</sub> o	0.3	0.7	0.7	0.6	0.8	0.0	0.4	0.8	0.5	0.5	0.7	0.3	0.5	0.7	0.4	
V	fac <sup>*</sup>	0.5	0.9	0.6	0.5	0.2	0.0	0.6	0.6	0.4	0.6	0.5	0.3	0.6	0.3	0.9	
	fac	0.1	0.5	0.2	0.6	1.7	0.1	0.6	0.8	1.0	0.4	0.8	0.5	0.7	0.7	0.4	
VI	θ <sup>*</sup>	0.2	0.8	0.4	0.4	1.1	0.1	0.5	0.4	0.8	0.6	0.4	0.3	0.9	0.8	0.6	
	θ	0.4	0.6	0.4	0.7	0.8	0.0	0.7	0.8	0.3	1.2	0.5	0.8	0.7	0.3	0.6	
VII	nic <sup>*</sup>	0.5	0.7	0.1	0.5	1.3	0.1	0.4	0.2	0.7	0.4	0.6	0.3	0.9	0.2	0.5	
	nic	0.1	0.7	0.6	0.6	0.6	0.0	0.8	1.0	0.9	0.5	1.0	0.5	0.8	0.5	0.6	
VIII	rib <sub>1</sub> o <sup>*</sup>	0.2	1.0	0.7	0.3	0.8	0.1	1.1	0.9	0.7	1.3	0.6	0.7	0.6	0.8	1.0	
	rib <sub>1</sub> o	0.4	0.4	0.1	0.8	1.1	0.0	0.1	0.3	0.9	0.2	0.3	0.2	0.4	0.4	0.7	
Total de segregantes analisados		20	19	20	24	25	24	25	23	24	22	21	21	25	25	25	

1/ a Significa segregantes amarelos,

b Significa segregantes brancos.

Tabela 39 - Análise mitótica dos derivados diplóides da linhagem A//MSE originados espontaneamente a 37°C

Grupos de linhagens	Marcadores genéticos	Derivados melhorados // MSE										D37.7	D37.8					
		D37.1 <sup>a</sup> / D37.2		D37.3		D37.4		D37.5		D37.6								
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b					
I	<i>pro+</i>	09	07	07	08	02	07	06	05	07	11	08	07	07	03	03	10	
	<i>pro</i>	02	03	07	05	01	04	01	10	03	02	02	05	04	06	04	07	
	<i>pabat+</i>	09	07	07	08	02	07	06	05	07	12	08	07	07	04	03	10	
	<i>paba</i>	02	03	07	05	01	04	01	10	03	01	02	05	04	05	04	07	
	<i>ad+</i>	11	10	14	13	03	07	07	15	10	13	10	12	11	09	07	17	
	<i>ad</i>	00	00	00	00	00	06	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	
	<i>bs+</i>	11	10	14	13	03	13	07	15	10	13	10	12	11	09	07	17	
	<i>bi</i>	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	
II	<i>w+</i>	11	-	14	-	03	-	07	-	10	-	10	-	11	-	07	-	
	<i>w</i>	-	10	-	13	-	13	-	15	-	13	-	12	-	09	-	17	
III	<i>gat+</i>	03	05	09	09	01	09	02	08	04	07	05	05	06	05	04	05	08
	<i>gat</i>	08	05	05	04	02	04	05	11	06	06	05	06	06	05	02	09	
	<i>pyro+</i>	08	04	07	10	01	10	02	04	07	07	05	05	06	05	03	08	
	<i>Fyro</i>	03	06	07	03	02	03	05	07	03	06	05	07	05	04	04	09	
V	<i>fac+</i>	05	06	08	07	03	09	05	08	10	09	05	03	04	03	03	11	
	<i>fac</i>	06	04	06	06	00	04	02	07	00	04	05	09	07	06	04	06	
VI	<i>a+</i>	07	03	06	08	01	04	07	08	05	04	02	08	03	06	03	07	
	<i>a</i>	04	07	07	08	05	02	09	00	08	05	09	08	04	03	04	10	
VII	<i>nict+</i>	03	06	06	07	01	06	02	07	08	06	02	05	06	05	05	09	
	<i>nict</i>	08	04	08	06	02	07	05	07	02	07	08	07	03	04	02	08	
VIII	<i>ritlo+</i>	08	04	09	07	01	07	05	07	06	05	04	06	06	02	05	09	
	<i>ritlo</i>	03	06	05	06	02	06	02	08	04	08	06	06	05	07	02	08	
Total de segregantes																		
Ranque analisados		21	27	16	22	23	22	22	23	22	22	20	20	24				

<sup>a</sup> Significa segregantes amarelos.

<sup>b</sup> Significa segregantes brancos.

Tabela 40 - Análise mitótica dos derivados diplóides da linhagem A//MSE, originados espontaneamente a 42°C

Grupo de ligação	Marcadores genéticos	Derivados melhorados //MSE							
		D42.1 <sup>1/</sup>		D42.2		D42.3		D42.4	
		a	b	a	b	a	b	a	b
I	<i>pro</i> <sup>+</sup>	13	09	08	08	02	08	08	09
	<i>pro</i>	02	01	01	05	05	06	04	04
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	13	09	08	08	02	08	08	09
	<i>paba</i>	02	01	01	05	05	06	04	04
	<i>ad</i> <sup>+</sup>	15	10	09	13	07	14	12	13
	<i>ad</i>	00	00	00	00	00	00	00	00
	<i>bi</i> <sup>+</sup>	15	09	09	13	07	14	12	13
	<i>bi</i>	00	01	00	00	00	00	00	00
II	<i>w</i> <sup>+</sup>	15	-	09	-	07	00	12	-
	<i>w</i>	-	10	-	13	-	14	-	13
III	<i>gal</i> <sup>+</sup>	02	04	03	09	03	10	10	04
	<i>gal</i>	13	06	06	04	04	04	02	09
IV	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	11	07	06	05	04	07	10	07
	<i>pyro</i>	04	03	03	08	03	07	02	06
V	<i>fac</i> <sup>+</sup>	07	06	04	04	04	08	09	07
	<i>fac</i>	08	04	05	09	03	06	03	06
VI	<i>s</i> <sup>+</sup>	13	06	05	07	04	06	04	07
	<i>s</i>	02	04	04	06	03	08	08	06
VII	<i>nic</i> <sup>+</sup>	07	06	05	05	04	09	06	10
	<i>nic</i>	08	04	04	08	03	05	06	03
VIII	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	10	07	03	06	04	04	08	09
	<i>ribo</i>	05	03	06	07	03	10	04	03
Total de segregantes analisados		25		22		21		24	

1/ a Significa segregantes amarelos.

b Significa segregantes brancos.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Instabilidade da linhagem duplicada Dp(I-II)

Nas três temperaturas analisadas, a linhagem A mostrou maior instabilidade a 42°C, seguindo-se as temperaturas de 37 e 28°C (Tabelas 3 e 4) sendo que entre os tipos de setores produzidos, o amarelo aumentou significativamente com a temperatura.

Considerando as prováveis origens dos setores melhorados e deteriorados de *A. nidulans* (NGA e ROPER, 1968, 1969; AZEVEDO e ROPER, 1970) supõe-se então que a temperatura atua no mecanismo que determina a eliminação da duplicação cromossômica, mas aparentemente não afeta rearranjos do material genético, que dão origem aos deteriorados.

Vários trabalhos relacionaram modificações da instabilidade de linhagens duplicadas de *A. nidulans*, com alterações ambientais. Certas mutações que determinam sensibilidade à luz ultra-violeta aumentam a instabilidade (BURR, 1973, apud MAJERFELD e ROPER, 1978) e a luz ultra violeta determina grande produção de setores em linhagens Dp(I-II) (MENEZES, 1974; AZEVEDO,

1975; PARAG e ROPER, 1975). Tratamentos com azul de tripan (COOKE e col., 1970), cafeína (ROPER e PALMER, 1972); DNA exógeno (MENEZES, 1974) cloro neb (AZEVEDO e col., 1977); coumarim (MAJERFELD e ROPER, 1978) e outras drogas, determinam maior instabilidade em linhagens duplicadas de *A. nidulans*. Por outro lado, certas drogas estabilizam tais linhagens duplicadas como é o caso de baixas concentrações de 1-4 oxathin (AZEVEDO e col., 1977) e de brometo de etídio (BONATELLI e AZEVEDO, 1977).

A variação significativa de setores amarelos na linhagem Dp (I-II) com a elevação da temperatura (Tabela 4), indica que temperaturas mais altas favorecem o mecanismo responsável pela eliminação do segmento translocado e está de acordo com a hipótese de que mecanismos intracromossômicos estão envolvidos na elisão da duplicação (NGA e ROPER, 1968; ROPER e col., 1972; CASE e ROPER, 1981). A ocorrência de setores verdes não é influenciada significativamente pelo aumento da temperatura evidenciando assim a perda preferencial do segmento translocado.

Em 1968, NGA e ROPER verificaram que a instabilidade de colônias com duplicações cromossômicas aumentava quando crescidas a 34 e 42°C. Estudando o padrão de instabilidade de duas linhagens duplicadas Dp (I-II) e Dp(III-VIII) LIEBER (1976) observou que ambas respondiam de modo diverso à variação da temperatura. A linhagem Dp(III-VIII) foi mais instável a 28°C enquanto a linhagem Dp(I-II), produziu maior número de setores a 39,5°C sendo que, a 42°C a produção de setores decrescia. NIFFINEGGER-SOUZA (1979), encontrou maior freqüência de setores quando a linhagem Dp (I-II) cresceu a 40°C, que foi a mais alta temperatura utilizada.

Na instabilidade cromossônica da linhagem duplicada Dp(I-II), está implícito mecanismo de reparo pois certas mutações que deter-

minam sensibilidade à luz ultra-violeta aumentam o número de setores de linhagens duplicadas (BURR e col., 1971; BURR, 1973, apud MAJERFELD e ROPER, 1978) e o padrão de instabilidade é alterado também na presença de cafeína (ROPER e col., 1972).

O efeito da temperatura sobre a instabilidade pode ser devi-  
do a presença de enzimas de reparo atuando em diferentes sítios, de acor-  
do com a temperatura. Poder-se-ia também explicar, pela ocorrência de vele-  
cidades diferentes de cópias para os segmentos envolvidos na duplicação tal  
que, em altas temperaturas o segmento original seria copiado mais rápido  
produzindo assim mais setores amarelos (NIFFINEGGER e SOUZA, 1979).

Mais simples entretanto, seria relacionar o aumento da ins-  
tabilidade da linhagem duplicada Dp(I-II), com temperatura e atuação das  
enzimas de reparo. Em temperaturas mais baixas, menor instabilidade tradu-  
ziria maior eficiência das enzimas de reparo que devem ter sido seleciona-  
das para atuarem em temperaturas próximas a 28°C na linhagem selvagem da  
qual derivou a linhagem mutante.

A análise das deficiências nutricionais (Tabela 5) e o cres-  
cimento das colônias dos variantes melhorados amarelos (Tabela 8) eviden-  
ciam a perda do segmento translocado. As médias dos diâmetros das colônias,  
com cinco dias de crescimento, foram semelhantes à da linhagem haplóide  
*pro paba y* e diferiram significativamente dos diâmetros das colônias da li-  
nhagem A (Tabela 11). Com dois dias de incubação, não se detectaram na  
maioria dos casos diferenças significativas entre variantes melhorados e a  
linhagem A (Tabela 10). Algumas comparações significativas entre as médias  
dos diâmetros dos variantes melhorados foram observadas e nesses casos, cor-  
relacionou-se à perda da duplicação e/ou ao desenvolvimento das microcolô-

nias quando inoculadas.

Linhagens duplicadas de *A. nidulans* têm crescimento mais lento em meio sólido (BAINBRIDGE e ROPER, 1966; NGA e ROPER, 1966) e NIFFINEGGER-SOUZA (1979) encontrou alguns variantes deteriorados apresentando o valor médio do diâmetro das colônias maior do que a linhagem duplicada e atribuiu o fato, a uma restauração do equilíbrio na regulação e dosagens genéticas que haviam sido modificadas pela duplicação.

Em trabalhos anteriores (NGA e ROPER, 1968, LIEBER, 1976) como também no presente trabalho, não foram encontrados setores amarelos que requeriam adenina e/ou biotina, não detectando portanto permuta mitótica entre os segmentos duplicados (Tabela 5).

A linhagem A também produz setores heterocarióticos em uma freqüência baixa (Tabela 2). Estes setores apresentam conidióforos verdes e amarelos e uma alta proporção, com conídios das duas cores. As análises de setores heterocarióticos (ROPER e NGA, 1969; NIFFINEGGER-SOUZA, 1979) mostraram que a região eliminada é maior do que a região duplicada e os conídios podem ser hipohaplóides. Mediante este fato não se pode deduzir que a elisão da translocação seja sempre precisa, mas quando envolve uma região maior do que a da duplicação deve levar a letalidade dos conídios.

#### 5.1.1. Análise genética dos variantes amarelos

Entre os quinze setores amarelos ensaiados, treze foram aparentemente estáveis e dois mostraram-se instáveis produzindo segregantes (Tabela 7). Os variantes estáveis parecem ter perdido todo o segmento cro-

mossômico em duplicata. Isto é confirmado não só pela estabilidade dos variantes como também por seu crescimento que é semelhante ao das linhagens haplóides controle e é diferente estatisticamente do crescimento da linhagem duplicada A (Tabelas 6, 10 e 11) e também pelas análises meióticas e mitóticas realizadas (Tabelas 15 a 23).

Em algumas das análises genéticas (Tabelas 17 e 23) observou-se um número excessivo de setores que não requeriam riboflavina ( $ribo^+$ ) em comparação com setores que necessitavam desta vitamina ( $ribo^-$ ). Isso pode ser atribuído à seleção contra os mutantes  $ribo^-$  que ocorre em meios de cultura com quantidades menores do que as normais de riboflavina devido a exposição da solução de vitaminas ou do meio de cultura, à luz visível. Em alguns cruzamentos observou-se também segregantes que requeriam biotina (M37.2, M37.3, M37.5, M42.1, M42.2, M42.3 e M42.5). Uma vez que houve perda do segmento duplicado o alelo que confere deficiência à biotina deveria ter sido perdido. O fato pode ser explicado por uma interação entre marcadores genéticos dos raros segregantes que apresentam esta deficiência pois AZEVEDO (1970), mostrou que linhagem independentes de biotina requerem esta vitamina na presença de certos marcadores genéticos para auxotrofia. Outra explicação seria de que a perda cromossômica não eliminou a região do alelo  $bi^-$  que então estaria presente na forma recessiva.

O variante M28.3 foi instável produzindo um setor amarelo (Tabela 7). Embora seu crescimento não seja diferente das linhagens haplóides, possivelmente mantém uma pequena duplicação que foi perdida posteriormente, originando então o derivativo de segunda ordem.

As análises genéticas dos cruzamentos entre os variantes melhorados amarelos e a linhagem MSE (Tabelas 15 a 23) não indicaram a ocor-

rência de aberrações cromossômicas exceto o variante M37.7 (item 4.1.3). Esse variante assemelha-se a um aneuplóide, provavelmente um dissômico para o cromossomo VI (PIZZIRANI, comunicação pessoal). Setores dissônicos têm morfologia característica de acordo com o cromossomo duplicado e são instáveis não sendo em geral, transmitido por meiose (BALL, 1964; POLLARD e cols., 1968; UPSHALL, 1971; KÄFER e UPSHALL, 1973). O variante M37.7 é muito instável e na segregação meiótica, não ocorreram segregantes amarelos claros como o setor parental, mas apenas colônias brancas e amarelas na proporção de 1:1 (Tabela 19). A ocorrência de dissônicos em linhagens de *A. nidulans* com aberrações estruturais é conhecida, sendo que a freqüência de aneuplóides mitóticos é menor que a de meióticos (POLLARD e col., 1968) e a linhagem duplicada Dp(I-II) produz mais aneuplóides mitóticos que as linhagens haplóides controle (PIZZIRANI, 1977).

### 5.1.2. Análise genética dos variantes melhorados verdes

Diversas modificações cromossômicas estão implicadas com a origem dos setores verdes e nos experimentos distinguem-se dois grupos de segregantes verdes, um comportando como se tivesse perdido a duplicação cromossônica, enquanto o outro reflete a conservação de grande parte do material duplicado (Tabelas 6, 9 e 11) e para efeito didático, esses variantes podem ser divididos em dois tipos ou grupos.

Tipo 1- São variantes com elisão no grupo de ligação I o que é evidenciado pelas deficiências em adenina e biotina. Cinco dos setores analizados caíram nesse grupo o qual podem ainda ser dividido em sub-grupos sendo que um de segregantes instáveis (M42.6 e M42.9) e o outro com variantes es-

táveis (M42.7, M42.8<sub>1</sub> e M42.11).

O genótipo provável desses variantes é Idl ( $y^-$ ,  $ad^+$ ,  $bi^+$ ) / I-II  $y^+$ ,  $ad^-$ ,  $bi^-$  (Tabela 22). Esse tipo de setor não foi observado à 28°C, embora tenha ocorrido com freqüência baixa à 37 e 42°C (Tabela 6).

Não se pode determinar se a elisão é intersticial ou terminal por falta de marcadores terminais na linhagem usada, mas sabe-se que o correm quebras intersticiais em linhagens duplicadas (BIRKETT e ROPER, 1977).

Os cruzamentos M42.7 X MSE e M42.8<sub>1</sub> X MSE (Tabela 22) não produziram segregantes verdes, entretanto as classes amarelas e brancas ocorreram na proporção de 1:1. Entre os cleistotécios dos cruzamentos M42.6 X MSE e M42.11 X MSE, alguns produziram apenas segregantes amarelos e brancos na proporção de 1:1 nos loci *pro* e *paba* (Tabela 22). Um desvio acen-tuado na segregação foi observado na progénie do cruzamento M42.11 X MSE que produziu segregantes verdes (Tabela 22). Há uma seleção contra o alelo  $y^+$  pois segregantes brancos ocorrem em freqüência baixa e entre esses, foi menor o número de colônias que requeriam prolina e ácido *p*-aminobenzoíco (Tabela 31). Assim além da elisão cromossómica, processaram-se outras modificações na porção translocada que alteraram o comportamento meiótico e/ou mitótico dos grupos de ligação I e II.

O fato da classe de segregantes verdes, não ter sido sempre recuperada na prole dos cruzamentos entre variantes com deleções Idl ( $y^-$ ,  $ad^+$ ,  $bi^+$ ), que são importantes para a manutenção da parte translocada.

O variante M42.6 mostrou perda de parte do grupo de ligação I porque pela análise mitótica todos os setores brancos independem de prolina ( $w^-$ ,  $pro^+$ ) e os amarelos requerem prolina ( $y^+$ ,  $pro^-$ ). Na análise meiótica evidenciou-se algumas colônias segregantes amarelas que requerem

prolina e ácido *p*-aminobenzóico e verdes independentes dos dois suplementos. Isso indica ligação entre o ponto de quebra e esses genes no grupo de ligação I (cerca de 7% de ligação). A proporção de  $2bi^+ : 1bi^-$  está também de acordo com o esperado no caso de depleção no grupo de ligação I eliminando o locus *bi<sup>+</sup>*. O outro variante instável, M42.9 também mostrou depleção do grupo de ligação I pela análise meiótica (cerca de 30% de ligação entre os loci *pro-paba* e o ponto de quebra). O variante M42.7 também tem elisão no grupo de ligação I pois todos segregantes brancos independem de prolina e os amarelados requerem biotina, mas a análise meiótica apresentou anomalias que não permitiram mapear o ponto de quebra. Finalmente, M42.11 também mostrou uma quebra no cromossomo I (letal) e a análise meiótica revelou estar ele a 23 unidades da região *pro paba*.

Nos resultados dos cruzamentos entre variantes verdes de genótipo Id1 (*y<sup>-</sup>, ad<sup>+</sup>, bi<sup>+</sup>*)/I-II *y<sup>+</sup> ad<sup>-</sup> bi<sup>-</sup>* e a linhagem MSE, resultaram entre os segregantes meióticos brancos, colônias que requeriam prolina e ácido *p*-aminobenzóico. Esse tipo de segregante é explicado pela ocorrência de permuta meiótica envolvendo o locus *wA* do grupo de ligação II.

A produção de setores pelos variantes M42.6 e M42.9 (Tabela 7) evidenciou a existência de rearranjos secundários. Como esses setores não se distinguiram da colônia parental pelo crescimento, é provável que tenham sua origem na transposição de material cromossômico. Em *A. nidulans*, há translocação dos chamados fatores de deterioração entre e/ou dentro dos grupos de ligação (AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1975; NIFFINEGGER-SOUZA, 1979) e a origem desses fatores está associada com a região duplicada em linhagens Dp(I-II).

Os segregantes verdes dos diplóides M42.6//MSE e M42.7//MSE

requereram prolina, ácido *p*-aminobenzoíco e biotina, entretanto independentemente de adenina (Tabela 24). Houve portanto uma separação dos fenótipos, necessidade de adenina, necessidade de biotina. Considerando uma permuta mitótica na região entre o centrômero e o locus *suA1 adE20* (Figuras 1 e 2) e como o diplóide foi obtido em MM (*ROPER e PRITCHARD, 1955*), houve uma seleção a favor de núcleos que continham o gene supressor, isto é, do tipo A e D. Segregantes que requerem prolina, ácido *p*-aminobenzoíde e biotina, mas são independentes de adenina (D<sub>4</sub>), podem ser originados de núcleos semelhantes ao recombinante D. Embora a ação do supressor *suA1 adE20* se expresse apenas quando na posição *cis* em relação ao mutante *adE20* (*PRITCHARD, 1955*), poder-se-ia supor que a ausência no cromossomo I, da região *yA2 adE20 biA1* possibilitaria a ação do supressor na posição *trans*.

A ausência de diplóides verdes M42.9//MSE (item 5.1.4.b) sugere que modificações cromossômicas envolvendo os grupos de ligação I e II no variante M42.9 não são sempre mantidas em estado diplóide. O aparecimento de colônias amarelas M42.10//MSE e M42.11//MSE, além dos diplóides verdes que são formados, exprime também um certo grau de incompatibilidade dos novos rearranjos cromossômicos com o estado diplóide. A formação de mais de um tipo de diplóide em *A. nidulans* foi descrita por *AZEVEDO (1971)* ao analisar setores deteriorados.

Tipo 2- Os variantes M42.8 e M42.10 aparentemente não têm elisão no grupo de ligação I. Ambos são instáveis e semelhantes à linhagem A. O setor M42.8<sub>1</sub> originado de M42.8 foi analisado e se comportou como o M42.7 do tipo 1, indicando que deve ter perdido parte do grupo de ligação I e apresentou também anomalias meióticas semelhantes às observadas no variante M42.7.

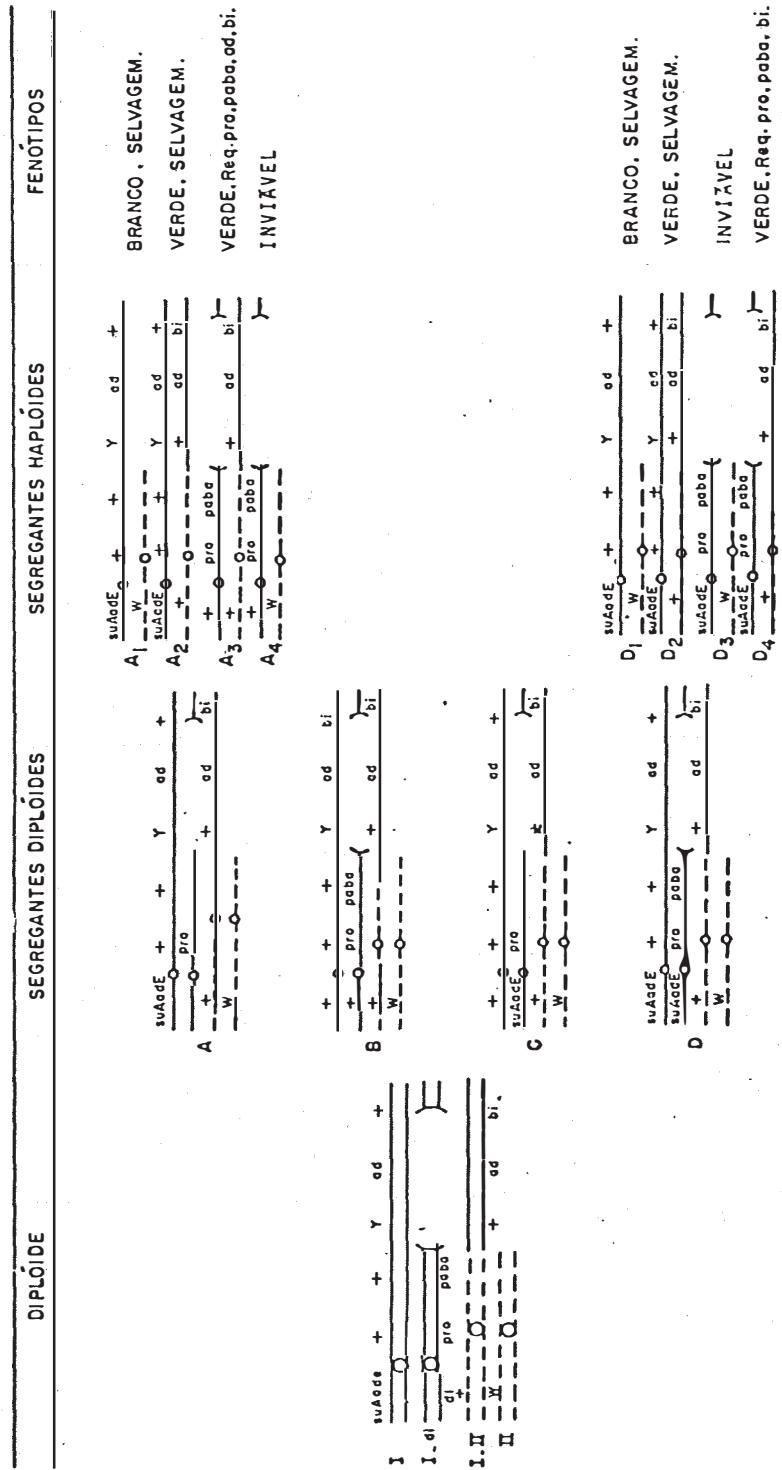


Figura 2 - Tipos de segregantes diplóides e haplóides, originados de uma permuta mitótica no cromossomo I, na região entre o centrômero e o loco *sua1 ade20*, em núcleos resultantes em meio mínimo de heterocários formados entre os variante M42.6 e MSE e, M42.7 e MSE de *A. nidulans*.

Na segregação meiótica dos cruzamentos M42.8 X MSE e M42.10 X MSE, os fenótipos branco, verde e amarelo ocorreram em proporção diferente da esperada (Tabela 22). O fato da classe verde ser a menos freqüente, pode ser um indício que alterações na região translocada modificaram a incidência de colônias verdes. Poder-se-ia também supor uma elisão no segmento translocado que removeria a região do alelo *biAl*<sup>-</sup>, o que não foi revelado pela análise mitótica. Além do ponto de quebra TB1(I-II) (ROPER e NGA, 1969; NGA e ROPER, 1968, 1969; COOK e col., 1970; AZEVEDO e ROPER, 1970), há uma região que propicia quebra cromossômica entre os loci *adE20* e *biAl* pois elisão removendo o alelo *biAl* em linhagens Dp(I-II) foi detectada na análise de setores deteriorados (NGA e ROPER, 1968; AZEVEDO, 1971), verdes melhorados (LIEBER, 1976) e diplóides homozigotos para a translocação Dp(I-II) (CASE e ROPER, 1981).

A medida do crescimento dos diâmetros da colônia nem sempre corresponde à análise genética. Os variantes verdes M42.8, M42.81 e M42.9 têm a média dos diâmetros das colônias de tamanho aproximado ao da linhagem A, enquanto os demais variantes verdes têm crescimento maior que o da linhagem duplicada (Tabela 11). Na análise genética é evidente que M42.8 e M42.10 conservaram parte da duplicação, mas isto não foi demonstrado na análise de M42.81 e M42.9. Como linhagens duplicadas têm crescimento mais lento (BAINBRIDGE e ROPER, 1966) e considerando os resultados da Tabela 11 poder-se-ia supor que a característica seria dada por um efeito de posição ou então dependeria da região duplicada que fosse removida e, não do tamanho da elisão. Por outro lado, variação por efeito de posição foi também correlacionada com alteração de instabilidade em *A. nidulans* (CLUTTERBUCK, 1970).

A análise genética dos variantes melhorados verdes revela de

qualquer modo, alta complexidade do processo que deve gerar esses setores e indica também que provavelmente o mecanismo de formação de setores amarelos (depleção do segmento translocado) é diferente da formação dos setores verdes originados de depleção no grupo de ligação I.

### 5.2. Instabilidade de diplóide heterozigoto Dp(I-II)

A elevação da temperatura determinou um aumento no número de setores no diplóide heterozigoto Dp(I-II) e a instabilidade expressou-se por alta freqüência de setores melhorados amarelos prototróficos (Tabela 32).

Como foi dito no item 4.2.1 não foi possível estimar o número de setores produzidos a 42°C, uma vez que se originaram muito próximos uns dos outros e confluíram, o que deve ter sido causado pelo aparecimento simultâneo.

*LIEBER (1976)* constatou que a fase de desenvolvimento da colônia na qual surge maior número de setores em linhagens haplóides duplicadas, depende da temperatura de incubação e do genótipo da linhagem e, vários trabalhos têm relacionado em eucariotos, instabilidade cromossômica e período de desenvolvimento (*SAND, 1957; BAKER, 1968; HOZUMI e TONEGAWA, 1976*).

Uma comparação entre os setores produzidos pelas linhagens diplóides A//MSE e *bi*//MSE revelou que o número de setores brancos haplóides de A//MSE é bem maior que o da linhagem diplóide *bi*//MSE. Isso pode ser devido à duplicação cromossônica presente na linhagem A. Se esse fato se repetir em outros diplóides seria altamente vantajoso no isolamento de setores segregantes haplóides sem necessidade de agentes haploidizantes.

A comparação entre os valores médios dos diâmetros do conídios dos setores da A//MSE e linhagens controles, mostra que setores amarelos são diplopoides (Tabelas 35 e 37). Setores haplopoides brancos e amarelos são diferentes entre si pelo tamanho dos diâmetros nos conídios (Tabela 37).

Nos experimentos de medição de núcleos e de conídios (Tabela 36), o coeficiente de variação apresentou-se muito alto para trabalhos feitos em laboratório. NIFFINEGGER-SOUZA (1979) em ensaios de medição de núcleos, empregando a metodologia usada neste trabalho obteve também coeficientes de variação relativamente altos, o que pode indicar pouco refinamento do método.

Os diâmetros dos núcleos dos setores e das linhagens controles não diferiram significativamente embora haja trabalhos (PAES DE BARROS, 1977; NIFFINEGGER-SOUZA, 1979) mostrando que núcleos portadores de duplicações cromossômicas apresentam volume maior que linhagens haplopoides normais. Essas diferenças de resultados podem ser atribuídas à limitação do método, como já foi discutido anteriormente.

Segregantes somáticos em *A. nidulans* podem ser haplopoides ou diplopoides. Esses últimos, originados por permuta mitótica ou não disjunção cromossônica sendo que permuta mitótica é o processo de recombinação mais freqüente (KAFFER, 1961). Permuta mitótica e alta instabilidade cromossômica em linhagens duplicadas de *A. nidulans* foram propostas por NGA e ROPER, 1968. CASE e ROPER (1975, 1981), estudando linhagens homo e heterozigotas Dp(I-II) atribuíram a instabilidade extra em diplopoides não平衡ados à permuta mitótica ao longo do cromossomo II e em diplopoides homozigotos Dp(I-II), explicaram a instabilidade dos segmentos quadruplicados co

mo consequênciā de elisão parcial ou total da parte duplicada.

As análises dos segregantes dos setores diplóides amarelos originados em diferentes temperaturas (Tabelas 35, 36 e 37) não evidenciaram a segregação dos marcadores genéticos na região duplicada. Permuta mitótica nesta região tem sido pouco documentada. Entretanto na meiose de homozigotos Dp(I-II) parece aumentar a freqüência de permuta na região da duplicação talvez em decorrência da configuração quadrivalente que tomam os pares de cromossomos I e II (*VAN de VATE e JANSEN, 1978*).

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que:

- a) A freqüência de elisão do segmento translocado em linhagem Dp(I-II) de *A. nidulans* é significativamente maior em temperaturas mais altas de crescimento. Entretanto, a eliminação do segmento duplicado normal não é influenciada pela temperatura de incubação.
- b) A maioria dos variantes melhorados amarelos perderam a porção duplicada e se comportam semelhantemente à linhagem parental *pro paba y*.
- c) Ocorrem dois tipos de variantes melhorados verdes sendo que um tipo conserva parte do material duplicado enquanto o outro é originado de elisões não precisas, na porção duplicada normal. Ambos tipos de variantes apresentam alterações nas proporções esperadas tanto na análise genética mitótica como meiótica.
- d) O diplóide heterozigoto Dp(I-II) apresenta maior instabilidade em temperaturas mais altas. Entre os variantes melhorados os diplóides são mais

freqüentes enquanto que, entre os segregantes brancos os haplóides ocorrem em maior número. O diplóide heterozigoto Dp(I-II) origina um maior número de setores haplóides do que um diplóide normal.

- e) Análise genética dos variantes melhorados diplóides não evidenciou conservação de material cromossômico duplicado.

## 7. LITERATURA CITADA

- ALMEIDA, L.M., 1976. Obtenção de linhagens com duplicações cromossômicas em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter e sua instabilidade. Piracicaba, ESALQ/USP, 122 p. (Dissertação de Mestrado).
- APRION, D., 1962. A general system for automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice-versa in micro-organisms. *Nature*, London, 195: 959-961.
- AZEVEDO, J.L., 1966. Recessivos letais induzidos por ultra violeta em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba. ESALQ/USP, 121 p. (Tese de Livre-Docência).
- AZEVEDO, J.L., 1970. A pleiotrophic effect of lysine mutants of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 11: 1.
- AZEVEDO, J.L., 1971. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. England, University of Sheffield. 240 p. (Ph.D. Thesis).
- AZEVEDO, J.L., 1975. Altered instability due to genetic changes in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, Cambridge, 26: 55-61.
- AZEVEDO, J.L. e J.A. ROPER, 1970. Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: successive and transposable genetic changes. *Genetical Research*, Cambridge, 16: 79-93.

AZEVEDO, J.L. e E.P.SANTANA, 1975. The use of chloroneb to obtain haploid segregants from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 13: 6.

AZEVEDO, J.L., A. OLIVEIRA e A.J. ROCHA CAMPOS, 1976. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. *Summa Phytopathologica*, 2: 237-241.

AZEVEDO, J.L., E.P. SANTANA e R. BONATELLI JR., 1977. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 48: 163-172.

BAINBRIDGE, B.W. e J.A.ROPER, 1966. Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 42: 417-424.

BALL, C., 1964. Some actions of the acridines on *Aspergillus nidulans*. England, University of Sheffield. 122 p. (Ph.D. Thesis).

BALL, C., 1967. Chromosome instability related to gene suppression in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, Cambridge, 10: 173-183.

BAKER, W.K., 1968. Position-effect variegation. *Advances in Genetics*, 14: 133- 169.

BARACHO, I.R., R.VENCOVSKY e J.L.AZEVEDO, 1970. Correlations between size and hybrid or selfed state of cleistothecia in *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, 54: 109-116.

BEERMAN, S., 1966. A quantitative study of chromatin diminution in embryonic mitosis of *Cyclops fucifer*. *Genetics*, 54: 567.

BIRKETT, J.A. e J.A. ROPER, 1977. Chromosome aberrations in *Aspergillus nidulans*. In: Smith, J.E. e J.A. Pateman (ed.). *Genetics and Physiology of Aspergillus*. London. Academic Press, p. 292-303.

BONATELLI JR., R. e J.L. AZEVEDO, 1977. Effects of ethidium bromide in diploid and duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Experientia*, 33: 311-312.

BURNS, J.A. e D.U. GERSTEL, 1967. Flower colour variegation and instability of a block of heterochromatin in *Nicotiana*. *Genetics*, 57: 155.

BURR, K.W., 1973. The effects of modified DNA repair on chromosomal instability in *Aspergillus nidulans*. England. University of Sheffield, (Ph.D.Thesis).

BURR, K.W., H.M. PALMER e J.A. ROPER, 1971. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the effect of reduced DNA repair. *Heredity*, 27: 487.

CASE, B.L. e J.A. ROPER, 1975. Genetic imbalance and mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 13: 8-11.

CASE, B.L. e J.A. ROPER, 1981. Mitotic processes which restore genome balance in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 124: 9-16.

CLUTTERBUCK, A.J., 1970. A variegated position effect in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, Cambridge; 16: 303-316.

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

COOKE, P., J.A. ROPER e W. WATMOUGH, 1970. Trypan blue induced deletions in duplications strains of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London, 226: 276-277.

ELLIOT, C.G., 1960. The cytology of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research* Cambridge, 1: 462-476.

ESPOSITO, M.S., 1978. Evidence that spontaneous mitotic recombination occurs at the two-strand stage. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 75: 4436-4440.

FELDEN, R.A., M.M. SANDERS e N.R. MORRIS, 1976. The presence of histones in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Biology*, 68: 430-439.

FINCHAM, J.R.S., P.R. DAY e A. RADFORD, 1979. Changes in chromosome number and structure. In: *Fungal Genetics*, 4<sup>a</sup> ed. OXFORD, Blackwell Scientific Publications, p. 138-161.

FLANKIN, N. 1971. Illegitimate recombination. In: Hershey, A.D.(ed.). *The bacteriophage Lambda*. Cold Spring Harbor, p. 175-194.

FORTUIN, J.J.H., 1971 a. Another two genes controlling intragenic recombination and recovery from uv damage in *Aspergillus nidulans*. I. uv sensitivity complementation and location of six mutants. *Mutation Research*, 11: 149-169.

FORTUIN, J.J.H., 1971 b. Another two genes controlling intragenic recombination and recovery from uv damage in *Aspergillus nidulans*. II. Recombination behavior and X-ray sensitivity of uvs D and uvs E mutants. *Mutation Research*, 11: 265-277.

HASTIE, A.C., 1970. Benlate induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, London, 226: 771.

HEAGY, F.C. e J.A. ROPER, 1952. Deoxyribonucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus* conidia. *Nature*, London, 170: 713-714.

HOUGHTON, J.A. e J.O'DOWD, 1979. The effect of ultrasound on genetic instability in diploids of *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiologica*, 24: 385-388.

HOZUMI, N. e S. TONEGAWA, 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 73: 3628-3632.

HUDSPETH, M.E.S., W.E. TIMBERLAKE e R.B. GOLDBERG, 1977. DNA sequence organization in the water mold *Achlya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74: 4332-4336.

JANSEN, G.J.O., 1970a. Survival of uvs B and uvs C mutants of *Aspergillus nidulans* after uv-irradiation. *Mutation Research*, 10: 21-32.

JANSEN, G.J.O., 1970b. Abnormal frequencies of spontaneous mitotic recombination in uvs B and uvs C mutants of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 10: 33-41.

KÄFER, E., 1960. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London, 186: 619-620.

KÄFER, E., 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46: 1581-1609.

KÄFER, E., 1962. Translocations in stock strains of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 33: 59-68.

KÄFER-BOOTHROID, E., 1964. Evidence for a paracentric inversion from mitotic crossing over in *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus New Letter*, 5:11.

KÄFER, E., 1964. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46: 1581-1609.

KÄFER, E., 1965. The origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 52: 217-232.

KÄFER, E., 1966. Multiple mitotic crossing over in the centromere regions or diffuse centromeres? *Aspergillus News Letter*, 7: 14-15.

KÄFER, E., 1975a. Reciprocal translocations and translocation disomies of *Aspergillus* and their use for mapping. *Genetics*, 79: 7-30.

KÄFER, E., 1976. Mitotic crossing over and nondisjunction in translocation heterozygotes of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 64: 35-38.

KÄFER, E. e A. UPSHALL, 1973. The phenotypes of the eight disomics and trisomics of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Heredity*, 64: 35-38.

KAPPAS, A., 1978. On the mechanisms of induced somatic recombination by certain fungicides in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 51: 189-198.

KAPPAS, A. e S.G. GEORGOPoulos, 1974. Interference of griseofulvin with the segregation of chromosome at mitosis in diploid *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 119: 334-335.

KAPPAS, A., S.G. GEORGOPoulos e A.C. HASTIE, 1973. Genetic instability of *Aspergillus nidulans* diploids induced by benzimidazole and thiophanate fungicides. *Mutation Research*, 21: 190-191.

KAPPAS, A., S.G. GEORGOPoulos e A.C. HASTIE, 1974. On the genetic activity of benzimidazole and thiophanate fungicides on diploid *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 26: 17-27.

KRUMLAUF, R. e G.A. MARZLUF, 1979. Characterization of the sequence complexity and organization of the *Neurospora crassa* genome. *Biochemistry*, 18: 3705-3713.

LIEBER, M.M., 1976. The effects of temperature on genetic instability in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 34: 93-122.

LU, B.C., 1964. Polyploidy in the Basidiomycete *Cyathus stercoreus*. *American Journal Botany*, 51: 343-347.

MA, G.C.L. e E. KAFER, 1974. Genetic analysis of the reciprocal translocation T<sub>2</sub> (I,VIII) of *Aspergillus nidulans* using the technique of mitotic mapping in homozygous translocation diploids. *Genetics*, 77: 11-23.

MAJERFELD, I.H. e J.A. ROPER, 1978a. Dose effects of the uvr A gene product in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 49: 19-26.

MAJERFELD, I.H. e J.A. ROPER, 1978b. The effects of coumarin on the frequency of deletions in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 159: 203-206.

McCULLY, K.S. e E. FORBES, 1965. The use of p-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research*, 6: 352-359.

MENEZES, E.M., 1974. Análise genética de variantes deteriorados e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP, 114 p (Dissertação de Mestrado).

MORRIS, N.R., R.A. FELDEN, M.A. GEALT, R.Y. NARDI, G. SHEIR-NEISS e M.M.

SANDERS, 1977. The *Aspergillus* nucleus: histones, chromatin and tubulin.

In: Smith, J.E. e J.A. Pateman (ed.). *Genetics and Physiology of Aspergillus*. London, Academic Press, p. 267-279.

MYLYK, O.M., 1975. Heterokarion incompatibility genes in *Neurospora crassa* detected using duplication-producing chromosome rearrangements. *Genetics*, 80: 107-124.

NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1968. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 58: 198-209.

NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1969. A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, Cambridge, 14: 63-70.

NEWMEYER, D. e C.W. TAYLOR, 1967. A pericentric inversion in *Neurospora* with a unstable duplication progeny. *Genetics*, 56: 771-791.

NEWMEYER, D. e D.R. GALEAZZI, 1977. The instability of *Neurospora* duplication Dp(IL → IR) H4250 and its genetic control. *Genetics*, 85: 461-487.

NIFFINEGGER-SOUZA, D.R., 1979. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP. 244p.  
(Dissertação de Mestrado).

PAES DE BARROS, J., 1977. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP. 81 p.  
(Dissertação de Mestrado).

PARAG, Y. e PARAG, G., 1975. Mutations affecting mitotic recombination frequency in haploids and diploids of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 140: 275-287.

PARAG, Y. e J.A. ROPER, 1975. Genetic control of chromosome instability in *Aspergillus nidulans* as a mean for gene amplification in eukariotic microorganisms. *Molecular General Genetics*, 140: 275-287.

PARDUE, M.L., D.D. BROWN e M.L. BIRNSTIEL, 1973. Localization of the genes for 5S ribosomal RNA in *Xenopus laevis*. *Chromosoma*, Berlin, 42:191-203.

PERKINS, D.D., 1974. The manifestation of chromosome rearrangements in unordered asci of *Neurospora*. *Genetics*, 77: 459-489.

PERKINS, D.E. e E.G. BARRY, 1977. The cytogenetics of *Neurospora*. *Advances in Genetics*, 19: 133-285.

PIZZIRANI, A.A., 1977. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP, 111 p. (Dissertação de Mestrado).

POLLARD, R., E. KAFTER e M.T. JOHNSTON, 1968. Influence of chromosomal aberrations on meiotic and mitotic nondisjunction in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 60: 743-757.

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

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

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

PRITCHARD, D.H., 1955. The linear arrangement of a series of alleles of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 9: 343-371.

PRITCHARD, R.H., 1956. A genetic investigation of some adenine-requiring mutants of *Aspergillus nidulans*. Glasgow. The University. (Ph.D.Thesis).

ROBINOW, C.F. e C.E. CATEN, 1969. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science*, 5: 403-431.

RODGERS, J.D., 1968. *Xylaria curta*: the cytology of the ascus. *Canadian Journal of Botany*. 46: 1337-1340.

ROMAN, H., M.M. PHILLIPS e S.M. SANDS, 1955. Studies of polyploid *Saccharomyces*. I. Tetraploid segregation. *Genetics*, 40: 546-561.

ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8: 14-15.

ROPER, J.A., 1966. The parasexual cycle. In: Ainsworth, G.C. e Sussman, A.S., (ed.). *The fungi*, II. New York, Academic Press, p. 589-617.

ROPER, J.A. e B.H. NGA, 1969. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the production of hypodiploid and hypohaploid nuclei. *Genetical Research*, Cambridge, 14: 127-136.

ROPER, J.A., H.M. PALMER e W.A. WATMOUGH, 1972. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the effects of caffeine. *Molecular General Genetics*, 118: 125-133.

ROPER, J.A. e R.H. PRITCHARD, 1955. The recovery of the complementary products of mitotic crossing over. *Nature, London*, 175: 639.

ROSATO, Y.B., 1973. Efeitos do etil-metano-sulfonado e acriflavina na instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 74 p. (Dissertação de Mestrado).

SAND, S.A., 1957. Phenotypic variability and the influence of temperature on somatic instability in cultures derived from hybrids between *Nicotiana Langsdorffii* and *N. sanderae*. *Genetics*, 42: 685.

SHANFIELD, B. e E. KÄFER, 1971. Chemical induction of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 67: 209-219.

STACK, S.M. e C.R. CLARK, 1973. Differential giemsa staining of the telomeres of *Allium cepa* chromosomes: observations related to chromosome pairing. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 15: 619-624.

STEEL, R.G.D. e J.H. TORRIE, 1960. Principles and procedures of statistic. New York, McGraw-Hill Book Company, Inc., 481 p.

STERN, C., 1936. Somatic crossing over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 21: 621-730.

SYBENGA, J., 1972. Chromosome structural variants. In: *General Cytogenetics*. New York. North-Holland Publishing Company, p. 165-186.

TIMBERLAKE, W.E., 1978. Low repetitive DNA contents in *Aspergillus nidulans*. *Science*, 202: 773-775.

TURNER, B.C., 1977. Euploid derivatives of duplications from a translocation in *Neurospora*. *Genetics*, 85: 439-460.

UPSHALL, A., 1971. Phenotypic specificity of aneuploid state in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, Cambridge, 18: 167-171.

UPSHALL, A., 1981. Naturally occurring diploid isolates of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 122: 7-10.

UPSHALL, A. e E. KAFER, 1974. Detection and identification of translocations by increased specific non-disjunction in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 76: 19-31.

VAN ARKEL, G.A., 1963. Sodium arsenite as an inducer of somatic reduction. *Aspergillus News Letter*, 4: 9.

VAN DE VATE, C. e G.J.O. JANSEN, 1978. Meiotic recombination in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, Cambridge, 31: 29-52.

ZUCCHI, T.M.A.D. e J.L.AZEVEDO, 1979. Mitotic instability in a III-VIII  
duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Revista Brasileira de Genética*, 2: 93-108.