MUTANTES PARA CONIDIAÇÃO EM
Aspergillus nidulans (Eidam) Winter

MARIA BERNARDETE DELÉO

Orientadora : Prof.^a Dr.^a ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração : Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1984

À memória da minha mãe

MARIA ANTONIA SÊGA DELÉO

AGRADECIMENTOS

- Professora Dra. Aline Aparecida Pizzirani Kleiner, pela orientação e amizade.

- Professor Dr. Ernesto Paterniani e Professor Dr. João Lúcio de Azevedo, chefes do Departamento de Genética, pelas facilidades concedidas.

- Professora Dra. Elke J.B. Nogueira Cardoso, pela coordenação do Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola.

- Professor Dr. Flávio César A. Tavares, pelo apoio no decorrer do curso.

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

- Professores dos Departamentos de Genética e Fitopatologia, pelos conhecimentos adquiridos.

- Funcionários do Departamento de Genética, especialmente Alaor de Oliveira, Ana Maria Brancalion, Antônio Rocha Campos, Luiz Próspero, Paulo Ortolan Filho, pela colaboração na execução deste trabalho.

- Juan Fernando Aguilar Morán, pela análise estatística dos resultados e pelo companheirismo.

- Meus familiares, pelo incentivo constante em minha vida.

Í N D I C E

	Página
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Desenvolvimento e diferenciação em fungos ...	2
2.2. <i>Aspergillus nidulans</i>	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Linhagens	19
3.2. Meios de cultura e soluções	22
3.2.1. Meio mínimo	22
3.2.2. Meio completo	22
3.2.3. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo ..	23
3.2.4. Meio de acetato de amônio	23
3.2.5. Meio mínimo de galactose	23
3.2.6. Solução de vitaminas	24
3.2.7. Solução de ácidos nucleicos de leveduras ..	24
3.2.8. Suplementos adicionados ao meio mínimo	24
3.2.9. Solução salina	26
3.2.10. Solução de "tween"	26
3.2.11. Solução de cloroneb	26
3.2.12. Solução de safranina	26
3.2.13. Solução de albumina	26
3.2.14. Solução Helly	27
3.2.15. Formol neutro	27
3.2.16. Solução de ácido clorídrico	27
3.2.17. Solução fosfato	27
3.2.18. Solução de Giemsa	28

3.3. Esterilização e incubação	28
3.4. Obtenção de mutantes	28
3.5. Análise citológica	29
3.6. Análise genética	30
3.7. Taxa de crescimento	33
3.8. Taxa de conidiação	33
3.9. Análise estatística	33
4. RESULTADOS	36
4.1. Sobrevivência à luz ultra-violeta	36
4.2. Descrição dos mutantes obtidos	39
4.3. Taxa de crescimento	43
4.4. Taxa de conidiação	45
4.5. Características citológicas dos mutantes	47
4.5.1. Linhagem <u>MSE bnc</u>	47
4.5.2. Linhagem <u>proA1 pabaA6 yA2</u>	50
4.6. Análise genética dos mutantes	52
4.6.1. Linhagem <u>MSE bnc</u>	52
4.6.2. Linhagem <u>proA1 pabaA6 yA2</u>	61
5. DISCUSSÃO	69
5.1. Ação da luz ultra-violeta e características gerais dos mutantes	69
5.2. Aspectos citológicos dos mutantes	72
5.3. Aspectos genéticos dos mutantes	74
5.4. Relação entre crescimento, morfologia e conidiação ..	76
6. CONCLUSÕES	78
7. LITERATURA CITADA	80

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1.	Linhagens de <i>Aspergillus nidulans</i> utilizadas neste trabalho: seus marcadores genéticos e referências	20
TABELA 2.	Lista dos locos gênicos das linhagens de <i>A. nidulans</i> utilizadas neste trabalho, com seus símbolos, fenótipos e grupos de ligação	21
TABELA 3.	Número de conídios viáveis e respectivas porcentagens de sobrevivência à luz UV para a linhagem <u>MSE bnc</u>	37
TABELA 4.	Número de conídios viáveis e respectivas porcentagens de sobrevivência à luz UV para a linhagem <u>proA1 pabaA6 yA2</u>	37
TABELA 5.	Descrição dos mutantes derivados da linhagem <u>MSE bnc</u>	40
TABELA 6.	Descrição dos mutantes derivados da linhagem <u>proA1 pabaA6 yA2</u>	40
TABELA 7.	Diâmetros (média de quatro colônias) da linhagem <u>MSE bnc</u> e seus mutantes, com 1 a 7 dias de crescimento	43
TABELA 8.	Diâmetros (média de quatro colônias) da linhagem <u>proA1 pabaA6 yA2</u> e seus mutantes, com 1 a 7 dias de crescimento	44

TABELA 9. Análise da variância para diâmetro médio das colônias das linhagens originais e respectivos mutantes, com quatro dias de crescimento	44
TABELA 10. Número de conídios (média de três repetições) da linhagem <u>MSE bnc</u> e seus mutantes ..	45
TABELA 11. Número de conídios (média de três repetições) da linhagem <u>proA1 pabaA6 yA2</u> e seus mutantes	46
TABELA 12. Análise da variância para o número de conídios das linhagens originais e respectivos mutantes	46
TABELA 13. Valores médios (20 medições) dos comprimentos do pedúnculo, vesícula e conjunto de esterigmas; larguras do pedúnculo, vesícula e conjunto de esterigmas; diâmetros dos conídios uninucleados e binucleados e respectivos núcleos da linhagem <u>MSE bnc</u> e seus mutantes	49
TABELA 14. Valores médios (20 medições) dos comprimentos do pedúnculo, vesícula e conjunto de esterigmas; larguras do pedúnculo, vesícula e conjunto de esterigmas; diâmetro dos conídios e núcleos (conídios uninucleados) da linhagem <u>proA1 pabaA6 yA2</u> e seus mutantes	53

TABELA 15. Valores e significâncias dos quadrados médios calculados segundo o delineamento em blocos inteiramente casualizados, para dez características das linhagens <u>MSE bnc</u> e <u>proA1 pabaA6 yA2</u> e seus mutantes	54
TABELA 16. Análise mitótica do mutante MSE 1	55
TABELA 17. Análise mitótica do mutante MSE 2	56
TABELA 18. Análise meiótica do mutante MSE 2	56
TABELA 19. Análise mitótica do mutante MSE 3	57
TABELA 20. Análise meiótica do mutante MSE 3	57
TABELA 21. Análise mitótica do mutante MSE 4	58
TABELA 22. Análise mitótica do mutante MSE 5	59
TABELA 23. Análise meiótica do mutante MSE 5	59
TABELA 24. Segregação meiótica dos cruzamentos envolvendo os mutantes "MSE" x linhagem <u>proA1 pabaA6 yA2</u>	60
TABELA 25. Grupos e valores de ligação dos mutantes provenientes da linhagem <u>MSE bnc</u> .	60
TABELA 26. Análise mitótica do mutante PRO 1	62

TABELA 27. Análise mitótica do mutante PRO 2	63
TABELA 28. Análise mitótica do mutante PRO 3	64
TABELA 29. Análise mitótica do mutante PRO 4	65
TABELA 30. Análise mitótica do mutante PRO 5	66
TABELA 31. Análise mitótica do mutante PRO 6	67
TABELA 32. Análise meiótica do mutante PRO 6	67
TABELA 33. Segregação meiótica dos cruzamentos envolvendo os mutantes "PRO" x linhagem <u>MSE bnc</u>	68
TABELA 34. Grupos de ligação dos mutantes provenientes da linhagem <u>proA1 pabaA6 yA2</u>	68

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1.	Mapa parcial de ligação de <i>A. nidulans</i> com os marcadores genéticos utilizados neste trabalho. Os centrômetros estão representados por 0 e as distâncias no mapa não estão em escala	20
FIGURA 2.	Esquema do aparelho conidial, indicando os locais de medidas	30
FIGURA 3.	Curvas da sobrevivência à luz ultra-violeta das linhagens <u>MSE bnc</u> e <u>proA1 pabaA6 yA2</u>	38
FIGURA 4.	Linhagem <u>MSE bnc</u> original e mutantes (A)	41
FIGURA 5.	Linhagem <u>MSE bnc</u> original e mutantes (B)	41
FIGURA 6.	Linhagem <u>proA1 pabaA6 yA2</u> original e mutantes (C)	42
FIGURA 7.	Linhagem <u>proA1 pabaA6 yA2</u> original e mutantes (D)	42

MUTANTES PARA CONIDIAÇÃO EM *Aspergillus nidulans* (EIDAM) WINTER

Maria Bernardete Delêo

Orientadora: Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

RESUMO

O propósito deste trabalho foi estudar a citologia e genética da conidiação em *Aspergillus nidulans*, utilizando as linhagens MSE bnc e proAl pabaA6 yA2. Os mutantes foram obtidos após irradiação com luz ultra-violeta e o isolamento foi feito através de análise macroscópica e microscópica. Foram analisados cinco mutantes da linhagem MSE bnc e seis mutantes da linhagem proAl pabaA6 yA2. Estes mutantes apresentaram alterações na coloração do micélio e conídios, taxa de crescimento, conidiação e estrutura conidial.

As modificações na estrutura conidial foram observadas nas dimensões dos pedúnculos, vesículas, esterigmas, conídios e núcleos. Alguns mutantes mostraram medidas superiores em relação à linhagem original, nas dimensões de um ou mais componentes da estrutura conidial mas apenas o mutante "PRO 3" apresentou dimensões maiores em todos os componentes analisados.

A análise genética mostrou que os genes responsáveis pelas alterações ocorridas nos mutantes da linhagem MSE bnc estão localizados nos grupos de ligação I (MSE 4), III (MSE 2), V (MSE 1), VII (MSE 3) e VIII (MSE 5) e, nos grupos de ligação I (PRO 1, PRO 4 e PRO 5), IV (PRO 3), V (PRO 6) e VII (PRO 2), para a linhagem proAl pabaA6 yA2.

Em todos os casos, a segregação meiótica mostrou uma proporção de 1 normal: 1 morfológico, indicando que um único gene é responsável pelas alterações observadas nos mutantes das linhagens MSE bnc e proA1 pabaA6 yA2 .

MUTANTS FOR CONIDIATION IN *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter

Maria Bernardete Deléo

Adviser: Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

SUMMARY

The purpose of this work was to study the cytology and genetics of conidiation in *Aspergillus nidulans*, utilizing the MSE bnc and proA1 pabaA6 yA2 strains. The mutants were obtained after irradiation with ultra-violet light and the isolation was made through macroscopic and microscopic analysis. Five mutants of the MSE bnc strain and six mutants of the proA1 pabaA6 yA2 strain were analysed. These mutants presented alterations in mycelium pigmentation and conidia, growth rate, conidiation and conidial structure

The modifications in the conidial apparatus were observed in the dimensions of the stalks, vesicles, sterigmata, conidia and nuclei. Some mutants showed greater dimensions when compared to the respective original strain, in the dimensions of one or more component parts of the conidial apparatus but only the mutant "PRO 3" presented greater dimensions in all component parts analysed.

The genetic analysis showed that the responsible genes for the alterations occurred in the mutants of the MSE bnc strain were localized in the linkage groups I (MSE 4) , III (MSE 2) , V (MSE 1) , VII (MSE 3) e VIII (MSE 5) and, in the linkage groups I (PRO 1 , PRO 4 and PRO 5) , IV (PRO 3) , V (PRO 6) and VII (PRO 2) for the proA1 pabaA6 yA2 .

strain. In all cases, the meiotic segregation showed a proportion of 1 normal to 1 morphologic colony, indicating that a simple gene is responsible for the alterations observed in the mutants of the MSE bnc and proA1 pabaA6 yA2 strains.

1. INTRODUÇÃO

O fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* é um sistema valioso para estudos de diferenciação, por ser um organismo bem estudado genética e bioquimicamente. Apresenta ciclo vital rápido e fase vegetativa haplóide, onde são formados conídios uninucleados. Seu desenvolvimento pode ser analisado detalhadamente, permitindo conclusões importantes sobre o mecanismo conidial e a respeito dos processos de alongação, formação do conidióforo, esterigmas primários e secundários e conídios, além da migração dos núcleos. O fungo *A. nidulans* é utilizado como modelo para estudo de outros fungos e a compreensão de seus fenômenos de diferenciação poderá ser extrapolada para fungos economicamente importantes.

Através da obtenção de mutantes morfológicos induzidos com luz ultra-violeta, foi realizado um estudo da citologia e genética da conidiação em *A. nidulans*, objetivando ampliar os estudos desse processo para melhor compreendê-lo. A utilização da linhagem mutante com conídios binucleados amplia os resultados obtidos e permite comparação do comportamento dos núcleos em relação às linhagens normais com conídios uninucleados, possibilitando a elucidação de etapas importantes do processo de conidiação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Desenvolvimento e diferenciação em fungos

Os fungos considerados mais primitivos são os Acrasiomycetes e compreendem o grupo dos fungos celulares gelatinosos. Caracterizam-se por apresentar sorocarpo, consistindo de uma massa de esporos sustentada por uma hifa delgada. A fase vegetativa se inicia com a presença de uma mixoameba que se divide por fissões binárias. As mixoamebas se agregam e formam o pseudo-plasmódio com dois tipos celulares, a pré-hifa e o pré-esporo. A fase reprodutiva é determinada pelo aparecimento do macrocisto. Existem espécies homotáticas e heterotáticas e estudos indicam que 3 ou 4 núcleos meióticos se desintegram (AINSWORTH e SUSSMAN, 1966). Em estudos da diferenciação celular em *Dictyostelium discoideum*, um representante da classe Acrasiomycetes, foi sugerida a presença de células iniciadoras, que determinam a agregação e que possivelmente fossem geneticamente distintas. O número de células iniciadoras em *D. discoideum* foi determinado como sendo 2200, a partir do estudo de três mutantes com alterações no desenvolvimento (SUSSMAN, 1965). Uma espécie com sorocarpos múltiplos foi denominada *Dictyostelium polycephalum* (RAPER, 1956).

A atividade enzimática durante o processo de diferenciação foi analisada em um mutante (p^h) de *D. discoideum* (HAMILTON e CHIA, 1975). O mutante apresenta morfologia alterada devido à sensibilidade maior ao AMP cíclico que promove a diferenciação da célula hifal. Foram identificadas oito enzimas que são, β -glucosidase II, trealose-6-fosfato-sintetase, uridina-difosfo-galactose-4-epimerase, N-acetil glucosaminidase, fosfatase-alcalina, desidrase-treonina, α -manosidase e uridina-difosfoglucose-pirofosforilase.

Os Myxomycetes são outro grupo de fungos e apresentam um plasmódio verdadeiro que origina esporóforos contendo esporos. Os esporos germinam produzindo mixoamebas que se dividem por fissão binária e surgem células uninucleadas haplóides (AINSWORTH e SUSSMAN, 1966). O heterotatismo é observado em algumas espécies como *Physarum polycephalum*, *Fuligo septica* e *Comatricha laxa*. Em termos do modo de origem dos esporângios, em espécies como *Chytrium hyalinus*, *Phyctochytrium powhatanensis* e *Rhizopodium sphaerocarpon*, há um tipo estável de desenvolvimento do talo em que o zoósporo pode ser funcional, originando o esporângio, ou não funcional e, neste caso, o esporângio se desenvolve a partir de um tubo germinativo (ROANE e PATERSON, 1974).

Em Phycomycetes, a organização geral do micélio varia entre as diversas ordens: nos representantes mais primitivos dessa classe, o micélio é hermafrodita e as estruturas sexuais diferem entre si pela coloração. A espécie *Phycomyces blakesleeana*, foi a primeira a ser utilizada em estudos genéticos. A propagação vegetativa se dá por esporangiosporos que são, geralmente, multinucleados. A reprodução sexual característica é a gametangioogamia, que se dá entre tipos haplóides "plus" e "minus". O zigoto multinucleado origina o zigósporo após divisões sucessivas. O

zigósporo tem um período de dormência após o qual, germina produzindo o zigosporângio que contém os zigotosporos (+) e (-) (AINSWORTH e SUSSMAN, 1966).

Outras espécies de Phycomycetes têm sido estudadas, incluindo a diferenciação da parede celular em Saprolegniales (HEATH *et alii*, 1971). A formação de parede é acompanhada pelo aparecimento de vesículas ligadas à membrana, concentradas no citoplasma adjacente. O estudo da formação de organelas citoplasmáticas é predominante entre os representantes de Phycomycetes. A estrutura e formação de lomassomos é discutida nas espécies *Saprolegnia ferax* e *Dictyuchus sterile*. É sugerido que os plasmalemassomos são produzidos quando a produção de plasma não é balanceada com a expansão da célula. Quando os plasmalemassomos são isolados na parede da célula em desenvolvimento, são chamados lomassomos (HEATH e GREENWOOD, 1970).

Os melhores exemplos de indução de diferenciação de estruturas sexuais pelos componentes do cruzamento são vistos nas espécies *Achlya ambisexualis* e *Mucor mucedo*. A diferenciação do oogônio e anterídio é induzida pela interação de substâncias produzidas pelos micélios masculino e feminino (ESSER e KÜENEN, 1967). A natureza do hormônio foi determinada em *Achlya ambisexualis* e trata-se do 3-hidróxi-esterol anteridiol (ELLZEY, 1974).

No processo de diferenciação da classe Ascomycetes, distinguem-se duas fases principais, que são a fase inicial de crescimento vegetativo, a partir da germinação do esporo, e a fase final que corresponde ao fenômeno reprodutivo da formação do esporo ou esporulação. Nessa fase formam-se os esporos assexuais ou conídios e os esporos sexuais ou ascósporos. As duas fases delimitam o ciclo de vida total

do fungo, separadas por um período de crescimento micelial onde são formadas estruturas peculiares tais como oídios, clamidosporos, esclerócios, etc (AINSWORTH e SUSSMAN, 1966; ALEXOPOULOS e MIMS, 1979).

Em *Saccharomyces*, como em todos Hemiascomycetes, a multiplicação celular se dá por brotamento. Cada célula-mãe, usualmente, forma de 20 a 30 brotos. A reação sexual está sob o controle de 1 loco que também está envolvido em esporulação e outros processos celulares. Os alelos da reação sexual são designados como "a" e "α". As células "a" e "α" se agregam e permanecem sem repetir o ciclo vital pois a célula "α" secreta um hormônio que impede a formação do broto e síntese de DNA. Ocorre a fusão das células e formação do zigoto. O fenômeno da esporulação é idêntico para espécies homotáticas e heterotáticas. As células entram em divisão meiótica e desenvolvem o asco com 4 ascósporos. Muitos mutantes foram analisados em *Saccharomyces*, incluindo mutantes relacionados à esporulação, mutante "spo", mutantes "ste" e "nul", falham no processo de conjugação de linhagens haplóides de reação sexual oposta; mutantes "cdc" têm falhas no ciclo celular. Existem também mutantes deficientes no processo de recombinação, designados por "rec-1", "rec-2", "rec-3" e "rec-4", relacionados aos 4 grupos de complementação (Sherman e Laurence, citados por KING, 1974). Em *Schizosaccharomyces pombe*, são conhecidos 5 locos relacionados à meiose e 18 locos referentes à esporulação (Gutz *et alii*, citados por KING, 1974).

Nos Euscomycetes, os esporos sexuais são os conídios, que são estruturas decíduas formadas em hifas especializadas denominadas conidióforos. Muitas vezes, são formados macroconídios. Há diferenciação de órgãos sexuais em anterídeos e ascogônios e formação de corpos de frutifica

ção (ALEXOPOULOS e MIMS, 1979).

Existem muitos estudos genéticos em *Euscomycetes*, entre eles destacam-se as espécies *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* e *Sordaria fimicola*. Em *A. nidulans* há muitos mutantes analisados. Apresenta conídios uninucleados, homotalismo e ciclo sexual determinado pela presença de cleistotécios com ascósporos em seu interior. A grande importância dos estudos em *A. nidulans* se concentram na descoberta do ciclo parassexual que consiste na formação de heterocário, fusão nuclear com a formação de diplóide heterozigótico permuta mitótica e haploidização (AZEVEDO, 1972 e Clutterbuck citado por KING, 1974).

A espécie *Neurospora crassa* tem sido estudada intensivamente e seu processo de desenvolvimento é bem conhecido. As hifas se desenvolvem, ramificam e se diferenciam em conidióforos que dão origem a macroconídios dispostos em cadeia e que contêm de 1 a 10 núcleos. O micélio também produz microconídios em microconidióforos que são marcadamente menores que os macroconídios e possuem um só núcleo. A esporulação sexual ocorre através da união das células de reação sexual "A" com células "a", produzindo o protoperitécio com hifas delgadas denominadas tricógines. O processo de divisão, envolve a formação de "crozier" e resulta numa massa de células binucleadas. A meiose é confinada ao asco. A divisão meiótica é seguida por uma mitose. As fibras do fuso não se sobrepõem durante a meiose de modo que os ascósporos, ficam dispostos de forma ordenada (Barrat, citado por KING, 1974). Linhagens microconidiais foram estudadas geneticamente e foram determinados o gene "col-1" que controla o crescimento colonial e está no grupo de ligação IV e o gene "m", responsável pela produção de microconídios e está localizado no grupo II (BARRATT e GARNJOBST, 1949). O cres

cimento hifal foi analisado e verificou-se que 38.000 vesículas se fundem com a hifa principal durante o período de um minuto de extensão (TRINCI e COLLINGE, 1975).

Em Basidiomycetes, o crescimento das células somáticas é monopodial e a hifa principal continua seu crescimento após a ramificação sub-apical. Formam-se rizóides, haustórios, apressórios, vesículas, grampos de conexão, estipes, píleo, himênio e carpóforo. O himênio é a camada fértil e é composto de células diferenciadas como basídios, esporos cistídios, basidiolos e outros elementos estéreis (ALEXOPOULOS e MIMS, 1979). Em *Schizophyllum commune*, ocorrem dois estágios vegetativos distintos: o primeiro estágio é homocariótico de células uninucleadas com septo simples, o segundo estágio é dicariótico com célula binucleada com apêndices no septo. Apresenta sistema tetrapolar de incompatibilidade (fatores A e B) (Raper e Hoffman, citados por KING, 1974). Em fungos comestíveis, o controle genético da frutificação foi observado em *Agrocybe aegerita*. Trata-se de uma espécie cujo corpo de frutificação pode ser formado em ambos os ciclos sexual e assexual. A diferença entre os dois tipos de basidiocarpos é que o último é menor e contém dois esporos em cada basídio. A frutificação sexual requer o estabelecimento de um dicário, o qual está sob o controle de dois fatores de incompatibilidade (A e B). A frutificação assexual se inicia diretamente de um monocário. Em ambas as frutificações, monocariótica e dicariótica, os mesmos dois genes ("fi⁺" e "fb⁺") são responsáveis pelo início e diferenciação dos basidiocarpos, respectivamente (ESSER e MEINHARDT, 1977).

As espécies de Deuteromycetes são chamadas de fungos imperfeitos por não ter sido verificado ciclo sexual. Apresentam talo bem desenvolvido e hifas ramificadas. Os conídios podem ser produzidos diretamente por hifas somáti-

cas com células conidiogênicas ou em estruturas especializadas, tais como picnídios, esporodóquios, sinêmios e acérvulos. O ciclo parassexual ocorre em algumas espécies como *Penicillium chrysogenum* (AINSWORTH e SUSSMAN, 1966). Existem estudos da ultra-estrutura do esporo e do tipo de desenvolvimento e fatores envolvidos em várias espécies. A espécie *Botrytis cinerea*, apresenta conídios com parede de camada dupla e a estrutura celular contém núcleo típico, mitocôndria e endoplasma com plasmalema circundante e retículo endoplasmático esparsos (HAWKER e HENDY, 1963).

A síntese de macromoléculas e formação de polirribossomos nos primeiros estágios da germinação de *Fusarium solani* demonstraram que a síntese de proteínas e RNA em macroconídios se inicia quando aparecem os tubos germinativos. A formação de RNA antecede a síntese de DNA (COCHRANE *et alii*, 1971).

A expressão de caracteres morfológicos está sob o controle genético e de fatores externos. Um modelo definitivo da cadeia de processos bioquímicos e biofísicos associados à informação genética da diferenciação celular consiste na forma adequada de estudo do desenvolvimento e diferenciação de qualquer organismo vivo.

2.2. *Aspergillus nidulans*

O fungo filamentosso *A. nidulans* apresenta ciclo sexual e assexual definidos. Seu mecanismo conidial é particularmente interessante por ter estrutura bem determinada e pela pigmentação verde característica, de tal modo que mutantes que não a possuem podem ser reconhecidos e analisados pela

modificação ou mesmo ausência de conídios (CLUTTERBUCK, 1969 a). O ciclo assexual se completa em 24 horas e várias etapas de diferenciação se processam, sendo que a germinação é precedida por aumentos nas quantidades de DNA, RNA, proteína e peso seco (BAINBRIDGE, 1971). Estando em meio favorável, um conídio uninucleado haplóide (YUILL, 1950), apresenta sincronia na formação do tubo germinativo, divisão nuclear nas hifas e síntese de DNA (ROSENBERGER e KESSEL, 1967; KESSEL e ROSENBERGER, 1968), sendo que após três ou quatro ciclos de divisão nuclear, é determinada assincronia na região apical das hifas (FIDDY e TRINCI, 1976). Durante o alongamento da hifa, ocorrem divisões nucleares que são seguidas pela formação de uma série de septos incompletos que dividem a região apical pela metade, quando essa contém 4 ou 8 núcleos (CLUTTERBUCK, 1970a; FIDDY e TRINCI, 1976). A precisão da divisão dos compartimentos em dois, pelo septo sugere que a septação é bem regulada (FIDDY e TRINCI, 1976). As hifas crescem e se bifurcam, formando uma colônia cujo raio aumenta exponencialmente, por poucas horas e, então cresce linearmente (TRINCI, 1969). A colônia cresce sem diferenciar-se por 24 horas e então surgem os conidióforos, seguidos em poucas horas pelo aparecimento de conídios (CLUTTERBUCK, 1969a).

O crescimento das hifas se dá pela síntese da parede (KATZ e ROSENBERGER, 1971) e está ligado à fusão de vesículas, originadas do citoplasma do micélio, com a parede já existente (COLLINGE e TRINCI, 1974). A partir do desenvolvimento das hifas surgem as ramificações que aumentam em taxa exponencial, seguindo o crescimento do micélio (MACKINTOSH e PRITCHARD, 1963; KATZ *et alii*, 1972; TRINCI, 1974). O número de septos e o número de ramificações produzidos pelas hifas estão correlacionados (FIDDY e TRINCI, 1976). Os conidióforos surgem após 22 horas, a partir da célula podal, iniciando como um eixo alongado e espessado

que termina em uma vesícula globosa (AXELROD, 1972 ; RAPER e FENNEL, 1973). Formam-se brotos e ocorrem divisões no núcleo da vesícula que, então migram para os esterigmas primários que, alcançando seu comprimento máximo, originam os esterigmas secundários cujos núcleos também são provenientes de mitoses. O núcleo de cada esterigma secundário se divide e, após a divisão, cada um deles permanece num extremo do esterigma que, após constrição, origina o conídio. As divisões e constrições se sucedem formando uma cadeia de conídios (PONTECORVO *et alii*, 1953 ; CLUTTERBUCK, 1969a ; MARTINELLI, 1976). As hifas conidióforas e vesículas são multinucleados enquanto que os esterigmas e conídios são uninucleados (PONTECORVO *et alii*, 1953 ; CLUTTERBUCK, 1969a ; MARTINELLI, 1976) , embora PIZZIRANI (1977), tenha encontrado uma linhagem que apresenta conídios binucleados.

Em estudos da ultraestrutura do conidióforo e dos conídios, foi verificada a presença de plasmalemasomas no citoplasma sub apical e basal do esterigma em crescimento e próximo ao desenvolvimento dos septos e que, após a formação do septo, são achatados contra os septos e a parede da célula mais velha, estando associados com lomassomas (OLIVER, 1972).

O processo de conidiação está relacionado com a diminuição de carbono e nitrogênio assimiláveis, o que indica que o desenvolvimento da estrutura conidial está ligado a fatores que limitam o crescimento vegetativo do fungo (COCHRANE, 1958). Em culturas submersas de *A. nidulans*, observou-se conidiação normal, mesmo na ausência de sais inorgânicos (SAXENA e SINHA, 1973 ; MARTINELLI, 1976). Outros fatores afetam a formação dos conídios desde o aparecimento dos conidióforos até o processo de pigmentação dos conídios e entre eles se destacam, a temperatura (KILBEY, 1963 ; TRINCI, 1969 ; CLUTTERBUCK, 1969a , 1970b ; AXELROD , 1972 ;

MARTINELLI, 1972 , 1976 ; YAGER *et alii*, 1982), pH (KILBEY, 1963 ; CLUTTERBUCK, 1972 ; MARTINELLI, 1972) , elementos essenciais (KILBEY, 1963 ; SAXENA e SINHA, 1973) , cloreto de potássio (CLUTTERBUCK, 1970b) , aminoácidos e vitaminas (MARTINELLI, 1972) e glucose (TRINCI, 1969 ; CLUTTERBUCK, 1970b ; AXELROD, 1972).

A temperatura considerada ótima para o tipo selvagem de *Aspergillus nidulans* iniciar o desenvolvimento de conidióforos é ao redor de 35°C . A 37 e 41°C , o período de eclipse do desenvolvimento é cerca de 1,5 vez mais longo que a 36°C e , a 26°C o período de eclipse é o dobro (AXELROD, 1972).

O estudo de mutantes aconidiais termo-sensíveis, demonstrou que o período de termo-sensibilidade (TSP) dos mutantes ocorreu dentro de uma faixa de tempo mais ou menos delimitada do ciclo vital e, que os mutantes podem ser divididos em duas classes, de acordo com a perda de sua termo-sensibilidade, anterior ou posterior à indução de conidiação (YAGER *et alii*, 1982).

Além de fatores externos relacionados com a estrutura conidial, existe um controle genético endógeno responsável pelo desenvolvimento do fungo e pelo processo de esporulação assexual. A análise de mutantes com vários aspectos referentes à conidiação modificados, isto é, bloqueados em etapas diferentes do desenvolvimento tais como, formação de vesículas e produção de esterigmas primários e secundários, sugeriram que as atividades de somente dois loci, em adição àqueles funcionando normalmente nas hifas são necessários para a conversão da morfologia hifal em conidial. Os dois mutantes encontrados atuam em etapas diferentes da conidiação. O locus denominado "bristle" (brl), coordena a

mudança no crescimento do tipo hifal multinucleado do conidióforo levando ao crescimento tipo conidial uninucleado, por brotamento do esterigma. O mutante "bristle" aconidial, apresenta crescimento contínuo formando somente vesículas e eixo de conidióforo anormal. A mudança no padrão de brotamento é determinada pelo locus "abacus" (aba), que conduz o brotamento apical dos esterigmas para o brotamento intersticial dos conídios (CLUTTERBUCK, 1969a). Em estudos quantitativos de outros mutantes para conidiação, MARTINELLI e CLUTTERBUCK (1971), estimaram que o número de loci envolvidos deve ser de 45 a 150, sendo que esses loci podem ser estruturais ou reguladores de fases específicas e são denominados morfogenéticos (CLUTTERBUCK, 1977). A comprovação da hipótese que outros genes estão envolvidos com o desenvolvimento conidial é verificada em dois outros mutantes encontrados, "stunted" (stu) e "medusa" que produzem conídios aparentemente normais em estrutura conidial anormal. Em ambos os casos, os mutantes são defectivos na formação de cleistotécios, demonstrando que as atividades normais desses loci, embora não requeridas para o crescimento vegetativo, são relacionados a duas situações diferentes de diferenciação.

A regulação gênica da reprodução assexual também foi investigada por TIMBERLAKE (1980), através de comparações entre populações de poli (A) RNA derivadas de hifas somáticas, culturas em processo de conidiação e conídios purificados e, experimentos de hibridação mostraram que as células vegetativas contêm de 5.600 a 6.000 sequências de poli (A) RNA. A hibridação com cDNA indicou que uma proporção significativa de poli (A) RNA proveniente de culturas em processo de conidiação ou, esporos, consistiu de sequências ausentes nas hifas somáticas. Aproximadamente 18,5% na massa de poli (A) RNA inclui 1.300 sequências ausentes nas células somáticas; sendo que dessas sequências, cerca de

300 estão presentes somente nos conídios e o restante é acumulado especificamente durante a esporulação, mas está ausente nos esporos. A maioria das sequências acumuladas por hifas vegetativas também está presente nas culturas esporulantes, portanto a diferenciação celular, durante o processo de conidiação, envolve o acúmulo de muitas sequências novas de poli (A) RNA (700 - 1.100), mas não a perda das sequências pré-existentes. Foi estimado que 3 a 6% do DNA, representando cerca de 1.300 genes estruturais, é seletivamente expresso durante a conidiação.

São também, frequentemente verificados mutantes "fluffy", com crescimento micelial excessivo, mas sem conídios; fenotipicamente se assemelham aos mutantes "miceliais" (ROPER, 1958), que apresentam, algumas vezes, poucos e pequenos conídios (UPSHALL, 1966). São explicados como sendo resultantes de mutações recessivas simples (BALL e AZEVEDO, 1964; AZEVEDO, 1965) ou, dominantes (DORN *et alii* 1967; DORN, 1970) ou ainda, interação de genes citoplasmáticos e nucleares (ROPER, 1958; DORN *et alii*, 1967; DORN, 1970).

A existência de estrutura conidial alterada é frequentemente acompanhada por variações nas hifas, o que indica um efeito pleiotrópico, afetando crescimento vegetativo e conidiação (MARTINELLI e CLUTTERBUCK, 1971; BIAGI, 1977).

MARTINELLI e CLUTTERBUCK (1971), classificam os mutantes obtidos de acordo com o estágio de desenvolvimento bloqueado em tipos asporogênicos e oligosporogênicos, sendo que, no caso de mutantes oligosporogênicos a classificação é dada considerando-se o primeiro estágio em que o defeito se manifesta pois, diferentes conidióforos na mesma colônia se desenvolvem diferentemente.

Através da observação dos fenótipos de mutantes simples (CLUTTERBUCK, 1969 a) e da síntese de heterocários e duplos mutantes a partir desses mutantes, MARTINELLI (1974), sugeriu a seguinte via morfogênética:

MARTINELLI (1978), confirmou os resultados obtidos, verificando a epistasia de mutantes bloqueados no início do processo de conidiação sobre mutantes com bloqueio no final. Os resultados obtidos indicaram que a ação gênica se sobrepõe no tempo; muitas partes do aparelho conidial são permutadas e, os núcleos restantes na vesícula não são irreversivelmente programados.

Os aspectos bioquímicos referentes ao processo de conidiação, foram analisados e verificou-se a ação de muitas enzimas. A primeira enzima, uma lacase, p-difenol oxidase é considerada específica do processo conidial (CLUTTERBUCK, 1969c, 1972; MARTINELLI, 1976), porque não é encontrada no micélio e em mutantes aconidiais. Em linhagens de esporos amarelos também não é detectada o que sugere ser o locus *yA* um gene estrutural para um dos componentes da enzima. Em experimentos com mutantes de esporos amarelos e termo-sensíveis, CLUTTERBUCK (1972), confirmou a existência de locus "*yA*" e sugeriu que a enzima, como outras fenol-oxidases, também contém cobre.

A segunda enzima, uma cresolase está ligada à melanização do conidióforo (CLUTTERBUCK, 1973b) , sendo em contrários mutantes "bristle" melanizados e com estruturas intermediárias entre vesículas e esterigmas e, mutantes "ivory" com conidióforos normais mas não melanizados. Supõe-se então, que o locus "ivo" é um gene estrutural e sua atividade é controlada pelo locus "brl" , além de outros loci "ivo" responsáveis pela produção do substrato fenólico (CLUTTERBUCK, 1977). Devido às especificidades de substratos, ambas as enzimas se diferenciam da fenol-oxidase encontrada no micélio (BULL e CARTER, 1973 ; MARTINELLI e BAINBRIDGE, 1974). A terceira enzima envolvida no processo é a isocitrato liase (McCULLOUGH e ROBERTS, 1976). O 3' ,5' monofosfato de adenosina (cAMP) também afeta o processo de conidiação pois foi observado ter alto nível no início do crescimento e redução após 20 horas, tanto em culturas submersas como de superfície (CLUTTERBUCK, 1975).

Quanto à citologia de *A. nidulans* , sabe-se que sob muitos aspectos há similaridade com os organismos superiores como na presença de um nucléolo, fios de cromatina, cariolinfa e membrana nuclear. A mitose é essencialmente a mesma, mas o fuso parece ter origem intranuclear (OLIVE, 1953). Na metáfase, os cromossomos se orientam ao longo do fuso mais do que na placa; a membrana nuclear permanece durante toda a divisão mitótica e não aparecem centríolos (ROBINOW e CATEN, 1969). A condensação dos cromossomos durante a metáfase indicou que o número haplóide em *A. nidulans* é oito (KAUFER, 1958 ; ELLIOTT, 1960). Três cromossomos são grandes (um deles com satélite), dois de tamanho médio, dois pequenos e um muito pequeno, correspondendo aos oito grupos de ligação (ELLIOTT, 1960). Em ordem decrescente de tamanho seguem a relação I , VIII, II , III , VII, IV, VI e V , baseado no número de quebras cromossômicas, nos le

tais recessivos induzidos, nas unidades de recombinação, na frequência de aneuplóides (DANTAS D'ARCE, 1972) e, na sobrevivência a mutagênicos químicos (AZEVEDO *et alii*, 1983).

A partir do conhecimento dos oito grupos de ligação, as mutações foram melhor localizadas, estando os mutantes "abacus" e "bristle", no grupo VIII (CLUTTERBUCK, 1969c, 1973b). Outras mutações foram detectadas como "anucleate primary sterigmata" designada como "apsA" e "apsB", estando nos grupos IV e VI, respectivamente. Caracterizam-se pela presença de esterigma primário anucleado e com crescimento reduzido, no primeiro caso e crescimento estacionado na fase de esterigma secundário, no segundo caso (CLUTTERBUCK, 1969a). Mutantes "brown conidia" (bwA), no grupo VI, com cabeça conidial pequena e coloração marrom; mutantes do tipo "chartreuse conidia" (chaA), no grupo VIII, cujos conídios têm cor verde clara (KÄFER, 1958, 1961); mutantes "dilute conidial color" (dil), com conídios de coloração diluída, no grupo III (Jansen, citado por DORN, 1967). As mutações que levam à alteração da cor dos conídios são ainda verificadas nos grupos VII e II, em mutantes denominados "dark conidial color" (drk), (CLUTTERBUCK, 1969c, 1970b; OLIVER 1972), e nos grupos VIII e V, nos mutantes "fawn conidia" (fw, bge), (CLUTTERBUCK, 1965; CUNHA, 1970). Estão também mapeados mutantes "pale conidia" (p), nos grupos V e VII (VAN ARCKEL, 1962; KÄFER, 1965; CLUTTERBUCK, 1968); "sage conidia" (sa), no grupo II (KILBEY, 1960), "slow growing noncleistothecial" (sgp), nos grupos I, III, IV, V e VII (HOUGHTON, 1970, 1971) "white conidia" (w) e "alba conidia" (wa), no grupo II (YUILL, 1936; PONTECORVO *et alii*, 1953; KÄFER, 1958; CLUTTERBUCK, 1968), "wet-white conidia" (wet), no grupo VII (CLUTTERBUCK, 1969c), "yellow conidia" (y), no grupo I (PONTECORVO *et alii*, 1953; KILBEY, 1963; CLUTTERBUCK, 1968, 1972) e mutantes "yellow-green conidia" (yg), no grupo II

(Dorn e Rivera, citados por DORN, 1967 ; CLUTTERBUCK, 1968).

Muitos dos mutantes defectivos na divisão celular, divisão nuclear e distribuição nuclear são sensíveis à temperatura e foram isolados para o estudo da genética e bioquímica da mitose (MORRIS, 1976 ; ORR e ROSENBERGER, 1976). Entre eles estão os mutantes "blocked in mitosis" (bim), que em temperatura restritiva apresentam uma descondensação dos cromossomos e desorganização do fuso, sugerindo que ambos os processos têm um controle genético comum; mutantes designados "nim" ("never in mitosis"), não possuem núcleos em divisão mitótica o que indica que o gene "nim" controla os processos que desencadeiam a mitose; mutantes "nud" ("nuclear distribution") apresentam divisão normal sob temperatura restritiva, mas a distribuição dos núcleos é anormal, sendo que permanecem agrupados próximos aos septos hifais. Mutantes "sep", que falham na formação de septos também foram detectados.

Como regra geral, os conídios apresentam um único núcleo (YUILL, 1950 ; PONTECORVO *et alii*, 1953 ; CLUTTERBUCK, 1969a ; MARTINELLI, 1976) , mas foram verificados conídios binucleados, trinucleados e tetranucleados em linhagem haplóide (PIZZIRANI, 1977) , caráter este devido a um gene, "bnc 1", do grupo de ligação IV (PIZZIRANI - KLEINER e AZEVEDO, no prelo). Nos conídios uninucleados, o volume celular é proporcional à ploidia e à quantidade de DNA (HEAGY e ROPER, 1962 ; PONTECORVO *et alii*, 1953). A relação DNA / citoplasma se mantém tanto em haplóides como em diplóides (ISHITANI *et alii*, 1956). Nas hifas, o volume independe da ploidia e é regulado pela frequência de divisões mitóticas (CLUTTERBUCK, 1969b). Os diplóides apresentam um número menor de núcleos nas hifas e no conidióforo do que haplóides, sendo que tanto em diplóides como em haplóides, o número de mitoses nas vesículas é o mesmo. Por ser original

do na vesícula, o esterigma independe da ploidia, até o núcleo ter migrado para o seu interior e ter-se dividido (CLUTTERBUCK, 1969b). A proporção nuclear em heterocários diplóide-haplóide é determinada através de análises citológicas pois os núcleos de diplóides e haplóides diferem em tamanho (CLUTTERBUCK e ROPER, 1966). Em linhagens diplóides, os espaços entre núcleos são maiores do que em haplóides, embora não ocorram variações nas dimensões das hifas (CLUTTERBUCK, 1969b). Essas distâncias internucleares são maiores antes da divisão nuclear e menores após a divisão (MORRIS, 1976). Estudos bioquímicos detalhados sobre núcleos de *A. nidulans* são dados por MORRIS *et alii*, 1977.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens

As duas linhagens utilizadas neste trabalho, são derivadas da linhagem selvagem de *Aspergillus nidulans*, obtida por YUILL (1939) e, provenientes do Departamento de Genética da Universidade de Glasgow, Escócia, guardadas no Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra. A linhagem que forma conídios com mais de um núcleo foi obtida por PIZZIRANI (1977) no setor de Genética de Microorganismos do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, a qual foi designada MSE bnc (PIZZIRANI - KLEINER e AZEVEDO, no prelo). A Tabela 1, mostra as linhagens com suas características genéticas e referências. A Tabela 2, apresenta os fenótipos e os símbolos gênicos mutantes. O mapa dos grupos de ligação, segundo CLUTTERBUCK (1974), e os respectivos símbolos gênicos estão na Figura 1 (CLUTTERBUCK, 1973a).

TABELA 1. Linhagens de *Aspergillus nidulans* utilizadas neste trabalho; seus marcadores genéticos e referências.

Linhagem	Genótipos
"Master Strain" E (MSE bnc)	suA1 yA2 adE20; wA3; galA1; pyroA4 bncl, PIZZIRANI, (1977) facA303; sB3; nicB8; riboB2
<u>proA1 pabaA6 yA2</u>	proA1 pabaA6 yA2

FIGURA 1. Mapa parcial de ligação de *A. nidulans* com os marcadores genéticos utilizados neste trabalho. Os centrômeros estão representados por 0 e as distâncias no mapa não estão em escala.

TABELA 2. Lista com locos gênicos das linhagens de *A. nidulans* utilizadas neste trabalho, com seus símbolos, fenótipos e grupos de ligação.

Símbolos	Fenótipos	Grupos de ligação
- Nutricionais		
adE20	requer adenina	I
nicB8	requer ácido nicotínico	VII
pabaA6	requer ácido p-aminobenzóico	I
proA1	requer prolina	I
pyroA4	requer piridoxina	IV
riboB2	requer riboflavina	VIII
sB3	requer tiosulfato de sódio	VI
facA303	incapaz de utilizar acetato	V
galA1	incapaz de utilizar galactose	III
- Visíveis		
wA3	conídios brancos, epistático a y e y^+	II
yA2	conídios amarelos	I
- Morfológicos		
bnc1	conídios uni, bi e trinucleados	IV
- Supressor		
suA1 adE20	supressor da adE20	I

3.2. Meios de cultura e soluções

3.2.1. Meio mínimo - (PONTECORVO *et alii*, 1953)

NaNO ₃		6,0 g
KH ₂ PO ₄		1,5 g
KCl		0,5 g
Mg SO ₄ · 7H ₂ O		0,5 g
Fe SO ₄		0,01 g
Zn SO ₄		0,01 g
Glicose		10,0 g
Ágar		15,0 g
Água destilada		1.000 ml
(pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%)		

3.2.2. Meio completo - (PONTECORVO *et alii*, 1953, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973)

Adicionou-se ao meio mínimo:

Peptona		2,0 g
Caseína hidrolizada		1,5 g
Extrato de levedura		0,5 g
Solução de vitaminas		1,0 ml
Ácidos nucleicos de leveduras hidrolisado..		2,5 ml
(pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%)		

3.2.3. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo

Adicionou-se, ao meio mínimo líquido (sem agar) 2% de meio completo líquido e, distribuiu-se 2,5 ml por tubo de ensaio. Os tubos foram autoclavados a 1 atm por 15 minutos.

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

$\text{CH}_3\text{COONH}_4$		12,0 g
KH_2PO_4		3,0 g
NaCl		2,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0,5 g
FeSO_4		traços
ZnSO_4		traços
Ágar		15,0 g
Água destilada		1.000 ml
(pH ajustado para 6,1 com NaOH 4%)		

3.2.5. Meio mínimo de galactose

Meio mínimo líquido sem a glicose	.	1.000 ml
Galactose		10,0 g
Ágar		15,0 g
(pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%)		

3.2.6. Solução de vitaminas

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

(A solução deve ser guardada em frasco escuro no refrigerador a 4°C, após ter sido aquecida em banho-maria por 15 minutos, sob clorofórmio).

3.2.7. Solução de ácidos nucleicos de leveduras

Ácidos nucleicos de leveduras - 2 g em 15 ml de solução 1 N de HCl.

Ácidos nucleicos de leveduras - 2 g em 15 ml de solução 1 N de NaOH.

Ambas as soluções foram aquecidas a 100°C por 20 minutos, misturadas e o pH ajustado para 6,0 com Na OH 4%. Filtrou-se a mistura e completou-se o volume para 40 ml. Foi guardada no refrigerador a 4°C, sob clorofórmio.

3.2.8. Suplementos adicionados ao meio mínimo

O estoque de suplementos foi preparado, adicionando-se cada um deles em água esterilizada. Em seguida, as soluções foram colocadas em banho-maria, por 15 minutos, para esterilização e conservadas sob refrigeração a 4°C.

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

3.2.9. Solução salina

Solução de NaCl 0,89% em água destilada, sendo a seguir distribuída em frascos (9 ml).

3.2.10. Solução de "tween"

Solução 0,1% de tween 80 em água destilada (V/V) e distribuída 2,5 ml por tubo.

3.2.11. Solução de cloroneb (1,4-dicloro-2,5-dimetoxil benzeno)

Solução de cloroneb 2% (Du Pont, 65% de P.A.) em água destilada esterilizada, a qual foi aquecida em banho-maria por 15 minutos e conservada no refrigerador a 4°C.

3.2.12. Solução de safranina 0,10%

Safranina	1,0 g
Álcool 95%	100 ml

Retirou-se 10 ml da solução de safranina alcoólica 1,0 % e o volume foi completado com 90 ml de água destilada.

3.2.13. Solução de albumina

A solução de albumina 5% , preparada através da adição de clara de ovo em água destilada e posterior conservação em frasco escuro, no refrigerador.

3.2.14. Solução de Helly

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

(Conservar em frasco escuro).

3.2.15. Formol neutro

Prepara-se o formol neutro, adicionando -se uma parte de carbonato de cálcio em 3 partes de formalina, com agitação esporádica por 10 dias.

3.2.16. Solução de ácido clorídrico 1 N

HCl	82,9 ml
Água destilada	1.000 ml

3.2.17. Solução fosfato pH 6,9

Solução A

NaH_2PO_4	27,80 g
Água destilada	1.000 ml

Solução B

Na_2HPO_4	53,65 g
Água destilada	1.000 ml

Para pH 6,9 , colocou-se 45 ml da solução A, 55 ml da solução B e 100 ml de água destilada.

3.2.18. Solução de Giemsa

A solução consiste na dissolução de 1 g de Giemsa (Merck) em 66 ml de glicerina a 60°C. Após resfriamento, são acrescentados 66 ml de metanol e a solução resultante é filtrada e conservada em frasco escuro.

3.3. Esterilização e incubação

Os meios a serem utilizados foram autoclavados por 15 minutos a 1 atm de pressão. A temperatura de incubação foi de 37°C.

3.4. Obtenção de mutantes

Os conídios das duas linhagens foram suspensos em solução de "tween" (2,5 ml) e agitados em agitador "Vortex" para desagregação das cadeias. Foi retirado 1,0 ml da suspensão que foi colocado em lâmina hematimétrica "Neubauer", para contagem dos conídios e, em seguida, fez-se a diluição em 9 ml de solução salina. A suspensão foi colocada em placa de Petri e submetida à irradiação com luz ultra-violeta (Mineral light lamp Model UVSL-25, 115 V. 60 Hz 0,16A), conservando uma distância de 15 cm entre a lâmpada e a placa. Amostras de 0,1 ml foram retiradas nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 minutos e diluídas em solução salina. Em placas com meio completo foram semeados 0,1 ml das suspensões e a incubação foi feita a 37°C por 72 horas. Após esse período, as colônias foram contadas e a porcentagem de sobrevivência pôde ser calculada em relação ao controle (tempo zero), considerado como nível 100% de sobrevivência. Durante a análise foram selecionados, através de inspeção visual, mu

tantes com morfologia alterada (cor), associada a alterações na estrutura conidial, observada após coloração com safranina e análise sob microscópio.

3.5. Análise citológica

Após a seleção dos mutantes morfológicos e com estrutura conidial alterada, a análise citológica mais detalhada foi efetuada pelo método de ROBINOW e CATEN (1969), com HCl-Giemsa, modificado por PAES DE BARROS (1977), sendo que previamente se fez o cultivo das colônias sobre lamínula. Em placas contendo meio completo foram colocadas quatro lamínulas esterilizadas sobre a superfície e, os conídios inoculados ao redor das mesmas, a uma distância de 0,5 cm. Após diferentes períodos de incubação (24 a 30 horas), as lamínulas foram removidas. A adesão das estruturas sobre a lamínula foi feita com albumina.

A análise das estruturas foi feita, fixando-se o material com 10 ml de solução Helly, acrescida de 0,6 ml de formol neutro por 15 minutos. Em seguida, fez-se a lavagem das lamínulas em álcool 70% e posteriormente a hidrólise em ácido clorídrico 1 N a 63°C por 20 minutos. As lamínulas foram então lavadas em água destilada e colocadas em vidros-relógio, fazendo-se a coloração em 10 ml da solução tampão-fosfato pH 6,9 e 18 gotas de Giemsa. O tempo de coloração foi de 45 minutos e após esse, as lamínulas foram lavadas em solução fosfato e colocadas em lâminas para a análise sob microscópio. A medição da estrutura conidial (comprimento do pedúnculo, vesícula e conjunto de esterigmas; largura do pedúnculo, vesícula e conjunto de esterigmas e diâmetro dos conídios), foi feita utilizando-se microscópio Wild (Heerburgg) M 2034983 Spencer, com ocular micrométrica (Ernst

Leitz Wetzlar 6X) e objetiva de 40 vezes. Para a medida do diâmetro dos conídios e núcleos, usou-se a objetiva de 100 vezes. A Figura 2, mostra o esquema do aparelho conidial e indicações dos locais onde foram feitas as medidas.

DC = Diâmetro do conídio

CE = Comprimento do conjunto de esterigmas

CV = Comprimento da vesícula

CP = Comprimento do pedúnculo

LE = Largura do conjunto de esterigmas

LV = Largura da vesícula

LP = Largura do pedúnculo

Figura 2. Esquema do aparelho conidial, indicando os locais de medidas.

3.6. Análise genética

Meios empregados

A análise genética dos mutantes foi feita utilizando-se placas de Petri com meio completo (MC), com meio mínimo (MM), com meio mínimo suplementado com todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento (M+T), meio mínimo de galactose com todos os requisitos (Gal), meio de acetato de amônio com todos os requisitos (fac) e, com meio mínimo suplementado com todos os requisitos, exceto aquele sob análise. A transferência das colônias foi efetuada

com replicador multifio de níquel cromo, com 26 pontos (AZEVEDO *et alii*, 1976).

A análise genética dos mutantes obtidos foi efetuada através dos processos mitótico e meiótico. A análise mitótica, baseia-se no ciclo parassexual e se inicia com a obtenção de heterocários, de acordo com a técnica descrita por PONTECORVO *et alii* (1953). Os conídios das duas linhagens, com marcadores genéticos diferentes, foram colocados em 2,5 ml de meio mínimo líquido mais 2% de meio completo. A suspensão foi incubada por 4 dias e o heterocário formado na superfície do meio de cultura foi removido, dividido em quatro partes e transferido para placas contendo meio mínimo. Após 5 dias de incubação, os conídios dos setores heterocarióticos formados foram colocados em solução de "tween", agitados no agitador e, semeados (0,1 ml) em placas com meio mínimo, para seleção de diplóides. A obtenção de diplóides é feita segundo a técnica de ROPER (1952), e o reconhecimento dos diplóides heterozigotos foi efetuado através da coloração uniforme e tamanho maior dos conídios. A medição dos conídios foi feita em microscópio com ocular micrométrica, tomando-se cadeias de 5 conídios em lâmina com lisol (1 : 10, lisoforme : água destilada).

A indução de haploidização nos diplóides foi feita em seguida, utilizando-se cloroneb em uma concentração de 25 µg /ml de meio completo (AZEVEDO e SANTANA, 1975). A inoculação dos diplóides foi feita em quatro pontos das placas contendo meio completo adicionado de cloroneb. Após 7 dias de incubação, os setores foram purificados em meio completo e transferidos um a um em 26 pontos fixos em placas com meio completo que, após crescimento dos setores haplóides, foram utilizadas como placas mestras e replicadas para os meios de análise através do replicador multifio. A leitura

das placas, após 24 e 48 horas de incubação, permitiu que fosse observado e anotado o crescimento e a ausência de crescimento, para os diferentes requisitos nutricionais.

A análise meiótica foi feita pelo ciclo sexual, a partir da obtenção de ascósporos produzidos em cleistotécios híbridos, segundo o método de PONTECORVO *et alii.* (1953). Para isso, o heterocário obtido através de técnica já descrita, foi transferido, em quatro partes, para placas com meio mínimo vedadas com fita celulósica. Após incubação por 10 dias, os cleistotécios foram retirados sob lupa e rolados em placas com meio mínimo para isolá-los de micélio, conídios e células de Hulle, aderentes à parede cleistotecial. Cada cleistotécio foi transferido para um tubo de ensaio contendo 2,5 ml de solução de "tween" e esmagado, com pipeta, contra a parede do tubo. Em seguida, a parede do tubo foi lavada para ressuspensão dos ascósporos e, 0,1 ml da suspensão foi semeado em placas e o restante foi conservado no refrigerador. A seleção dos cleistotécios híbridos foi feita após 3 dias de incubação, através de inspeção visual, pois foram utilizadas linhagens de coloração diferente. Utilizando-se diluições apropriadas das suspensões dos ascósporos provenientes de cleistotécios híbridos, foi semeado 0,1 ml em placas com meio completo e, após 3 dias de incubação, as colônias foram contadas para segregação de cor de conídios. Em seguida, foram transferidas individualmente para placas mestras (26 pontos) com meio completo e, após três dias de incubação, as colônias foram replicadas, com replicador multifio, para placas com os meios de análise. Foram anotadas as respostas de crescimento e não crescimento, após 24 e 48 horas, para os diversos requisitos nutricionais.

3.7. Taxa de crescimento

As linhagens originais (MSE bnc e proAl pabaA6 yA2) e os mutantes selecionados foram inoculados no centro de placas contendo meio completo e incubados, por sete dias, sob temperatura de 37°C. A medida do diâmetro das colônias foi feita do 1º dia até o 7º dia de crescimento.

3.8. Taxa de conidiação

Os mutantes e suas linhagens originais foram inoculados em placas com meio completo. Após três dias de incubação, a 37°C, foram retiradas, de cada colônia, áreas de 1,5 cm de diâmetro que foram colocadas em tubos de ensaio com solução de tween (2,5 ml). A agitação foi feita por 60 segundos no agitador para desagregação dos conídios e o número de conídios foi estimado através de contagem no hematímetro ("Neubauer").

3.9. Análise estatística

As análises de variância foram feitas de acordo com o delineamento em blocos inteiramente casualizados (COCHRAN e COX, 1957). Considerando a natureza do trabalho, foi necessária a decomposição da fonte de variação referente aos tratamentos, nos seguintes componentes: entre mutantes G_1 (5 mutantes da linhagem MSE bnc), entre mutantes G_2 (6 mutantes da linhagem proAl pabaA6 yA2), linhagens originais (MSE bnc e proAl pabaA6 yA2) e entre grupos. O esquema seguido para as análises está apresentado a seguir:

Fonte de Variação	^f G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Entre tratamentos	12	S_1	Q_1	Q_1/Q_6
Entre mutantes G_1	4	S_2	Q_2	Q_2/Q_6
Entre mutantes G_2	5	S_3	Q_3	Q_3/Q_6
Linhagens originais	1	S_4	Q_4	Q_4/Q_6
Entre grupos	2	S_5	Q_5	Q_5/Q_6
Resíduo	*247	S_6	Q_6	
Total	*259			

OBS.: Os graus de liberdade acima apresentados referem-se aos componentes da estrutura conidial (comprimento do pedúnculo, vesícula e conjunto de esterigmas; largura do pedúnculo, vesícula e conjunto de esterigmas; diâmetro de conídios uninucleados e seus núcleos), cujas análises de variância foram feitas com médias de 20 repetições.

^f Na análise de variância para diâmetro dos conídios binucleados e núcleos, feita somente para a linhagem MSE bnc, os graus de liberdade são: entre tratamentos = 5; resíduo = 114 e total = 119.

* As análises de variância para taxa de crescimento foram feitas com médias de 4 repetições, sendo assim os graus de liberdade para o resíduo e o total são 39 e 51, respectivamente. Do mesmo modo, para a taxa de conidiação, feita com três repetições, estes valores são 26 e 38, respectivamente.

Em seguida, as médias dos tratamentos foram comparadas entre si através do teste de TUKEY (STEEL e TORRIE, 1960).

A segregação meiôtica foi analisada pelo teste de χ^2 . O valor de recombinação entre os segregantes normais e recombinantes, na análise meiôtica, foi calculado segundo a fórmula:

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

onde:

C = valor de ligação;

R = número de colônias recombinantes;

T = número total de colônias analisadas.

4. RESULTADOS

4.1. Sobrevivência à luz ultra-violeta

Os conídios das linhagens MSE bnc e proA1 pabaA6 yA2 foram submetidos ao tratamento com luz ultra-violeta em diferentes intervalos de tempo (0 a 5 minutos), correspondendo às intensidades de fluxo de energia calculadas em $J / (m^2 \cdot s)$. As porcentagens de conídios sobreviventes, em cada intensidade, foram estimadas em relação ao tempo zero e as curvas de sobrevivência foram feitas. As Tabelas 3 e 4 mostram os números e as porcentagens relativas de conídios viáveis das linhagens MSE bnc e proA1 pabaA6 yA2 e, na Figura 3 são apresentadas as curvas de sobrevivência das duas linhagens.

Tabela 3. Número de conídios viáveis e respectivas porcentagens de sobrevivência à luz UV para a linhagem MSE bnc.

Fluxo de energia J/(m ² .s)	Número de conídios viáveis/ml		Porcentagem de sobrevivência	
	1a. repetição	2a. repetição	1a. repetição	2a. repetição
0	9,35 x 10 ⁵	8,20 x 10 ⁵	100,00	100,00
93,6	3,89 x 10 ⁵	3,90 x 10 ⁵	41,60	47,56
187,2	5,41 x 10 ⁴	6,35 x 10 ⁴	5,78	7,74
280,8	1,03 x 10 ⁴	1,41 x 10 ⁴	1,10	1,72
374,4	3,20 x 10 ³	2,80 x 10 ³	0,34	0,34
468,0	1,35 x 10 ³	1,05 x 10 ³	0,14	0,12

Tabela 4. Número de conídios viáveis e respectivas porcentagens de sobrevivência à luz UV para a linhagem proA1 pabaA6 yA2.

Fluxo de energia J/(m ² .s)	Número de conídios viáveis/ml		Porcentagem de sobrevivência	
	1a. repetição	2a. repetição	1a. repetição	2a. repetição
0	8,16 x 10 ⁶	7,14 x 10 ⁶	100,00	100,00
93,6	5,00 x 10 ⁶	4,18 x 10 ⁶	61,27	58,54
187,2	1,08 x 10 ⁶	1,00 x 10 ⁶	13,23	14,00
280,8	7,50 x 10 ⁵	6,00 x 10 ⁵	9,19	8,40
374,4	2,00 x 10 ⁵	1,80 x 10 ⁵	2,45	2,52
468,0	1,85 x 10 ⁴	4,20 x 10 ⁴	0,22	0,59

FIGURA 3.. Curvas de sobrevivência à luz ultra-violeta das linhagens MSE bnc e proA1 pabaA6 yA2.

4.2. Descrição dos mutantes obtidos

Após o tratamento das duas linhagens com luz ultra-violeta, os mutantes foram identificados e isolados através de inspeção visual, baseando-se inicialmente na coloração da colônia. A análise citológica foi efetuada em seguida, selecionando-se unicamente os mutantes que além da coloração alterada apresentavam modificações no processo de formação dos conídios. Dessa análise foram obtidos 11 mutantes, sendo 5 mutantes provenientes da linhagem MSE bnc e designados como MSE 1, MSE 2, MSE 3, MSE 4 e MSE 5 e, 6 mutantes derivados da linhagem proA1 pabaA6 yA2 e designados como PRO 1, PRO 2, PRO 3, PRO 4, PRO 5 e PRO 6.

Quanto à coloração, os mutantes diferiram muito entre si. Os mutantes das duas linhagens apresentaram tonalidades que vão do branco ao marrom claro. As medidas de crescimento das colônias mutantes são semelhantes às das linhagens originais. A conidiação dos mutantes, em relação às linhagens originais apresentou valores semelhantes, superiores e inferiores conforme o mutante considerado.

As Tabelas 5 e 6 apresentam a descrição das principais características dos mutantes das linhagens MSE bnc e proA1 pabaA6 yA2. As Figuras 4 a 7 mostram as linhagens originais e os mutantes.

As alterações na estrutura conidial foram verificadas nas dimensões do pedúnculo, vesícula, conjunto de esterigmas primários e secundários, conídios e núcleos.

Tabela 5. Descrição dos mutantes derivados da linhagem MSE bnc.

Mutantes	M o r f o l o g i a
MSE 1	Micélio branco, colônia de tamanho grande, bordo regular, conídios cinza claros.
MSE 2	Micélio branco cotonoso, colônia de tamanho grande, bordo regular, conídios brancos.
MSE 3	Micélio rosa, colônia de tamanho grande, bordo regular, conídios brancos.
MSE 4	Micélio bege com setores mais claros, colônias de tamanho grande, bordo regular, conídios brancos.
MSE 5	Micélio marrom claro com tons rosa, colônia de tamanho grande, bordo regular, conídios marrons.

Tabela 6. Descrição dos mutantes derivados da linhagem proA1 pabaA6 yA2.

Mutantes	M o r f o l o g i a
PRO 1	Micélio marrom claro, colônia de tamanho grande, bordo regular, conídios amarelo-esverdeados.
PRO 2	Micélio branco com tons rosa, colônia de tamanho grande, bordo regular, conídios ocrês.
PRO 3	Micélio branco, colônia de tamanho grande, bordo regular, conídios brancos.
PRO 4	Micélio branco acinzentado, colônia de tamanho grande, bordo regular, conídios amarelos.
PRO 5	Micélio bege, colônia de tamanho grande, bordo regular, conídios beges.
PRO 6	Micélio amarelo, colônia de tamanho grande, bordo regular, conídios brancos.

Figura 4. Linhagem MSE bnc original e mutantes (A).
Plano superior, à esquerda: MSE bnc original; à direita: mutante MSE 1.
Plano inferior: mutantes MSE 2 e MSE 3.

Figura 5. Linhagem MSE bnc original e mutantes (B).
Plano superior: MSE bnc original.
Plano inferior, à direita: mutante MSE 4; a esquerda: mutante MSE 5.

Figura 6. Linhagem proA1 pabaA6 yA2 original e mutantes (C).
Plano superior, à esquerda: proA1 pabaA6 original: à direita; mutante PRO 1.
Plano inferior: mutantes PRO 2 e PRO 3.

Figura 7. Linhagem proA1 pabaA6 yA2 original e mutantes (D).
Plano superior: proA1 pabaA6 yA2 original e mutante PRO 4.
Plano inferior: mutantes PRO 5 e PRO 6.

4.3. Taxa de crescimento

As medidas dos diâmetros das colônias das linhagens originais e de seus mutantes foram efetuadas com 1 a 7 dias após a inoculação. As Tabelas 7 e 8 apresentam os diâmetros das colônias das linhagens originais e de seus mutantes. A análise da variância para o diâmetro das colônias é mostrada na Tabela 9.

Tabela 7. Diâmetros (média de 4 colônias) da linhagem MSE bnc e seus mutantes, com 1 a 7 dias de crescimento.

Mutantes	Dias (diâmetro das colônias em cm)						
	1	2	3	* 4	5	6	7
MSE 1	1,10	3,15	4,85	6,40b	7,65	8,65	8,65
MSE 2	1,10	3,00	4,95	6,55b	7,85	8,65	8,65
MSE 3	1,05	2,85	5,50	7,25a	8,45	8,90	8,90
MSE 4	1,15	3,05	5,50	7,25a	8,35	9,00	9,00
MSE 5	1,00	2,90	5,65	7,50a	8,60	9,00	9,00
<u>MSE bnc</u>	1,00	3,05	5,75	7,50a	8,80	9,00	9,00

* A análise de variância foi feita com 4 dias de crescimento. TUKEY (1%) = 0,7567.

Tabela 8. Diâmetros (média de 4 colônias) da linhagem proA1 pabaA6 yA2 e seus mutantes, com 1 a 7 dias de crescimento

Mutantes	Dias (diâmetro das colônias em cm)						
	1	2	3	*4	5	6	7
PRO 1	1,15	3,05	5,30	6,95ab	8,00	8,15	8,50
PRO 2	1,10	3,15	5,45	7,30a	8,35	9,00	9,00
PRO 3	1,10	3,15	4,80	6,35b	7,55	8,35	8,35
PRO 4	1,05	3,10	5,30	7,30a	9,00	9,00	9,00
PRO 5	1,20	3,25	5,65	7,50a	8,55	8,65	8,80
PRO 6	1,10	3,10	4,90	6,50b	7,80	8,45	8,45
<u>proA1 pabaA6 yA2</u>	1,15	3,10	5,05	6,65b	8,05	8,45	8,45

* A análise de variância foi feita com 4 dias de crescimento.
TUKEY (1%) = 0,7567.

Tabela 9. Análise da variância para diâmetro médio das colônias das linhagens originais e respectivos mutantes, com 4 dias de crescimento

Fonte de Variação	GL	QM	F
Entre tratamentos	12	0,8433	12,6145 **
Mutantes G ₁	4	1,0145	15,1737 **
Mutantes G ₂	5	0,8826	13,2019 **
Linhagens originais	1	1,6200	24,2301 **
Entre grupos	2	0,0147	0,2201 n.s.
Resíduo	39	0,0668	
Total	51		

Média = 7,01

Coefficiente de Variação Experimental = 3,6886%

** = Significativo a nível de 1% de probabilidade

n.s. = Não significativo

4.4. Taxa de conidiação

A capacidade de conidiação dos mutantes e das linhagens originais foi analisada após contagem dos conídios em área determinada. As Tabelas 10 e 11 mostram a taxa de conidiação das linhagens MSE bnc e proA1 pabaA6 yA2 e de seus mutantes. A Tabela 12 apresenta a análise da variância para o número de conídios das duas linhagens e de seus mutantes.

Tabela 10. Número de conídios (média de 3 repetições) da linhagem MSE bnc e seus mutantes

Mutantes	Número de conídios
	(x 10 ⁴ /ml)
MSE 1	709,75a
MSE 2	284,75de
MSE 3	195,25e
MSE 4	565,25ab
MSE 5	369,75cd
<u>MSE bnc</u>	505,75bc

TUKEY (1%) = 191,7465

Tabela 11. Número de conídios (média de 3 repetições) de linhagem proA1 pabaA6 yA2 e seus mutantes

Mutantes	Número de conídios
	(x 10 ⁴ /ml)
PRO 1	573,75a
PRO 2	289,00de
PRO 3	191,25e
PRO 4	412,25bc
PRO 5	238,00e
PRO 6	505,75ab
<u>proA1 pabaA6 yA2</u>	382,50cd

TUKEY (1%) = 191,7465

Tabela 12. Análise da variância para o número de conídios das linhagens originais e respectivos mutantes

Fonte de variação	GL	QM	F
Entre tratamentos	12	79038,0268	26,8454 **
Mutantes G ₁	4	133583,0255	45,3717 **
Mutantes G ₂	5	70588,2504	23,9754 **
Linhagens originais	1	22785,8438	7,7392 **
Entre grupos	2	19198,5621	6,5208 **
Resíduo	26	2944,1876	
Total	259		

Média = 401,4615

Coeficiente de Variação Experimental = 13,5157%

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade

4.5. Características citológicas dos mutantes.

4.5.1. Linhagem MSE bnc

As alterações na estrutura conidial foram detectadas através da análise microscópica. A linhagem MSE bcn original e seus mutantes apresentaram as seguintes características citológicas:

MSE bcn original: Hifas transparentes, muito finas; estruturas conidias escuras e normais, apresentando célula podal, pedúnculo, vesícula, conjunto de esterigmas e conídios. Conídios brancos, e em sua maioria, uninucleados.

Mutante MSE 1 : Hifas e estrutura conidiais transparentes, células hifais normais, em comprimento e morfologia, estrutura conidial incompleta não apresentando célula podal, os conidióforos surgem de qualquer ponto das hifas e formam ramos; pedúnculo, vesícula e esterigmas primários e secundários presentes; o comprimento do pedúnculo é significantemente menor que na linhagem normal, o conjunto de esterigmas apresenta comprimento bem maior; o número de conídios é maior que na linhagem normal, sendo, em sua maioria, uninucleados.

Mutante MSE 2 : Hifas e estruturas conidiais transparentes, células hifais de comprimento e morfologia normais, estrutura conidial completa e apresentando célula podal, pedúnculo, vesícula, esterigmas primários e secundários; o comprimento do pedúnculo é maior que na linhagem normal, a vesícula é menos distinta por possuir comprimento e largura menores que na linhagem normal; o número de conídios é menor que na linhagem normal, sendo, em sua maioria, uninucleados.

Mutante MSE 3 : Hifas e estruturas conidiais transparentes, células hifais de comprimento e morfologia normais, porém com aspecto mais frágil por possuírem largura menor, presença de número pequeno de conidióforos com estrutura conidial completa, isto é, célula podal, pedúnculo, vesícula, esterigmas

primários e secundários, sendo todos esses componentes menores que na linhagem normal tanto em comprimento como em largura; conídios, em sua maioria, uninucleados, e em número bem inferior ao da linhagem normal.

Mutante MSE 4 : Hifas e estruturas conidiais transparentes, células hifais de comprimento e morfologia normais, estrutura conidial completa apresentando célula podal, pedúnculo, vesícula, esterigmas primários e secundários; o comprimento do pedúnculo é menor que na linhagem normal, os esterigmas primários e secundários se apresentam mais separados entre si e com comprimentos irregulares e, geralmente, menores que na linhagem normal; o número de conídios é maior e são, em sua maioria, uninucleados.

Mutante MSE 5 : Hifas e estruturas conidiais transparentes, células hifais de comprimento e morfologia normais, estrutura conidial completa apresentando célula podal, pedúnculo, vesícula, esterigmas primários e secundários; o comprimento do pedúnculo é menor que na linhagem normal, o conjunto de esterigmas tem comprimento e largura inferiores aos da linhagem normal; o número de conídios é menor que na linhagem normal, sendo, em sua maioria, uninucleados.

A análise métrica da estrutura conidial foi efetuada no pedúnculo, vesícula e conjunto de esterigmas primários e secundários. Especificamente para a linhagem MSE bnc e seus mutantes foram feitas medidas dos diâmetros de conídios binucleados e seus núcleos, além das medidas efetuadas em conídios uninucleados. Todas as medidas acima relacionadas estão apresentadas na Tabela 13. A análise da variância para as mesmas medidas é mostrada na Tabela 15.

Tabela 13. Valores médios (20 medições) dos comprimentos do pedúnculo, vesícula e conjunto de esterigmas; larguras do pedúnculo, vesícula e conjunto de esterigmas; diâmetros dos conídios uninucleados e binucleados e respectivos núcleos da linhagem MSE bnc e seus mutantes.

Mutantes	Comprimento (μm)			Largura (μm)			Diâmetro (μm)			
	*P	*V	*E	*P	*V	*E	*C		*N	
							*C ₁	*C ₂	*N ₁	*N ₂
MSE 1	32,74e	4,55c	15,09a	2,14e	6,24d	12,86a	3,45a	4,25a	1,34b	1,20c
MSE 2	107,67a	4,40cd	7,97d	2,89ab	4,65e	7,71d	3,25cd	4,10c	1,23cd	1,15d
MSE 3	52,54c	4,29d	7,54e	2,28d	4,63e	7,37e	3,21d	3,95d	1,20cd	1,18c
MSE 4	57,21c	7,26a	8,28c	2,86b	7,95b	8,90c	3,30bc	4,20bc	1,24c	1,20c
MSE 5	44,99d	6,78b	6,23f	2,55c	6,84c	6,42f	3,35b	4,22ab	1,31b	1,25b
<u>MSE bnc</u>	68,91b	7,44a	9,82b	2,92a	8,33a	10,38b	3,50a	4,32a	1,41a	1,29a
TUKEY (1%)	5,7783	0,2759	0,2528	0,1266	0,2086	0,2591	0,0789	0,1220	0,0631	0,0310

* P = pedúnculo; V = vesícula; E = conjunto de esterigmas; C = conídio; N = núcleo;
C₁ = conídio uninucleado; N₁ = núcleo do conídio uninucleado; C₂ = conídio binucleado; N₂ = média dos núcleos do conídio binucleado.

4.5.2. Linhagem proA1 pabA6 yA2

A análise microscópica permitiu a detecção das seguintes características na estrutura conidial da linhagem proA1 pabA6 yA2 original e de seus mutantes:

proA1 pabA6 yA2 original: Hifas transparentes, estruturas conidiais escuras e normais, apresentando célula podal, pedúnculo, vesícula, conjunto de esterigmas e conídios. Conídios amarelos e uninucleados.

Mutante PRO 1 : Hifas e estruturas conidiais transparentes, células hifais de comprimento maior que na linhagem normal e com morfologia normal, estrutura conidial completa apresentando célula podal, pedúnculo, vesícula, esterigmas primários e secundários; o pedúnculo é oblíquo, a vesícula apresenta maior comprimento e menor largura que a linhagem normal, o conjunto de esterigmas possui dimensões menores que a linhagem normal; o número de conídios é maior que a linhagem normal e, são uninucleados.

Mutante PRO 2 : Hifas e estruturas conidiais transparentes, células hifais de comprimento maior que a linhagem normal e com morfologia normal, estrutura conidial completa sendo que o processo de diferenciação dos conídios é mais lento que na linhagem normal (30 horas), presença de célula podal, pedúnculo, vesícula, esterigmas primários e secundários; o aspecto geral do conidióforo é mais frágil que na linhagem normal pois todas as estruturas tem dimensões inferiores às da linhagem normal; o número de conídios é menor que na linhagem normal e, são uninucleados.

Mutante PRO 3 : Hifas e estruturas conidiais transparentes, células hifais de comprimento e morfologia normais, estrutura conidial completa apresentando célula podal, pedúnculo, vesícula, esterigmas primários e secundários; o comprimento do pedúnculo é maior que na linhagem normal, as demais estruturas tem dimensões superiores às da linhagem normal e, portanto a estrutura conidial toda se apresenta mais vigorosa que

na linhagem normal; o número de conídios é menor e, são uninucleados.

Mutante PRO 4 : Hifas e estruturas conidiais transparentes, células hifais de comprimento maior que na linhagem normal e com morfologia normal, estrutura conidial completa apresentando célula podal, pedúnculo, vesícula, esterigmas primários e secundários; todas as estruturas tem dimensões menores que a linhagem normal e principalmente a vesícula que apresenta largura inferior à da linhagem normal, o pedúnculo é oblíquo; o número de conídios é semelhante ao da linhagem normal e, são uninucleados.

Mutante PRO 5 : Hifas e estruturas conidiais transparentes, células hifais de comprimento e morfologia normais, estrutura conidial completa apresentando célula podal, pedúnculo, vesícula, esterigmas primários e secundários; todas as estruturas tem dimensões menores que na linhagem normal, o conjunto de esterigmas primários e secundários aparece com espaços indicando um número menor de esterigmas que a linhagem normal; o número de conídios é menor que na linhagem normal e, são uninucleados.

Mutante PRO 6 : Hifas transparentes e estruturas conidiais mais escuras, células hifais de comprimento e morfologia normais, estrutura conidial incompleta não apresentando célula podal, os conidióforos surgem de qualquer ponto, próximos e em grande número formando "árvores" de conidióforos que possuem pedúnculo, vesícula, esterigmas primários e secundários; todas as estruturas possuem dimensões semelhantes às da linhagem normal; o número de conídios é superior ao da linhagem normal e, são uninucleados.

Foram efetuadas medições do comprimento e largura do pedúnculo, vesícula e conjunto de esterigmas. O diâmetro do conídio e núcleo foi medido somente em conídios uninucleados porque a porcentagem de conídios binucleados é baixa. As medidas da estrutura conidial da linhagem proA1 pabaA6 yA2 e seus mutantes estão apresentadas na Tabela 14. A análise da variância para as mesmas medidas é mostrada na Tabela 15.

4.6. Análise genética dos mutantes

4.6.1. Linhagem MSE bnc

As análises genéticas mitóticas e meióticas dos mutantes provenientes da linhagem MSE bnc são apresentadas nas Tabelas 16 , 17 , 18 , 19 , 20 , 21 , 22 e 23, exceto para o mutante MSE 1 , onde somente foi feita a análise mitótica devido à ausência de cleistotécios híbridos. O número de segregantes meióticos de todos os cruzamentos realizados envolvendo os mutantes derivados da linhagem MSE bnc, exceto MSE 1 e, a análise estatística do grau de significância de cada resultado, são mostrados na Tabela 24.

A Tabela 25 apresenta os grupos e valores de ligação dos cinco mutantes provenientes da linhagem MSE bnc.

Tabela 14. Valores médios (20 medições) dos comprimentos do pedúnculo; vesícula e conjunto de esterigmas; larguras do pedúnculo, vesícula e conjunto de esterigmas; diâmetros dos conídios e núcleos (conídios uninucleados) da linhagem proA1 pabaA6 yA2 e seus mutantes.

Mutantes	Comprimento(µm)			Largura (µm)			Diâmetro (µm)		
	*P	*V	*E	*P	*V	*E	*C	*N	
PRO 1	71,23b	8,15b	6,81f	3,00c	3,64f	6,93f	2,99b	1,50bcd	
PRO 2	45,96f	6,87d	7,74e	2,46e	6,37e	7,88e	2,50c	1,27e	
PRO 3	109,21a	8,59a	11,61a	3,64a	9,81a	12,74a	3,09a	1,48abc	
PRO 4	53,86e	5,79f	8,60d	2,40f	5,49e	9,32d	3,05ab	1,40d	
PRO 5	59,25d	6,22e	8,60d	2,78d	6,48d	9,12d	2,99b	1,49ab	
PRO 6	66,10c	7,44c	9,24c	2,91c	7,94c	9,88c	3,05ab	1,45bcd	
<u>proA1 pabaA6 yA2</u>	71,81b	8,12b	9,89b	3,22b	8,52b	10,81b	3,09a	1,51a	
TUKEY (1%)	5,7783	0,2759	0,2528	0,1266	0,2086	0,2591	0,0789	0,0631	

*P=pedúnculo; V = vesícula; E = conjunto de esterigmas; C = conídio; N = núcleo.

TABELA 15. Valores e significâncias dos quadrados médios calculados segundo o delineamento em blocos inteiramente casualizados, para dez características das linhagens MSE bnc e proA1 pabaA6 yA2 e seus mutantes.

Características	Entre tratamentos (gl ₁)	Grupo 1 (gl ₂)	Grupo 2 (gl ₃)	Linhagens originais (gl ₄)	Entre grupos (gl ₅)	Resíduo (gl ₆)	Média	CV _e (%)
Comprimento do pedúnculo	10087,9001**	16498,0547**	9894,5326**	83,4978**	2753,2106**	22,7079	64,7311	7,3616
Largura do pedúnculo	3,3150**	2,2225**	4,0572**	0,9060**	4,8491**	0,0109	2,7751	3,7644
Comprimento da vesícula	42,9422**	41,5681**	23,7275**	4,6158**	112,8905**	0,0517	6,6104	3,4425
Largura da vesícula	64,0353**	41,2605**	88,4962**	0,3661**	80,2674**	0,0296	6,6876	2,5728
Comprimento dos esterigmas	106,8183**	245,5823**	52,8051**	0,0288n.s.	17,7181**	0,0434	9,0316	2,3083
Largura dos esterigmas	84,3019**	126,2403**	79,2646**	1,8305**	54,2540**	0,0456	9,2565	2,3092
Diâmetro do conídio uninucleado	1,3091**	0,1726**	0,9871**	1,6353**	4,2237**	0,0042	3,1406	2,0721
Diâmetro do núcleo	0,2315**	0,0684**	0,1274**	0,0972**	0,8852**	0,0027	1,3686	3,8069
ψDiâmetro do conídio binucleado	0,5932**	---	---	---	---	0,0125	4,1733	2,6790
ψDiâmetro do núcleo	0,0507**	---	---	---	---	0,0080	1,2116	2,3475

ψ Valores obtidos somente para a linhagem MSE bnc e mutantes; os graus de liberdade calculados são: gl₁ = 5 e gl₆ = 114.

gl₁ = 12, gl₂ = 4, gl₃ = 5, gl₄ = 1, gl₅ = 2 e gl₆ = 26.

Grupo 1 = mutantes MSE 1, MSE 2, MSE 3, MSE 4, MSE 5.

Grupo 2 = mutantes PRO 1, PRO 2, PRO 3, PRO 4, PRO 5 e PRO 6.

Linhagens originais = linhagem MSE bnc e linhagem proA1 pabaA6 yA2.

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

n.s. = não significativo.

CV = Coeficiente de Variação Experimental.

Tabela 16. Análise mitótica do mutante MSE 1

Haplóides mutante MSE 1// <u>proA1 pabaA6 yA2</u>			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		normais	morfológicos
I	pro ⁺ paba ⁺	32	22
	pro paba	20	18
II	w ⁺	30	20
	w	22	20
III	gal ⁺	20	18
	gal	32	22
IV	pyro ⁺	20	30
	pyro	32	10
V	fac ⁺	48	40
	fac	04	0
VI	s ⁺	14	20
	s	38	20
VII	nic ⁺	18	20
	nic	34	20
VIII	ribo ⁺	30	30
	ribo	22	10

Tabela 17. Análise mitótica do mutante MSE 2

Haplóides mutante MSE 2 // <u>proal pabaA6 yA2</u>			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		normais	morfológicos
I	pro ⁺ paba ⁺	20	05
	pro paba	12	0
II	w ⁺	30	03
	w	02	02
III	gal ⁺	32	0
	gal	0	05
IV	pyro ⁺	23	04
	pyro	09	01
V	fac ⁺	19	05
	fac	13	0
VI	s ⁺	15	05
	s	17	0
VII	nic ⁺	20	05
	nic	12	0
VIII	ribo ⁺	21	02
	ribo	11	03

Tabela 18. Análise meiótica do mutante MSE 2

Mutante MSE 2 x <u>proAl pabaA6 yA2</u>				
Grupo de ligação	Marcador	Colônias		Valor de recombinação
		normais	morfológicas	
III	gal ⁺	46	12	33,67%
	gal	21	19	

Tabela 19. Análise mitótica do mutante MSE 3

Haplóides mutante MSE 3// <u>proA1 pabaA6 yA2</u>		
Grupos de ligação	Marcadores	Setores normais
I	pro ⁺ paba ⁺	10
	pro paba	14
II	w ⁺	12
	w	12
III	gal ⁺	14
	gal	10
IV	pyro ⁺	13
	pyro	11
V	fac ⁺	09
	fac	15
VI	s ⁺	10
	s	14
VII	nic ⁺	20
	nic	04
VIII	ribo ⁺	11
	ribo	13

Tabela 20. Análise meiótica do mutante MSE 3

Mutante MSE 3// <u>proA1 pabaA6 yA2</u>				
Grupo de ligação	Marcador	Colônias		Valor de recombinação
		normais	morfológicas	
VII	nic ⁺	34	08	30,61%
	nic	07	0	

Tabela 21. Análise mitótica do mutante MSE 4

Haplóides mutante MSE 4// <u>proA1 paba^Δ6 yA2</u>			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		normais	morfológicos
I	pro ⁺ paba ⁺	01	04
	pro paba	30	0
II	w ⁺	27	02
	w	04	02
III	gal ⁺	22	03
	gal	09	01
IV	pyro ⁺	21	01
	pyro	10	03
V	fac ⁺	20	03
	fac	11	01
VI	s ⁺	16	02
	s	15	02
VII	nic ⁺	12	01
	nic	19	03
VIII	ribo ⁺	18	04
	ribo	13	0

Tabela 22. Análise mitótica do mutante MSE 5

Haplóides mutante MSE 5// <u>proA1 pabaA6 yA2</u>			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		normais	morfológicos
I	pro ⁺ paba ⁺	18	05
	pro paba	10	0
II	w ⁺	20	04
	w	08	01
III	gal ⁺	18	03
	gal	10	02
IV	pyro ⁺	16	01
	pyro	12	04
V	fac ⁺	10	05
	fac	18	0
VI	s ⁺	14	04
	s	14	01
VII	nic ⁺	17	03
	nic	14	02
VIII	ribo ⁺	28	0
	ribo	0	05

Tabela 23. Análise meiótica do mutante MSE 5

Mutante MSE 5 x <u>proA1 pabaA6 yA2</u>				
Grupo de ligação	Marcador	Colônias		Valor de recombinação
		normais	morfológicas	
VIII	ribo ⁺	34	10	30,77%
	ribo	14	20	

Tabela 24. Segregação meiôtica dos cruzamentos envolvendo os
mutantes "MSE" x linhagem proAl pabaA6 yA2

Cruzamentos	Segregantes		Total	Proporção esperada	X ²
	normais	morfoló- gicos			
MSE 2 x <u>proAl pabaA6 yA2</u>	484	430	914	1 : 1	3,19 n.s.
MSE 3 x <u>proAl pabaA6 yA2</u>	500	448	948	1 : 1	2,85 n.s.
MSE 4 x <u>proAl pabaA6 yA2</u>	429	401	830	1 : 1	0,94 n.s.
MSE 5 x <u>proAl pabaA6 yA2</u>	494	438	752	1 : 1	1,36 n.s.

n.s. = Não significativo

Tabela 25. Grupos e valores da ligação dos mutantes
provenientes da linhagem MSE bnc

Mutantes	Grupos de ligação	Marcadores	Valores de ligação
MSE 1	V	fac	---
MSE 2	III	gal	33,67%
MSE 3	VII	nic	30,61%
MSE 4	I	pro paba	---
MSE 5	VIII	ribo	33,77%

4.6.2. Linhagem proA1 pabaA6 yA2

As análises genéticas mitóticas e meióticas dos mutantes provenientes da linhagem proA1 pabaA6 yA2 estão nas Tabelas 27, 28, 29, 30, 30 e 32. Para os mutantes PRO 1, PRO 2 e PRO 3 não foi possível efetuar a análise meiótica devido à ausência de cleistotécios híbridos. Os segregantes meióticos de todos os cruzamentos envolvendo os mutantes provenientes da linhagem proA1 pabaA6 yA2, exceto PRO 1, PRO 2 e PRO 3 e, a análise estatística estão apresentados na Tabela 33.

Tabela 26. Análise mitótica do mutante PRO 1

Haplóides mutante PRO 1// <u>MSE bnc</u>			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		normais	morfológicos
I	pro ⁺ paba ⁺	22	0
	pro paba	0	02
II	w ⁺	10	0
	w	12	02
III	gal ⁺	12	0
	gal	10	02
IV	pyro ⁺	10	02
	pyro	12	0
V	fac ⁺	12	01
	fac	10	01
VI	s ⁺	10	0
	s	12	02
VII	nic ⁺	10	02
	nic	12	0
VIII	ribo ⁺	12	02
	ribo	10	0

Tabela 27. Análise mitótica do mutante PRO 2

Haplóides mutante PRO 2// <u>MSE bnc</u>			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		normais	morfológicos
I	pro ⁺ paba ⁺	20	15
	pro paba	03	01
II	w ⁺	13	10
	w	10	06
III	gal ⁺	03	07
	gal	20	09
IV	pyro ⁺	13	10
	pyro	10	06
V	fac ⁺	13	12
	fac	10	04
VI	s ⁺	10	08
	s	13	08
VII	nic ⁺	0	16
	nic	23	0
VIII	ribo ⁺	09	10
	ribo	14	06

Tabela 28. Análise mitótica do mutante PRO 3

Haplóides mutante PRO 3// <u>MSE bnc</u>			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		normais	morfológicos
I	pro ⁺ paba ⁺	13	07
	pro paba	18	03
II	w ⁺	12	10
	w	19	0
III	gal ⁺	20	09
	gal	11	01
IV	pyro ⁺	31	0
	pyro	0	10
V	fac ⁺	20	08
	fac	11	02
VI	s ⁺	15	10
	s	16	0
VII	nic ⁺	18	05
	nic	13	05
VIII	ribo ⁺	19	10
	ribo	12	0

Tabela 29. Análise mitótica do mutante PRO 4

Haplóides mutante PRO 4// <u>MSE bnc</u>			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		normais	morfológicos
I	pro ⁺ paba ⁺	38	10
	pro paba	05	0
II	w ⁺	31	07
	w	12	03
III	gal ⁺	18	10
	gal	25	0
IV	pyro ⁺	33	0
	pyro	10	10
V	fac ⁺	31	10
	fac	12	0
VI	s ⁺	23	02
	s	20	08
VII	nic ⁺	29	07
	nic	14	03
VIII	ribo ⁺	20	09
	ribo	23	01

Tabela 30. Análise mitótica do mutante PRO 5

Haplóides mutante PRO 5// <u>MSE bnc</u>		
Grupos de ligação	Marcadores	Setores normais
I	pro ⁺ paba ⁺	32
	pro paba	05
II	w ⁺	17
	w	20
III	gal ⁺	17
	gal	20
IV	pyro ⁺	24
	pyro	13
V	fac ⁺	20
	fac	17
VI	s ⁺	22
	s	15
VII	nic ⁺	18
	nic	19
VIII	ribo ⁺	20
	ribo	17

Tabela 31. Análise mitótica do mutante PRO 6

Haplóides mutante PRO 6// <u>MSE bnc</u>			
Grupos de ligação	Marcadores	Setores	
		normais	morfológicos
I	pro ⁺ paba ⁺	13	06
	pro paba	10	0
II	w ⁺	14	05
	w	09	01
III	gal ⁺	10	02
	gal	13	04
IV	pyro ⁺	17	06
	pyro	06	0
V	fac ⁺	20	02
	fac	03	04
VI	s ⁺	20	01
	s	03	05
VII	nic ⁺	11	03
	nic	12	03
VIII	ribo ⁺	12	0
	ribo	11	06

Tabela 32. Análise meiótica do mutante PRO 6

Mutante PRO 6 x <u>MSE bnc</u>				
Grupo de ligação	Marcador	Colônias		Valor de recombinação
		normais	morfológicas	
V	fac ⁺	27	08	29,41%
	fac	12	21	

Tabela 33. Segregação meiôtica dos cruzamentos envolvendo os mutantes "PRO" x linhagens MSE bnc.

Cruzamentos	Segregantes		Total	Proporção esperada	χ^2
	normais	morfol ^o gicos			
PRO 4 x <u>MSE bnc</u>	392	360	752	1 : 1	1,36 n.s.
PRO 5 x <u>MSE bnc</u>	491	467	958	1 : 1	0,57 n.s.
PRO 6 x <u>MSE bnc</u>	400	356	756	1 : 1	2,56 n.s.

n.s. = Não significativo

Tabela 34. Grupos de ligação dos mutantes provenientes da linhagem proA1 pabaA6 yA2

Mutantes	Grupos de ligação	Marcadores
PRO 1	I	pro paba
PRO 2	VII	nic
PRO 3	IV	pyro
PRO 4	I	pro paba
PRO 5	I	pro paba
PRO 6	V ou VI	fac ou s

5. DISCUSSÃO

5.1. Ação da luz ultra-violeta e características gerais dos mutantes

O tratamento com luz ultra-violeta foi bastante eficiente na obtenção de mutantes com morfologia e estrutura conidial alterada, para ambas as linhagens utilizadas neste estudo. Em termos de sobrevivência (Tabelas 3 e 4, Figura 3), a linhagem MSE bnc mostrou menor resistência que a linhagem proA1 pabaA6 yA2, em todas as intensidades de fluxo de energia utilizadas, indicando, dessa maneira, que o grau de pigmentação dos conídios prevaleceu sobre a condição binucleada da linhagem MSE bnc. CURTIS (1970), MENEZES *et alii* (1973) e BIAGI (1977), verificaram que conídios mais pigmentados são mais resistentes à luz ultra-violeta do que os menos pigmentados ou brancos, enquanto que PIZZIRANI (1981), em estudos feitos com duas linhagens, cujos conídios tinham a mesma pigmentação, verificou que a linhagem que possuía conídios com mais de um núcleo foi mais resistente à irradiação ultra-violeta que a linhagem uninucleada. A diferença de sobrevivência dependente da pigmentação do conídio tem sido observada em várias linhagens de *Aspergillus* e é explicado que as moléculas dos pigmentos podem proteger parcialmente a célula da luz ultra-violeta incidente (Lanier *et alii*; Tuveson e Lennox, citados por WRIGHT e PATEMAN, 1970).

O isolamento dos mutantes foi efetuado sem que fosse observado limite de sobrevivência e independentemente do tratamento utilizado. Os mutantes da linhagem MSE bnc foram selecionados dos tratamentos de 3 a 4 minutos e os mutantes da linhagem proA1 pabaA6 yA2 foram isolados do tratamento de 3 minutos, isto porque estes tratamentos proporcionaram maior número de mutantes morfológicos. Entre os mutantes morfológicos isolados e analisados citologicamente, alguns não apresentavam alterações na estrutura conidial e por isso não foram incluídos neste trabalho.

As alterações provocadas pela luz ultra-violeta foram detectadas na coloração do micélio e dos conídios, nível de crescimento das colônias, taxa de conidiação e estrutura conidial, sendo estas modificações maiores ou menores de acordo com a característica considerada e conforme o mutante analisado.

Os mutantes apresentaram variações na cor do micélio e dos conídios e, no caso do mutante MSE 2, o micélio tem aspecto mais cotonoso que os demais mutantes (Tabelas 5 e 6, Figuras 4 a 7). A taxa de crescimento das colônias não teve variação considerável, comparando-se os mutantes com as linhagens originais, os mutantes entre si e as duas linhagens originais (Tabelas 7 e 8). As análises de variância foram feitas para cada colônia nos sete dias de crescimento, em cada um dos dias para cada colônia e, do crescimento médio de cada colônia nos sete dias, totalizando 21 análises de variância. A partir destes resultados e em conjunto com o teste TUKEY, determinou-se o quarto dia de crescimento como sendo o melhor dia para a análise (Tabela 9). A linhagem MSE bnc original mostrou crescimento maior que seus mutantes e a linhagem proA1 pabaA6 yA2 mostrou crescimento intermediário ao de seus mutantes.

Quanto à taxa de conidiação (Tabelas 10 e 11), os mutantes apresentaram valores semelhantes, inferiores e superiores às linhagens originais e a análise de variância foi significativa para todos os grupos considerados (Tabela 12). O coeficiente de variação experimental foi alto (13,5157) por terem sido efetuadas somente três repetições.

Considerando-se a estrutura conidial, pode-se afirmar que os mutantes obtidos a partir das linhagens MSE bnc e proA1 pabaA6 yA2, apresentaram modificações "quantitativas", ou seja, os componentes da estrutura conidial mostraram dimensões alteradas em relação às linhagens originais, exceto no caso do mutante MSE 1 em que não se verificou a célula podal (Tabelas 13 e 14). Todos os valores das medidas do comprimento, largura e diâmetro dos componentes da estrutura conidial dos mutantes e linhagens originais mostraram significância, exceto a comparação do comprimento do conjunto de esterigmas entre as linhagens originais (Tabela 15).

As análises mitóticas e meióticas permitiram a localização das mutações ocorridas nos diferentes grupos de ligação e foram determinados os valores de ligação. Os genes determinantes das alterações ocorridas nos mutantes da linhagem MSE bnc foram localizados nos grupos de ligação I (MSE 4), III (MSE 2), V (MSE 1), VII (MSE 3) e VIII (MSE 5) e os da linhagem proA1 pabaA6 yA2 estão nos grupos de ligação I (PRO 1, PRO 4 e PRO 5), IV (PRO 3), V (PRO 6) e VII (PRO 2). A segregação meiótica verificada foi de 1:1, demonstrando que um único gene é responsável pelas alterações observadas nos mutantes das duas linhagens.

5.2. Aspectos citológicos dos mutantes

As hifas de todos os mutantes analisados apresentaram-se transparentes e a morfologia não mostrou diferenças em relação às linhagens originais. O comprimento da célula hifal foi maior que a linhagem normal nos mutantes PRO 1 PRO 2 e PRO 4, possivelmente devido a falhas no processo de septação ou alterações em enzimas de crescimento. Mutantes "sep" são descritos por MORRIS (1976), onde a septação falha totalmente e é explicada como sendo um defeito na regulação da síntese da parede celular. BIAGI (1977), verificou em alguns mutantes morfológicos, células hifais com comprimento menor que a célula hifal da linhagem normal, concluindo que pode ter havido septação frequente ou alterações em enzimas que promovem o crescimento.

A presença de estrutura conidial mais clara que as linhagens normais predominou entre os mutantes, exceto para o mutante PRO 6 que apresentou conidióforo mais escuro (marrom). Analogamente aos mutantes "ivory" (CLUTTERBUCK, 1969c, 1973, 1977; OLIVER, 1972); "yellow-green" (CLUTTERBUCK, 1972), variantes 1, 2, 3, 4, 5, 6, II e III (BIAGI, 1977) e "V₅₁" e "V₅₂" (NIFFINEGER-SOUZA, 1979), devem ter ocorrido falhas na deposição de pigmentos ou espessamento da parede da estrutura conidial, isto porque enzimas conidióforo-específicas (cresolases), estão ausentes.

A análise métrica dos componentes da estrutura conidial das linhagens originais e mutantes mostrou valores semelhantes, inferiores e superiores às linhagens normais (Tabelas 13 e 14). Em relação ao comprimento de pedúnculo, dos cinco mutantes provenientes da linhagem MSE bnc, apenas o mutante MSE 2, superou as medidas da linhagem normal e da linhagem proA1 pabaA6 ya2 somente o mutante PRO 3 foi superior. Quanto à largura do pedúnculo, as medidas da linhagem MSE bnc superaram seus mutantes e na linhagem

proA1 pabaA6 yA2, o mutante PRO 3 foi superior à linhagem normal. As dimensões de comprimento e largura da vesícula mostraram os mesmos resultados que largura do pedúnculo, isto é, somente o mutante PRO 3 foi superior. O conjunto de esterigmas apresentou comprimento e largura maiores no mutante MSE 1, em relação à linhagem MSE bnc normal e no mutante PRO 3 para a linhagem proA1 pabaA6 yA2. Comparando-se os diâmetros dos conídios e núcleos foi verificada a superioridade das linhagens normais sobre os mutantes. Especificamente para a linhagem MSE bnc, observou-se que os conídios binucleados apresentam diâmetro maior que os conídios uninucleados, comprovando resultados encontrados por PIZZIRANI (1981). Em *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*, o aumento gradativo do diâmetro dos conídios de acordo com o aumento do número de núcleos também foi verificado (ROSIM *et alii*, 1978 ; BONATELLI Jr., 1981 ; MESSIAS, 1977).

Constatou-se através dos resultados obtidos nas medições que apenas o mutante PRO 3 apresentou dimensões superiores à linhagem normal, em todos os componentes da estrutura conidial. A ausência de algum dos componentes foi observada no mutante MSE 1 em que a célula podal está ausente na maioria dos conidióforos, que surgem de qualquer ponto das hifas e de pedúnculos de outros conidióforos, formando ramificações. NIFFINEGER - SOUZA (1979), também encontrou um mutante (V_{49}) em que alguns conidióforos não apresentaram célula podal.

A análise da variância de todas as medidas dos componentes da estrutura conidial, mostrou efeito significativo para todas as comparações, exceto para comprimento do conjunto de esterigmas entre as linhagens originais (0,0288) (Tabela 15). O teste TUKEY mostrou que os mutantes diferiram significativamente dos originais e entre si. Os coeficientes de variação foram baixos, demonstrando que há pouca diversidade de valores dentro de cada tratamento. BIAGI

(1977), em medições semelhantes encontrou coeficientes bastante altos, indicando grande diversidade de valores e, NIFFI NEGER-SOUZA (1979) e OLIVEIRA (1982), em experimentos de medição de conídios e núcleos, também obtiveram coeficientes de variação altos, justificando como pouco refinamento do método de análise.

5.3. Aspectos genéticos dos mutantes

Os resultados da análise genética de todos os mutantes das linhagens MSE bnc e proA1 pabaA6 yA2, indicaram que apenas um grupo de ligação estava envolvido com as características afetadas e a análise meiótica revelou segregação de 1 normal: 1 morfológico, comprovando que um único gene é responsável pelas alterações observadas.

Considerando-se a linhagem MSE bnc, verificou-se que para o mutante MSE 1 o gene responsável pelos caracteres alterados localiza-se no grupo de ligação V (Tabela 16). A segregação e o valor de ligação não foram determinados devido à ausência de cleistotécios híbridos. O gene responsável pelas alterações presentes no mutante MSE 2, foi localizado no grupo de ligação III (Tabela 17, e através da análise meiótica o gene foi mapeado a 33,67 unidades do gene "gal A1" (Tabela 18). No mutante MSE 3, as modificações foram determinadas por um gene localizado no grupo de ligação VII (Tabela 19), a 30,61 unidades do gene "hlc B8" (Tabela 20). No entanto, os resultados obtidos não são conclusivos, uma vez que o número de segregantes analisados foi pequeno e não foi considerada a proporção 1:1 de normais: morfológicos. O gene responsável pelas alterações do mutante MSE 4 foi detectado no grupo de ligação I (Tabela 21), pela análise mitótica e através da análise meiótica não foram obtidos recombinantes entre o referido gene e os marcadores genéticos proA1 pabaA6 yA2 deste grupo de ligação sugerindo a existência de inversão cromossômica ,

sendo que já foram verificadas inversões semelhantes em *Aspergillus nidulans* por AZEVEDO e ROPER (1970) e BIAGI (1977). As alterações presentes no mutante MSE 5 são devidas a um gene do grupo de ligação VIII (Tabela 22), mapeado a 30,77 unidades do gene "ribo B2" (Tabela 23).

A análise genética dos mutantes da linhagem proA1 pabaA6 yA2 mostrou que nos mutantes PRO1, PRO 4 e PRO 5, os genes responsáveis pelas alterações estão no grupo de ligação I (Tabelas 26, 29 e 30). A análise meiótica do mutante PRO 1 não foi realizada devido à ausência de cleistotécios híbridos e, para os mutantes PRO 4 e PRO 5 não foram obtidos recombinantes, indicando provavelmente a presença de inversão cromossômica, à semelhança do mutante MSE 4, como citado anteriormente. Quanto ao mutante PRO 2, observou-se que o gene responsável localiza-se no grupo de ligação VII (Tabela 27), no entanto a não obtenção de cleistotécios híbridos impossibilitou a análise meiótica. O gene responsável pelas alterações do mutante PRO 3 foi localizado no grupo de ligação IV (Tabela 28), pela análise mitótica. Como ocorreu para os mutantes PRO 1 e PRO 2, no caso do mutante PRO 3 também não pôde ser analisada a meiose por não terem sido obtidos cleistotécios híbridos. Quanto ao mutante PRO 6, o gene responsável pelas alterações não pôde ser precisamente localizado (Tabela 31), podendo estar localizado nos grupos de ligação V ou VI. Pela análise meiótica tal gene está situado a 29,41 unidades do marcador "fac A 303" (Tabela 32).

Através da análise genética dos mutantes obtidos foi possível localizar genes responsáveis por alterações na estrutura conidial na maioria dos oito grupos de ligação de *Aspergillus nidulans*. Pelos resultados obtidos, é interessante ressaltar as mutações localizadas no grupo de ligação I, dos mutantes MSE 4, PRO 1, PRO 4 e PRO 5, onde nenhum deles foi possível obter recombinantes, provavelmente devido a aber

rações cromossômicas como inversões, com exceção do mutante PRO 1 em que cleistotécios híbridos não foram obtidos.

Quando as características citológicas destes mutantes são consideradas, pode-se verificar que são variáveis, exceto para os mutantes PRO 1 e PRO 4 que tiveram alterações semelhantes no pedúnculo e vesícula. Devido a este facto pode-se sugerir que para os mutantes do grupo de ligação I, diferentes inversões cromossômicas ou inversões com tamanhos maiores ou menores levam a modificações na estrutura conidial. Para estas mutações e outras como dos mutantes MSE 1 e PRO 6 do grupo de ligação V e, MSE e PRO 2 do grupo de ligação VII, sugere-se também um teste de alelismo para verificar se as mutações estão no mesmo gene ou em genes diferentes.

5.4. Relação entre crescimento, morfologia e conidiação

Os mutantes analisados neste estudo comprovam observações feitas anteriormente, demonstrando que mutantes para conidiação também apresentaram alterações em outros caracteres (MARTINELLI e CLUTTERBUCK, 1971; BIAGI, 1977; NIFFNER-SOUZA, 1979). As mudanças no crescimento, coloração, formação da estrutura conidial e número de conídios de um mesmo mutante provavelmente são devidas a uma mutação com efeitos pleiotrópicos.

Considerando-se a classificação feita por MARTINELLI (1972), não foram obtidos, neste estudo, mutantes asporogênicos, o que se justifica pois, segundo o autor, ocorrem com frequência muito baixa. Alguns mutantes tiveram taxas de conidiação inferiores às linhagens normais mas, comparando-se com os resultados de MARTINELLI (1972) e BIAGI (1977), não podem ser classificados como oligosporogênicos porque a densidade de conídios não é tão pequena, em relação às linhagens originais, quanto as densidades verificadas por estes dois autores.

A análise dos dados obtidos para taxa de crescimento e número de conídios permite concluir que não há correlação entre ambos. Para o mutante MSE 1, o crescimento foi menor que a linhagem original e a taxa de conidiação foi maior. No caso do mutante PRO 3, o crescimento foi semelhante à linhagem original enquanto que o número de conídios foi bem inferior. Estes resultados estão de acordo com os fornecidos por BIAGI (1977) e NIFFINEGER-SOUZA (1979). A taxa de conidiação menor, em alguns mutantes, que as linhagens originais foi acompanhada por diminuição das dimensões dos componentes da estrutura conidial entretanto, o aumento do tamanho da estrutura conidial não significou maior número de conídios (mutante PRO 3).

As mudanças observadas nas dimensões dos componentes da estrutura conidial dos mutantes analisados, indicam que muitos locos envolvidos agem somente como modificadores no processo de conidiação e concordam com os resultados de CLUTTERBUCK e MARTINELLI (1971). Alterações para os diferentes componentes da estrutura conidial foram verificadas nos mutantes analisados, tanto para os originários da linhagem MSE bnc como para os da linhagem proAl pabaA6 yA2 e de uma maneira geral, pode-se dizer que entre os onze mutantes isolados não houve um efeito marcante da condição conídios com mais de um núcleo da linhagem MSE bnc no tipo de mutante isolado, apesar desta linhagem já ser um mutante para a estrutura conidial onde mais de um núcleo é incorporado no processo de formação de conídios.

A classificação e estudos mais precisos das etapas do processo de conidiação poderiam ser realizados através de mutantes asporogênicos, cujos estágios bloqueados são bem definidos ou ainda, pode-se sugerir um estudo dos mutantes aqui isolados, objetivando reunir as mutações individuais em uma única linhagem.

6. CONCLUSÕES

O estudo da citologia e da genética da conidiação nas linhagens MSE bnc e proA1 pabaA6 yA2 originais e mutantes, permitiu as seguintes conclusões:

- a) A linhagem proA1 pabaA6 yA2 foi mais resistente a luz ultra-violeta do que a linhagem MSE bnc, mostrando que a pigmentação amarela da proA1 pabaA6 yA2 prevaleceu sobre a condição conídios brancos com mais de um núcleo da MSE bnc.
- b) Mutantes para os diferentes componentes da estrutura conidial podem ser isolados através da irradiação com luz ultra-violeta, tanto para linhagens com conídios uninucleados como para linhagens com conídios com mais de um núcleo.
- c) A análise métrica dos componentes da estrutura conidial dos onze mutantes isolados mostrou que todos apresentam suas dimensões alteradas em relação às linhagens que lhes deram origem.

- d) Foram detectadas mutações para tamanho da célula hifal (PRO 1 , PRO 2 e PRO 4) , provavelmente devido a falhas no processo de septação ou crescimento, para pigmentação do conidióforo relacionada ao processo de pigmentação pela enzima cresolase (PRO 6) ; para dimensões do pedúnculo, sendo este maior (MSE 2 e PRO 3) ou mais largo (PRO 3) ; para dimensões da vesícula (PRO 3) e do conjunto de esterigmas (MSE 1 e PRO 3) e para ausência de célula podal (MSE 1 e pro6).
- e) Mutações para a estrutura conidial podem ser localizadas nos diferentes grupos de ligação.
- f) Para cada mutante, um gene é responsável pelas alterações na estrutura conidial sendo, em todos os casos, genes de efeito pleiotrópico. Em quatro mutantes (MSE 4 , PRO 1, PRO 4 e PRO 5) , inversões cromossômicas podem estar envolvidas.

7. LITERATURA CITADA

- AINSWORTH, G.C. e A.S. SUSSMAN, 1966. The Fungi; the fungal organism. New York, London, Academic Press, v. 2. 804 p.
- ALEXOPOULOS, C.J. e C.W. MIMS, 1979. Introductory Mycology. 3a. ed. John Wiley and Sons, New York, Chichester, Brisbane e Toronto. 632 p.
- APIRION, O., 1962. A general system for the automatic selection of auxotrofs from prototrofs and vice-versa in micro-organisms. Nature, London, 195:959-961.
- AXELROD, D.E., 1972. Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *A. nidulans*. Journal of General Microbiology, 73:181-184.
- AZEVEDO, J.L., 1965. The centromere of chromosome VII of *Aspergillus nidulans*. Aspergillus News Letter, 6:7 .
- AZEVEDO, J.L., 1972. O ciclo parassexual em fungos. Revista de Microbiologia, 3:157-168.

- AZEVEDO, J.L. e J.A. ROPER, 1970. Mitotic non-conformity in *Aspergillus* successive and transposable genetic changes. Genetical Research, 16:79-93.
- AZEVEDO, J.L. e S.O.P. COSTA, 1973. Exercícios práticos de genética. São Paulo, Companhia Editora Nacional. 288 p.
- 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. Replí-cador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. Summa Phytopatologica, 2:237-241.
- AZEVEDO, J.L.; A.A. PIZZIRANI -KLEINER e M.M. DANTAS D'ARCE, 1983. Survival of haploid, diploid and disomic conidia of *Aspergillus nidulans* to a mutagenic agents. Revista de Biologia, 12:271-278.
- BAINBRIDGE, B.W., 1971. Macromolecular composition and nuclear division during spore germination in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 66:319-325.
- BALL, C. e J.L. AZEVEDO, 1964. A "fluffy" mutant in *Aspergillus nidulans*. Aspergillus News Letter, 5:9 .
- BARRATT, R.W. e L. GARNJOBST, 1949. Genetics of a colonial microconidiating mutant strain of *Neurospora crassa*. Genetics, 34:351-369.
- BIAGI, C.M.R., 1977. Mutantes morfológicos induzidos por 8-metóxipsoraleína e luz ultra-violeta em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 150 p. (Dissertação de Mestrado).

- BONATELLI Jr., 1981. Parassexualidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, ESALQ/USP, 81 p. (Tese de Doutorado).
- BULL, A.T. e B.L.A. CARTER, 1973. The isolation of tyrosinase from *Aspergillus nidulans* cell walls, its kinetics and molecular properties and some considerations of its activity in vivo. Journal of General Microbiology, 75 : 61-63.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1965. A fawn conidia mutant in *Aspergillus nidulans*. Aspergillus News Letter, 6:12.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1968. New conidial colour mutants in *Aspergillus nidulans*. Aspergillus News Letter, 9:14.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1969a. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. Genetics, 63:317-327.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1969b. Cell volume per nucleus in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 55:291-299.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1969c. The effect of morphological and spore colour mutants on a spore specific enzyme of *Aspergillus nidulans*. Heredity, 24:515.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1970a. Synchronous nuclear division and septation in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 60:133-135.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1970b. A variagated position effect in *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, 16:303-316.

- CLUTTERBUCK, A.J., 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 70:423-435.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1973a. Gene symbols in *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, 21:291-296.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1973b. Interrelations between development and pigmentation during conidiation of *Aspergillus nidulans*. Genetics, 74:50.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1975. Cyclic AMP levels during growth and conidiation. Aspergillus News Letter, 12:13-15.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1977. The genetics of conidiation in *Aspergillus nidulans*. In: Smith, J.E. e J.A. Pateman (ed.). *Genetics and Physiology of Aspergillus*. London, Academic Press, p. 305-317.
- CLUTTERBUCK, A.J. e J.A. ROPER, 1966. A direct determination of nuclear distribution in heterokaryons of *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, 7:185-194.
- COCHRAN, W.G. e G.M. COX, 1957. Experimental designs. 2a. ed., New York, John Wiley and Sons, 611 p.
- COCHRANE, V.W., 1958. Physiology of Fungi. New York, John Wiley and Sons. Inc., 524 p.
- COCHRANE, J.C.; T.A. RADO e V.W. COCHRANE, 1971. Synthesis of macromolecules and polyribosome formation in early stages of spore germination in *Fusarium solani*. Journal of General Microbiology, 65:45-55.

- COLLINGE, A.J. e A.P.J. TRINCI, 1974. Hyphal tips of wild-type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa*. Archives of microbiology, 99:353-368.
- CUNHA, P.R., 1970. A study of aspects of heterokaryosis in *Aspergillus nidulans*. Reimpresso das memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 167 p.
- CURTIS, C.R., 1970. Comparison of UV-induced delay in germination in pigmented and pigment-inhibited conidia of *Aspergillus carbonarius*. Radiation Botany, 10:125-130.
- DANTAS D'ARCE, M.M.C., 1972. Contribuição ao estudo de alterações cromossômicas numéricas em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 50 p. (Dissertação de Mestrado).
- DORN, G.L., 1967. A revised linkage map of the eight linkage groups of *Aspergillus nidulans*. Genetics, 56:619-631.
- DORN, G.L., 1970. Genetic and morphological properties of undifferentiated and invasive variants of *Aspergillus nidulans*. Genetics, 66:267-279.
- DORN, G.L.; G.M.MARTIN e D.M. PURNELL, 1967. Genetic and cytoplasmic control of undifferentiated growth in *Aspergillus nidulans*. Life Science, 6:629-633.
- ELLIOTT, C.G., 1960. The cytology of *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, 1:462-476.
- ELLZEY, J.T., 1974. Ultrastructural observations of meiosis within antheridia of *Achlya ambisexualis*. Mycologia, 66:32-47.

- ESSER, K. e R. KÜENEN, 1967. Genetics of Fungi. Berlin , Heidelberg, New York, Springer Verlag, 500 p.
- ESSER, K. e F. MEINHARDT, 1977. A common genetic control of dikaryotic and monokaryotic fruiting in the Basidiomycete *Agrocybe aegerita*. Molecular General Genetics, 155:113-115.
- FIDDY, C. e A.P.J. TRINCI, 1976. Mitosis, septation , branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 97:169-184.
- HAMILTON, I.D. e W.K. CHIA, 1975. Enzyme activity changes during cyclic AMP - induced stalk cell differentiation in p^4 , a variant of *Dictyostelium discoideum*. Journal of General Microbiology, 91:295-306.
- HAWKER, L.E. e R.J. HENDY, 1963. An electron microscope study of germination of conidia of *Botrytis cinerea*. Journal of General Microbiology, 33:43-46.
- HEAGY, F.C. e J.A. ROPER, 1962. Deoxyribonucleic acid content of haploids and diploid *Aspergillus* conidia. Nature, London, 170:713-714.
- HEATH, I.B. e A.D. GREENWOOD, 1970. The structure and formation of lomasomes. Journal of General Microbiology, 63:129-137.
- HEATH, I.B.; J.L. GAY e A.D. GREENWOOD, 1971. Cell wall formation in the Saprolegniales: Cytoplasmic vesicles underlying developing walls. Journal of General Microbiology, 65:225-232.

- HOUGHTON, J.A., 1970. A new class of slow growing non-perithecial mutants of *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, 16:285-292.
- HOUGHTON, J.A., 1971. Biochemical investigations of the slow growing non-perithecial (sgp) mutants of *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, 17:237-244.
- ISHITANI, G.; K.UCHIDA e K.IKEDA, 1956. The relation of DNA content to cell size in *Aspergillus*. Experimental Cell Research, 10:737-740.
- KÄFER, E., 1958. An 8-chromossome map of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, 9:105-145.
- KÄFER, E., 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. Genetics, 46:1581-1609.
- KÄFER, E., 1965. Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. Genetics, 52:217-232.
- KATZ, D. e R.F.ROSENBERGER, 1971. Hyphal wall synthesis in *Aspergillus nidulans*: effect of protein synthesis inhibition and osmotic shock on chitin insertion and morphogenesis. Journal of Bacteriology, 108:184-190.
- KATZ, D., D. GOLDSTEIN e R.F.ROSENBERGER, 1972. Model for branch initiation in *Aspergillus nidulans* based on measurements of growth parameters. Journal of Bacteriology, 109:1097-1100.
- KESSEL, M. e R.F. ROSENBERGER, 1968. Regulation and timing of deoxyribonucleic acid synthesis in hyphae of *Aspergillus nidulans*. Journal of Bacteriology, 95:2275-2281

- KILBEY, B.J., 1960. "Sage": A colour modifier in *Aspergillus nidulans*. Nature, London, 186:906-907.
- KILBEY, B.J., 1963. Yellow conidial mutants of *Aspergillus nidulans* strain 16643. Aspergillus News Letter, 4:16-17.
- KING, R.C., 1974. Handbook of Genetics; bacteria, bacteriophages and fungi. New York, London, Plenum Press, v. 1. 676 p.
- Mc CULLOUGH, W. e C.F. ROBERTS, 1976. Isocitrato - lyase constitutive mutants in *Aspergillus nidulans*. Heredity, 36:291.
- MACKINTOSH, M.E. e R.H. PRITCHARD, 1963. The production and replica plating of micro-colonies of *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, 4:320-322.
- MARTINELLI, S.D., 1972. Some characteristics of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. Heredity, 29:130.
- MARTINELLI, S.D., 1974. Phenotypes of double mutants and heterokaryons synthesised from conidiation mutants of *Aspergillus nidulans*. Heredity, 33:136..
- MARTINELLI, S.D., 1976. Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged culture. Transactions of the British Mycological Society, 67:121-128.
- MARTINELLI, S.D., 1978. Phenotypes of double conidiation mutants of *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 114:277-287.
- MARTINELLI, S.D. e A.J. CLUTTERBUCK, 1971. A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 69:261-268.

- MARTINELLI, S.D. e B.W. BAINBRIDGE, 1974. Phenoloxidase of *Aspergillus nidulans*. Transactions of the British Mycological Society, 63:361-370.
- MENEZES, E.M.; J.L. AZEVEDO e C. BALL, 1973. Efeito da luz ultra-violeta longa e 8-metoxipsoralen (8-MOP) em 4 linhagens de *Aspergillus nidulans*. Relatório Científico do Instituto de Genética, ESALQ/USP, Piracicaba, 7:110-112.
- MESSIAS, C.L., 1977. Parassexualidade e produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus*, Link. Piracicaba, ESALQ/USP, 75 p. (Dissertação de Mestrado).
- MORRIS, N.R., 1976. Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, 26:237-254.
- MORRIS, N.R.; R.A. FELDEN, M.A. GEALT; R.V. NARDI; G. SHEIRNEISS 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.
- NIFFINEGER - SOUZA, D.R., 1979. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 244 p. (Dissertação de Mestrado).
- OLIVE, L.S., 1953. The structure and behavior of fungus nuclei. Botanical Review, 19:439-555.
- OLIVER, P.T.D., 1972. Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 73:45-54.
- OLIVEIRA, F.M., 1982. Análise genética de setores melhorados de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 101 p. (Tese de Doutorado).

- ORR, E. e R.F. ROSENBERGER, 1976. Initial characterization of *Aspergillus nidulans* mutants blocked in the nuclear replication cycle. Journal of Bacteriology, 126:895-902.
- PAES DE BARROS, J., 1977. Análise Citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP, 81 p. (Dissertação de Mestrado).
- PIZZIRANI, A.A., 1977. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 111 p. (Dissertação de Mestrado).
- PIZZIRANI, A.A., 1981. Efeito do gene bin A₁ na formação de conídios de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ /USP, 141 p. (Tese de Doutorado).
- PONTECORVO, G.; J.A. ROPER; L.M. HEMMONS; K.D. Mc DONALD e A.W.J. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, 5:141-238.
- RAPER, K.B., 1956. *D. polycephalum* n. sp: A new cellular slime mould with coremiform fructifications. Journal of General Microbiology, 14:716-732.
- RAPER, K.B. e D. FENNELL, 1973. The Genus *Aspergillus*, R.E. Krieger Publishing Company. Huntington, New York, 686 p.
- ROANE, M.K. e R.A. PATERSON, 1974. Some aspects of morphology and development in the Chytridiales. Mycologia, 66: 147-164.
- ROBINOW, C.F. e C.E. CATEN, 1969. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. Journal of Cell Science, 5:403-431.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. Experientia, 8:14-15.

- ROPER, J.A., 1958. Nucleo-citoplasmatic interactions in *Aspergillus nidulans*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 23:141-154.
- ROSENBERGER, R.F. e M. KESSEL, 1967. Synchrony of nuclear replication in individual hyphae of *Aspergillus nidulans*. Journal of Bacteriology, 94:1464-1469.
- ROSIM, R.T.; O. GARCIA Jr. e R. BARACHO, 1978. Tamanho de conídios e núcleos em linhagens haplóides e diplóides de *Aspergillus niger*. Ciência e Cultura, 30:487-492.
- SAXENA, R.K. e U. SINHA, 1973. Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged liquid culture. Journal of General and Applied Microbiology, 19:141-146.
- STEEL, R.G.D. e J.H. TORRIE, 1960. Principles and procedures of statistics. Mc Graw-Hill Book Company, Inc., New York. 481 p.
- SUSSMAN, M., 1965. Fruity and other mutants of the cellular slime mould, *D. discoideum*: A study of development aberrations. Journal of General Microbiology, 13:295-309.
- TIMBERLAKE, W.E., 1980. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. Developmental Biology, 78(2):497-510.
- TRINCI, A.P.J., 1969. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. Journal of General Microbiology, 57: 11-24.
- TRINCI, A.P.J., 1974. A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. Journal of General Microbiology, 81:225-236.

- TRINCI, A.P.J. e A.J. COLLINGE, 1975. Hyphal wall growth in *Neurospora crassa* e *Geotrichum candidum*. Journal of General Microbiology, 91:355-361.
- UPSHALL, A., 1966. Somatically unstable mutants of *Aspergillus nidulans*. Nature, London, 209:1113-1115.
- VAN ARKEL, G.A., 1962. A new colour mutant "pale". Aspergillus News Letter, 3:4 .
- WRIGHT, P.J. e J.A. PATEMAN, 1970. Ultraviolet-light sensitive mutants of *Aspergillus nidulans*. Mutation Research, 9:579-587.
- YAGER, L.N.; M.B. KURTZ e S.P. CHAMPE, 1982. Temperature-shift analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. Developmental Biology, 93(1):92-103.
- YUILL, E., 1939. Two new *Aspergillus* mutants. In: Raper, K.B. e D.I. Fennell, 1973. The genus *Aspergillus*. R.E. Kriger Publishing Company. Hwntington, New York, 686 p.
- YUILL, E., 1950. The numbers of nuclei in conidia of *Aspergilli*. Transactions of the British Mycological Society, 33:324-331.