

203

**KATIA REGINA EVARISTO DE JESUS**

**ESTUDO DA ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM  
LINHAGENS DE *Aspergillus nidulans* SUBMETIDAS AO  
TRATAMENTO COM RNA HETERÓLOGO**

**Tese apresentada ao  
Programa de Pós-  
graduação Interunidades  
em Biotecnologia  
(USP - I. Butantan - IPT)**



*Área de concentração: Genética  
Molecular de Microrganismos*

**São Paulo  
2003**



203

**KATIA REGINA EVARISTO DE JESUS**

**ESTUDO DA ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM  
LINHAGENS DE *Aspergillus nidulans* SUBMETIDAS AO  
TRATAMENTO COM RNA HETERÓLOGO**

**Tese apresentada ao  
Programa de Pós-  
graduação Interunidades  
em Biotecnologia  
(USP - I. Butantan - IPT)**



*Área de concentração: Genética  
Molecular de Microrganismos*

**São Paulo  
2003**



Candidato(a): Katia Regina Evaristo Jesus.

Título da Tese: Estudo da alteração da expressão gênica em linhagens de *Aspergillus nidulans* submetidas ao tratamento com RNA heterólogo.

---

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 26/02/2003 considerou o(a) candidato(a):

(  ) **Aprovado(a)**

(  ) **Reprovado(a)**

1) Examinador(a)



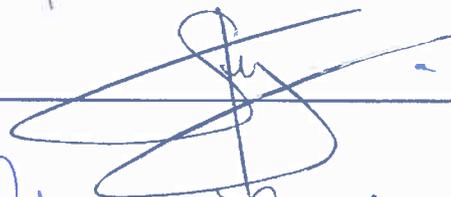
2) Examinador(a)



3) Examinador(a)

Gabriel Padilla

4) Examinador(a)



5) Presidente

Paula Lucchi

---

**KATIA REGINA EVARISTO DE JESUS**

**ESTUDO DA ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM  
LINHAGENS DE *Aspergillus nidulans* SUBMETIDAS AO  
TRATAMENTO COM RNA HETERÓLOGO**

**Tese apresentada ao  
Programa de Pós-  
graduação Interunidades  
em Biotecnologia  
(USP - I. Butantan - IPT).**

*Área de concentração: Genética  
Molecular de Microrganismos.*

*Orientadora: Tânia Maria Araújo  
Domingues Zucchi.*

**São Paulo  
2003**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

---

T-ICB  
Biotec.  
J58e  
2003

Jesus, Katia Regina Evaristo.  
Estudo da alteração da expressão gênica em linhagens de *Aspergillus nidulans* submetidas ao tratamento com RNA heterólogo / Katia Regina Evaristo Jesus. -- São Paulo, 2003.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT.

Área de concentração: Genética.

Linha de pesquisa: Genética molecular de microrganismo.

Orientador: Zucchi, Tania Maria Araújo Domingues.

Versão do título para o inglês: The study of the alteration of genetic expression in *Aspergillus nidulans* strains submitted to the heterologous RNA treatment.

Descritores: 1. *Aspergillus nidulans* 2. Expressão gênica 3. Epigenética 4. Micotoxinas 5. Proteínas extracelulares 6. Biotecnologia

ICB/SBIB/009/2003

## *Dedico esta Tese*

À minha querida mãe Catarina Evaristo  
de Jesus e ao meu pai Eli Paulo de Jesus  
pelo amor e dedicação à mim prestada.  
A quem devo tudo que sou.

Às minhas irmãs Cláudia e Paula,  
e à irmã de coração Meire, pela  
amizade, carinho e incentivo.

Aos meus sobrinhos queridos Aline,  
Bruno e Lucas.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia Maria Araújo Domingues Zucchi, pela orientação e amizade. Um exemplo de competência e companheirismo. Pessoa por quem tenho admiração e carinho.

À Embrapa Meio Ambiente, nas pessoas do Dr. Geraldo Stachetti, Dr. Paulo Kitamura e Dr.<sup>a</sup> Deise Capalbo que me possibilitaram finalizar esta tese.

À amiga e grande colaboradora Andrea Balan pelo auxílio na elaboração desta tese e constante apoio nas horas que mais precisei.

Ao amigo Patrick Spencer pelo auxílio nos experimentos desta tese, exemplo de competência e presteza.

À amiga Nanci Dezotti cuja competência e profissionalismo sempre me despertaram profunda admiração.

Aos amigos de pós-graduação do Departamento de Parasitologia ICB-USP, Karen Massini, Marlus Meilus, Vânia Dias Flauzino, Andréia Soares, Milton Roque, César Rosamiglia, Mariana Saldanha, Jean, Fernando, Tiago, Michele Mello, pela agradável convivência, companheiro e apoio.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paola Poli da Università di Parma – Itália, pelo apoio e incentivo.

Aos Docentes que participaram da Banca de Qualificação, Prof. Carlos Alberto Moreira-Filho, Prof. Walderez Gambale e Dr. Itamar Soares de Melo, pelas valiosas sugestões.

À todos aqueles que tenham contribuído direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Parasitologia do ICB-USP, onde foram realizados a maioria dos experimentos desta Tese.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) onde realizei muitos dos experimentos desta Tese e onde fui tão bem acolhida.

Ao Dr. Rolf Prade, do Oklahoma State University, pela colaboração e apoio.

Ao Dr. Ronaldo Zucchi, do Departamento de Biologia da FFCLRP/USP pelo incentivo.

Aos Profs. Dr. Gabriel Padilla Maldonado e Dr.<sup>a</sup> Elisabete José Vicente pela atenção e colaboração.

Aos colegas do Departamento de Genética do ICB-USP Paulino, Maria e Leninha pela atenção e colaboração.

À Maria Jacinta Filha Santos pelo auxílio técnico.

Às Sr.<sup>a</sup> Carminha e Eva da Biblioteca pela revisão bibliográfica e apoio.

Às secretárias do Departamento de Parasitologia do ICB-USP, Iladyr da Silva, Aparecida Félix, Wilma Garcia de Souza e Lucianna.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (USP-I.Butantan-IPT) Ângela, Eliana e Nanci.

Aos colegas da Embrapa Meio Ambiente, Marlene, Vera Castro, Neusa, Camila, Maurício, Chelida, pelo incentivo e apoio.

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo  
(FAPESP).*

## ÍNDICE

<i>Lista de Quadros</i>	<i>i</i>
<i>Lista de Quadros Latinos</i>	<i>ii</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>iii</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>v</i>
<i>Lista de Cromatogramas</i>	<i>vi</i>
<i>Lista de Gráficos</i>	<i>viii</i>
<i>Lista de Esquemas</i>	<i>ix</i>
<i>Lista de Abreviaturas</i>	<i>x</i>
<i>Resumo</i>	<i>xi</i>
<i>Abstract</i>	<i>xii</i>
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
<b>III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
<b>3.1. Tratamento com RNA</b>	<b>4</b>
<b>3.2. Características gerais do gênero <i>Aspergillus</i></b>	<b>5</b>
3.2.1. <i>Aspergillus nidulans</i> – Ciclo Sexual	6
3.2.2. <i>Aspergillus nidulans</i> – Ciclo Parassexual	6
<b>3.3. Expressão de Proteínas Heterólogas em <i>Aspergillus</i></b>	<b>7</b>
<b>3.4. Mecanismos Epigenéticos de Silenciamento Gênico</b>	<b>7</b>
3.4.1. Proteção Contra Sequências Parasitas ou Invasoras	7
3.4.1.1. Mecanismos de Silenciamento Gênico	9
3.4.2. Silenciamento Pós-transcricional em Plantas – um mecanismo de ataque ou defesa?	10
<b>3.4.3. Inativação X Instabilidade Mitótica e Meiótica</b>	<b>12</b>
<b>3.4.4. Natureza Epigenética do Silenciamento de Genes – Metilação</b>	<b>15</b>
<b>3.5 Metabolismo secundário</b>	<b>16</b>
3.5.1. Produção de micotoxina em <i>Aspergillus nidulans</i> : Esterigmatocistina	17

3.5.2. Metabolismo de glicose em <i>Aspergillus</i>	18
3.5.3. Regulação da biossíntese da glicose oxidase	18
3.5.3.1. Determinação da Atividade da Glicose Oxidase	21
<b>3.6. Relação entre o Consumo de glicose e o Peso Micelial</b>	<b>22</b>
<b>3.7. Relação entre o Consumo de Glicose e o pH do Meio de Cultura</b>	<b>22</b>
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Material</b>	<b>24</b>
4.1.1 Linhagens haplóides e linhagens tratadas	24
4.1.2 Meios de cultura e soluções	27
4.1.3. Soluções padrão	29
4.1.4 Linhagem de <i>Escherichia coli</i>	29
4.1.5 Plasmídeos	30
<b>4.2 Métodos</b>	<b>30</b>
4.2.1 Obtenção de suspensão de conídios	30
4.2.2 Viabilidade dos conídios	30
4.2.3 Análise genotípica dos protoplastos regenerados sem tratamento com RNA	31
4.2.4 Análise genotípica das linhagens tratadas e de alguns de seus setores	32
4.2.5 Análise da instabilidade mitótica das linhagens tratadas	32
4.2.6. Obtenção de heterocários obtidos a partir de conídios das linhagens tratadas e seus setores com linhagens controles UT448, UT184 e UT196	32
4.2.7. Análises dos cruzamentos meióticos	32
4.2.8. Obtenção das linhagens diplóides	33
4.2.9. Análises dos cruzamentos mitóticos	33
4.2.10 Quadrado latino para análise de dois pontos	35
4.2.11 Análise do consumo de glicose em meio completo líquido	38
4.2.12 Análise do consumo da glicose em meio completo a partir de sobrenadantes filtrados e sobrenadantes sem filtrar	38
4.2.13 Análise de proteínas	38
4.2.13.1. Dosagem de proteínas totais	38
4.2.13.2. Cromatografia de exclusão molecular	39
4.2.13.3. “Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)”	39
4.2.13.4. Cromatografia de fase reversa	39
4.2.14. Análise do teor micotoxigênico da linhagens tratadas e controle	39
4.2.14.1. Extração química da esterigmatocistina	39
4.2.14.2. Purificação da Esterigmatocistina	40
4.2.14.3. Cromatografia em camada delgada da esterigmatocistina	40

4.2.14.4. Testes confirmatórios para esterigmatocistina	41
4.2.14.5. Cromatografia de fase reversa para dosagem da esterigmatocistina	41
4.2.15. Obtenção de DNAs genômicos e plasmidiano	43
4.2.15.1. Dot blot das linhagens tratadas com RNA	43
4.2.16. Relação entre o consumo de glicose, pH do meio de cultivo e o peso micelial	43
4.2.17. Determinação da Atividade da Glicose Oxidase	43
<b>V. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>45</b>
<b>5.1 Análise genotípica dos protoplastos regenerados sem o tratamento com RNA heterólogo</b>	<b>47</b>
<b>5.2 Análise genotípica das linhagens tratadas com RNA e dos seus setores mitóticos espontâneos</b>	<b>47</b>
<b>5.3 Instabilidade Mitótica</b>	<b>50</b>
<b>5.4. Análise dos cruzamentos meióticos</b>	<b>53</b>
<b>5.5. Análise dos cruzamentos mitóticos</b>	<b>57</b>
<b>5.6 Análise do consumo da glicose em meio completo líquido</b>	<b>60</b>
<b>5.7 Análise do consumo da glicose em meio completo líquido a partir dos sobrenadantes filtrados e dos sobrenadantes sem filtrar</b>	<b>63</b>
<b>5.8 Análise de proteínas</b>	<b>65</b>
5.8.1. Dosagem de proteínas totais	65
5.8.2. Cromatografia de exclusão molecular	65
5.8.3. "Fast protein liquid chromatography" (FPLC)	66
5.8.4. Cromatografia de fase reversa	67
<b>5.9. Análise do teor micotoxigênico das linhagens tratadas e controle</b>	<b>68</b>
5.9.1. Cromatografia em camada delgada da esterigmatocistina	68
5.9.2. Cromatografia de fase reversa para dosagem da esterigmatocistina	68
<b>5.10. Análise do Dot Blot das linhagens tratadas com RNA e controle</b>	<b>69</b>
<b>5.11. Relação entre o consumo de glicose, pH do meio de cultivo e o peso micelial</b>	<b>71</b>
<b>5.12. Determinação da atividade da glicose oxidase (GOD)</b>	<b>73</b>
<b>VI. CONCLUSÕES</b>	<b>75</b>
<b>VII. APÊNDICES</b>	<b>78</b>
<b>7.1. Instabilidade Mitótica</b>	<b>78</b>

<b>7.2. Análise Meiótica</b>	<b>81</b>
<b>7.3. Análise Mitótica</b>	<b>97</b>
<b>VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO 1: Linhagens Controle</b>	<b>128</b>
<b>Anexo 2: Linhagens tratadas</b>	<b>129</b>
<b>Anexo 3: Análise Proteica em HPLC</b>	<b>131</b>
<b>Anexo 4: Fracionamento por Gel filtração - FPLC</b>	<b>133</b>
<b>Anexo 5: Cromatografia de fase reversa após gel filtração</b>	<b>135</b>
<b>Anexo 6: Detecção rápida de aflatoxina e esterigmatocistina</b>	<b>136</b>
<b>Anexo 7: Dosagem de Esterigmatocistina em HPLC fase reversa</b>	<b>138</b>
<b>Anexo 8: Gráficos</b>	<b>139</b>

## Lista de Quadros

Quadro 1: Mapa genético parcial das linhagens mestras de <i>Aspergillus nidulans</i>	26
Quadro 2: Suplementos utilizados no Meio Seletivo	28
Quadro 3: Análise genotípica das linhagens tratadas	50
Quadro 3.1: Análise genotípica de 22 setores de primeira ordem linhagem RT 1 <sup>4</sup>	78
Quadro 3.2: Análise genotípica de 22 setores de primeira ordem linhagem RT 2 <sup>1</sup>	78
Quadro 3.3: Análise genotípica de 22 setores de primeira ordem linhagem RT 2 <sup>6</sup>	79
Quadro 3.4: Análise genotípica de 22 setores de primeira ordem linhagem RT S1 <sup>10</sup>	80
Quadro 4: Consumo da glicose do meio completo a 37°C	61
Quadro 5: Consumo da glicose do meio completo a 28°C	61
Quadro 6: Consumo da glicose com sobrenadante filtrado	64
Quadro 7: Consumo da glicose com sobrenadante bruto (sem filtrar)	64
Quadro 8: Dosagem de proteínas totais em linhagens tratadas com RNA	65
Quadro 9: Quantificação da esterigmatocistina em HPLC	69

## Lista de Quadrados Latinos

Quadrado Latino 1: Análise meiótica do cruzamento controle UT196 x UT448	36
Quadrado Latino 2: Análise mitótica do diplóide UT448//UT184 (controle)	37
Quadrado Latino 3: Análise meiótica RT1 <sup>4</sup> X UT448	82
Quadrado Latino 4: Análise meiótica RT2 <sup>1</sup> X UT448	84
Quadrado Latino 5: Análise meiótica RT2 <sup>6</sup> X UT448	86
Quadrado Latino 6: Análise meiótica RTS1 <sup>3</sup> X UT448	88
Quadrado Latino 7: Análise meiótica RTS1 <sup>10</sup> X UT448	90
Quadrado Latino 8: Análise meiótica RT1 <sup>4</sup> X UT196	92
Quadrado Latino 9: Análise meiótica RTS1 <sup>3</sup> X UT196	95
Quadrado Latino 10: Análise mitótica do diplóide RT1 <sup>4</sup> // UT184	99
Quadrado Latino 11: Análise mitótica do diplóide RT2 <sup>1</sup> // UT184	102
Quadrado Latino 12: Análise mitótica do diplóide RT2 <sup>6</sup> // UT184	104
Quadrado Latino 13: Análise mitótica do diplóide RTS1 <sup>3</sup> // UT184	107
Quadrado Latino 14: Análise mitótica do diplóide RTS1 <sup>10</sup> // UT184	109

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros de nutrientes para a acumulação do ciclo do ácido cítrico	23
Tabela 2: Alterações nas expressões de genes - RT2 <sup>6</sup> XUT448	54
Tabela 3: Alterações nas expressões de genes - Rt S1 <sup>10</sup> XUT448	55
Tabela 4: Alterações nas expressões de genes - RT 1 <sup>4</sup> XUT196	55
Tabela 5: Alterações nas expressões de genes - RT S1 <sup>3</sup> XUT196	56
Tabela 5.1. Genótipo dos protoplastos regenerados sem tratamento com RNA	47
Tabela 5.3.1: Instabilidade mitótica das linhagens	54
Tabela 5.4.1. Genótipos das colônias: cruzamento RT 1 <sup>4</sup> X UT448	81
Tabela 5.4.2. Genótipos das colônias: cruzamento RT 2 <sup>1</sup> X UT448	83
Tabela 5.4.3. Genótipos das colônias: cruzamento RT 2 <sup>6</sup> X UT448	85
Tabela 5.4.4. Genótipos das colônias: cruzamento RTS1 <sup>3</sup> X UT448	87
Tabela 5.4.5.: Genótipos das colônias: cruzamento RT S1 <sup>10</sup> X UT448	89
Tabela 5.4.6: Genótipos das colônias: cruzamento RT 1 <sup>4</sup> X UT196	91
Tabela 5.4.7: Genótipos das colônias: cruzamento RT 2 <sup>1</sup> X UT196	93
Tabela 5.4.8: Genótipos das colônias: cruzamento RT 2 <sup>6</sup> X UT196	93
Tabela 5.4.9: Genótipos das colônias: cruzamento RT S1 <sup>3</sup> X UT196	94
Tabela 5.4.10: Genótipos das colônias: cruzamento RT S1 <sup>10</sup> X UT196	96

Tabela 5.5.1. Genótipos das colônias haplóides segregantes RT1 <sup>4</sup> // UT184	97
Tabela 5.5.2. Genótipos das colônias haplóides segregantes RT2 <sup>1</sup> // UT184	100
Tabela 5.5.3. Genótipos das colônias haplóides segregantes RT2 <sup>6</sup> // UT184	103
Tabela 5.5.4. Genótipos das colônias haplóides segregantes RTS1 <sup>3</sup> // UT184	105
Tabela 5.5.5. Genótipos das colônias haplóides segregantes RTS1 <sup>10</sup> // UT184	108
Tabela 6: Alterações na expressões de genes RT S1 <sup>3</sup> //UT184	57
Tabela 7: Alterações na expressões de genes RT S1 <sup>3</sup> //UT184	58
Tabela 8: Alterações na expressões de genes RT 2 <sup>1</sup> //UT184	59
Tabela 9: Consumo de glicose e variação do pH durante o cultivo das linhagens	71
Tabela 10: Peso micelial das linhagens tratadas e controle	72
Tabela 11: Atividade da glicose oxidase no tempo	73
Tabela 12: Teste da influência das catalases extracelulares na reação	73

## Lista de Figuras

Figura 1: Linhagens Master: UT184, UT196 e UT448 _____	128
Figura 2: Linhagens tratadas _____	129
Figura 3: Eletroforese em gel de agarose - DNAs extraídos das linhagens _____	70
Figura 4: Dot blot das linhagens com a sonda pRB7B _____	70
Figura 5: Cromatografia em camada delgada esterigmatocistina _____	137

## Lista de Cromatogramas

Cromatograma 1: Padrão de Insulina	131
Cromatograma 2: Linhagem Controle UT448	131
Cromatograma 3: Linhagem RT1 <sup>4</sup>	131
Cromatograma 4: Linhagem RT2 <sup>1</sup>	131
Cromatograma 5: Linhagem RT2 <sup>6</sup>	132
Cromatograma 6: Linhagem RTS1 <sup>3</sup>	132
Cromatograma 7: Linhagem RTS1 <sup>10</sup>	132
Cromatograma 8: Linhagem RTS1.2 <sup>6</sup>	132
Cromatograma 9: Linhagem UT448	133
Cromatograma 10: Linhagem RTS1.2 <sup>6</sup>	134
Cromatograma 11: Padrão de Insulina – HPLC fase reversa	135
Cromatograma 12: Linhagem UT448	135
Cromatograma 13: Linhagem RTS1.2 <sup>6</sup>	135
Cromatograma 14: Padrão de esterigmatocistina	137
Cromatograma 15: Linhagem controle UT 448 - esterigmatocistina	137
Cromatograma 16: Linhagem RT 1 <sup>4</sup> - esterigmatocistina	137
Cromatograma 17: Linhagem RT 2 <sup>1</sup> - esterigmatocistina	137

Cromatograma 18: Linhagem RT 2<sup>6</sup> - esterigmatocistina \_\_\_\_\_ 138

Cromatograma 19: Linhagem RT S1<sup>3</sup> - esterigmatocistina \_\_\_\_\_ 138

Cromatograma 20: Linhagem RT S1<sup>10</sup> - esterigmatocistina \_\_\_\_\_ 138

## Lista de Gráficos

Gráfico 1: Análise de macros e micros setores espontâneos _____	139
Gráfico 2: Instabilidade mitótica de linhagens portadoras de duplicações gênicas _____	139
Gráfico 3: Consumo de glicose em meio completo líquido a 37°C _____	140
Gráfico 4: Consumo de glicose em meio completo líquido a 28°C _____	140
Gráfico 5: Consumo de glicose com sobrenadante filtrado (sem células) _____	141
Gráfico 6: Consumo de glicose com sobrenadante sem filtrar (com células) _____	141
Gráfico 7: Curva padrão de “Bovine Serum Albumin” _____	142
Gráfico 8: Dosagem de proteínas totais (BSA) em linhagens tratadas _____	142
Gráfico 9: Atividade da glicose oxidase no tempo _____	143

## Lista de Esquemas

Esquema 1: Envolvimento da glicose oxidase, catalase e lactonase na formação do ácido glucônico pelo *A. niger*. \_\_\_\_\_ 21

Esquema 2: Relações metabólicas gerais entre os ácidos orgânicos produzidos por *A. niger*, *A. terreus* e *Aspergillus nidulans* \_\_\_\_\_ 77

## Lista de Abreviaturas

AbRNA – RNAs aberrantes - são sequências repetitivas do RNA do transgene

AF - Aflatoxina

dsRNA - double-stranded RNA - RNAs endógenos complementares ao mRNA transgênico

*Dp(II-I)* - longo segmento do cromossomo II, duplicado e transposto para uma nova posição no cromossomo I

GIS – Sistema de Inativação Gênica

HDGS – Silenciamento de Genes Dependente de Homologia

5-mC - 5-metilcitosina

MIP – Metilação Induzida Pré-meioticamente

MMC – Meio Mínimo Concentrado

MC – Meio Completo

MM – Meio Mínimo

MCR – Meio Completo de Regeneração dos Protoplastos

PCNA - Antígeno Nuclear de Células Proliferantes

PEG – Solução Polietilenoglicol

pFA – p-Fluorfenilalanina

PTGS – Silenciamento Gênico Pós-transcricional

RIGS – Repeat-Induced Gene Silencing

RIP – Rearranjo Induzido Pré-meioticamente

RmVR – RNA-mediated Virus Resistance

RT – Tempo de Retenção

SM – Meio Seletivo

ST - Esterigmatocistina

TGS – Silenciamento Gênico Transcricional

## RESUMO

Fungos filamentosos, em particular *Aspergillus*, têm sido explorados pela sua habilidade em produzir altos níveis de proteínas extra-celulares de maneira econômica. Desde que muitas proteínas humanas com potencial terapêutico são secretadas e requerem modificação pós-tradução para apresentarem atividade biológica, sistemas de expressão-secreção têm sido alvo de pesquisas. Desenvolvimentos recentes em sistemas de transformação mediada por DNA, tem permitido a utilização do *Aspergillus* como hospedeiro para produção de proteínas de interesse biotecnológico, uma vez que, esse fungo apresenta características interessantes, tais como, genética bem caracterizada e a disponibilidade de muitos mutantes. Em trabalhos anteriores, realizados pelo nosso grupo, protoplastos de *Aspergillus nidulans* foram tratados com RNA de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* altamente produtora de insulina. Através desta metodologia foram obtidas linhagens instáveis que apresentavam rápido consumo de glicose do meio de cultura. A análise da instabilidade mitótica das linhagens tratadas, foi realizada através da observação da alteração do comportamento dos seus marcadores genéticos e dos seus setores. O tratamento com RNA foi o responsável tanto pela instabilidade, como por promover ativação/inativação gênica, mitótica e meiótica evidenciada através da análise das variações das frequências de recombinações nos cruzamentos das linhagens tratadas, com linhagens Master de *Aspergillus nidulans*. A alteração do perfil protéico e micotoxigênico das linhagens tratadas em relação à linhagem controle UT448, nos permitiu, comprovar o efeito estressante do tratamento com RNA no genoma das linhagens. As linhagens tratadas não apresentaram o gene da insulina inserido nos seus genomas. O elevado consumo de glicose nestas linhagens foi decorrente de um aumento na produção da enzima glicose oxidase, evidenciado nos sobrenadantes das culturas.

## ABSTRACT

### **The study of the alteration of genetic expression in *Aspergillus nidulans* strains submitted to the heterologous RNA treatment**

Filamentous fungi of the genus *Aspergillus* have been intensively used as receptors strains to express heterologous proteins mainly due to their ability to secrete high levels of extra cell proteins in a very economic way. In the present case, protoplasts of *Aspergillus nidulans* were submitted to a treatment with heterologous RNA from *Saccharomyces cerevisiae* strain that was able to produce high amounts of insulin. This method allowed us to obtain unstable strains that showed a fast consumption of glucose from the culture media. The RNA treatment may be responsible for this unstability as well as for the unleash of the genetic activation and inactivation mechanism demonstrated by frequency of recombination in the crosses of the treated strains and master strains of *Aspergillus nidulans*. The alterations in proteic and mycotoxin profile of the treated strains with reference to the control strains UT 448, allowed us to prove the stressed effect of the treatment with RNA in the genomic of the strains. The treated strains did not show the insulin gene inserted into their genome. The high consumption of glucose in these strains is a consequence of an increase in glucose oxidase enzyme, as shown in the supernatant cultures.

## I. INTRODUÇÃO

Entre os mais formidáveis aspectos do desenvolvimento das técnicas do DNA recombinante está a possibilidade de manipulação dos genomas de diversos organismos, tornando possível estabelecer a correlação entre as alterações *in vitro* promovidas no DNA com as suas consequências biológicas *in vivo*. O fungo *Aspergillus nidulans* é muito utilizado em genética, uma vez que apresenta diversas vantagens, tais como: rápido crescimento, genética muito bem conhecida e, normalmente, secreção abundante de proteínas. Uma característica importante deste microrganismo é que alterações no genoma podem ser facilmente identificadas, e muitas vezes mapeadas através das análises genéticas, via ciclo sexual ou parassexual.

Alterações na expressão de genes de *A. nidulans* promovidas pelo RNA (homólogo ou heterólogo) vem sendo descritas desde a década de 1980 (Zucchi *et al.*, 1989). Em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo, protoplastos de linhagens de *A. nidulans*, originárias do Fungal Genetics Stock Center, de Glasgow, (UK) e provenientes dos estoques da Universidade de Utrecht (Nederland), foram tratados com RNA heterólogo, (Zucchi, 1996 e Zucchi *et al.*, 1996), extraído de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* que superexpressava o gene da insulina humana (*S. cerevisiae*/B1MI17; Longo, 1997). Este trabalho consistiu na análise das linhagens obtidas a partir deste tratamento. Embora este tratamento com RNA (Zucchi *et al.*, 1989; Pires e Zucchi, 1998) tenha resultado em linhagens com alto consumo de glicose, a ausência de insertos de cDNA não nos permitiu esclarecer este resultado do ponto de vista molecular. Por outro lado, o tratamento originou colônias que apresentaram fenótipos diferentes daqueles da linhagem original, tais como alterações de cor, fisiologia e auxotrofias. Entre os diferentes fenótipos, o rápido consumo da glicose em meio de cultura líquido foi evidenciado em todas as linhagens tratadas. A possibilidade do tratamento com o RNA gerar linhagens com insertos de cDNA do gene da insulina, ou com inserções de fragmentos deste gene em regiões aleatórias do genoma, de forma a ativar ou inativar outros genes e alterar a fisiologia do fungo, foi o principal argumento para o desenvolvimento deste trabalho.

Dessa forma o objetivo do trabalho foi a caracterização morfológica, fisiológica e molecular de linhagens tratadas com RNA heterólogo, para identificar mecanismos de ativação e inativação gênica, definir eventos mitóticos e meióticos e correlacioná-los aos

mecanismos de silenciamento gênico, defesa genômica e epigenéticos acionados em decorrência do tratamento, mesmo depois de evidenciada a ausência da transformação.

## **II. OBJETIVOS**

O evidente potencial tecnológico dos primeiros resultados de tratamentos com RNA em organismos como *A. nidulans* (Zucchi *et al.*, 1989; Zucchi *et al.*, 1996, Zucchi, 1996) nos levaram a explorar as consequências do tratamento com RNA de células haplóides, na expressão, na replicação, recombinação e no reparo de genes residentes, bem como, no comportamento genético das células tratadas com RNA.

Para tal, alguns objetivos foram estabelecidos:

1. Verificar se ocorreu o fenômeno da transformação nas linhagens;
2. Estudar o efeito do tratamento com RNA na expressão de alguns genes.

### III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Tratamento com RNA

A transferência de informação genética generalizada, via RNA, em fungos filamentosos, foi inicialmente descrita por Mishra *et al.* (1975) em *N. crassa* e por Zucchi *et al.* (1989) em *A. nidulans*. Os primeiros experimentos evidenciando a retrotransformação em bactérias, foram apresentados por Beljanski *et al.* (1972), em *Agrobacterium*. Estas observações, sugeriram que o RNA exógeno foi capaz de transferir informação genética. A atividade da transcriptase reversa é requerida para retrotranscrever as moléculas de RNA em segmentos de cDNA que, então, se inserem no genoma (Temin, 1970). Depois destes resultados, muitos outros exemplos foram relatados em vários outros tipos de células e organismos, incluindo *N. crassa* (Kimura *et al.*, 1975; Passos Jr. e De Lucca, 1988; Hamada *et al.*, 1989; Niu *et al.*, 1989).

Estes estudos incluem sistemas que necessitam da atividade da transcriptase reversa, já demonstrada existir em muitas células e organismos (Kurashige e Mitsuhashi, 1973; Dutta *et al.*, 1980; Beljanski *et al.*, 1988; Kuipier e Lambowitz, 1988), como em *E. coli* (Beljanski *et al.*, 1972) e em plantas (Ayoama e Litvak, 1986). Esta enzima, copia o RNA molde em segmentos de cDNA que, podem ser inseridos no genoma através de recombinação homóloga ou heteróloga e, mais frequentemente, ectopicamente.

Em *A. nidulans* é muito frequente acontecer a inserção heteróloga com inativação simultânea (silenciamento) de genes específicos. Isto pode ser uma outra consequência da transformação mediada por RNA (Zucchi, 1996). Já foi recentemente determinado que a integração de multicópias de cDNAs no genoma da receptora pode disparar a ação do mecanismo GIS, promovendo, através de pesada metilação dos resíduos de citosinas das sequências CpG, o silenciamento dos genes extraordinários recém-introduzidos. Isto acontece frequentemente na pré-meiose, em núcleos diplóides, durante o ciclo sexual (Castro-Prado e Zucchi, 1993; Zucchi, 1996).

Com relação às inserções ectópicas, a inativação gênica, ocorrendo depois da fertilização de fungos, deve ser considerada quando as linhagens tratadas são analisadas através de cruzamentos meióticos (Selker *et al.*, 1987; Debuchy *et al.*, 1988; Goyon e Faugeron, 1989; Connerton, 1990). Eles devem ser tratados com agentes desmetilantes, como a 5-azacitidina, para confirmar a presença de 5-metil nos resíduos das citosinas. A

confirmação desta presença pode ser molecularmente determinada para se verificar o grau e o local desta inativação.

Trabalho recente mostrou claramente que o caráter reversível do mecanismo GIS não induz em diplóides retrotransformados de *A. nidulans*, com muita frequência, mutações de ponto e nem rearranjos cromossômicos nos genes em duplicata (Pires e Zucchi, 1998). Baseados nestes fatos, é razoável supor que, em organismos eucariotos, o RNA exógeno pode alterar as taxas de crossing-over mitótico, quando retro-transcrito em cópias de cDNAs e ectopicamente inseridas no genoma receptor (Beljanski, 1991; Beljanski *et al.*, 1988; Niu *et al.*, 1989; Temin, 1985; Pires e Zucchi, 1998).

### 3.2. Características gerais do gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* é caracterizado pela produção de um grande número de pequenos conidiósporos, secos e unicelulares originados a partir de fiálides dispostas na vesícula de um conidióforo. Os conidióforos de *Aspergillus* são frequentemente não septados, mais grossos que o micélio vegetativo e usualmente se originam de uma “célula - pé” (Smith e Moss, 1985; *in* Dezotti, 1999). É um organismo eucarioto que apresenta tanto o ciclo sexual quanto o parassexual. É um fungo filamentosos homotático, normalmente haplóide, que produz conidiósporos uninucleados pelo ciclo de vida assexual e possui também ascósporos binucleados pelo ciclo sexual (Clutterbuck, 1999). Sua temperatura ideal de crescimento é de 37°C, desenvolvendo-se bem em meios de cultura definidos. *Aspergillus nidulans* apresenta um sistema genético bem definido, com 8 cromossomos (n) (Käfer, 1958; *in* Dezotti, 1999), apresentando muitos marcadores genéticos para cor de conídio, auxotrofia, resistência à drogas, etc. O fungo *Aspergillus nidulans* foi descrito pela primeira vez como *Sterigmatocystis nidulans* por Eidam em 1883. Sua descrição incluía os estados anamorfo e teleomorfo. Winter em 1884 transferiu o nome de *S. nidulans* para *Aspergillus*, ficando *A. nidulans* (Eidam) Winter e novamente a descrição incluía o estado anamorfo e teleomorfo. Mais tarde, Vuillemin (1927) descreveu, pela primeira vez, a existência de um estado ascífero em *A. nidulans*. Ele transferiu *S. nidulans* para *Emericella*, ficando *E. nidulans* (Eidam) Vuillemin (Gams, 1992).

O *A. nidulans* é muito utilizado nos estudos de recombinação por possuir características importantes como o seu ciclo de vida. Apresenta fácil análise das suas frequências de recombinação e possui uma segregação Mendeliana típica (1:1), ou seja,

alterações nas frequências de recombinação são indicativos de alterações gênicas que controlam o reparo e a recombinação. Também é produtor de toxinas como esterigmatocistina e emestrina.

### 3.2.1. *Aspergillus nidulans* – Ciclo Sexual

O *A. nidulans*, por ser um fungo homotálico, possui regiões diferenciadas em seu micélio chamadas hifas ascógenas. Nessas hifas ocorrem fusões nucleares originando núcleos diplóides ( $2n$ ) com 16 cromossomos. Estes núcleos sofrem meiose, resultando em 4 núcleos haplóides ( $n$ ) que, com posterior divisão mitótica, darão origem a 8 células haplóides ( $n$ ) que são os esporos sexuais ou ascósporos binucleados, localizados no interior dos ascos. Os ascos ficam contidos em corpos de frutificação chamados cleistotécios. Normalmente, um único cleistotécio pode conter acima de meio milhão de ascósporos (Cove, 1977; *in* Dezotti, 1999), permitindo uma análise detalhada dos eventos meióticos (Bennett, 1985).

O ciclo sexual completo com divisão reducional (R!) ocorre a partir de um único talo, não ocorrendo a necessidade de diferentes tipos de reação sexual (mating types). Mesmo sendo homotálico, são possíveis cruzamentos entre linhagens de *A. nidulans*, cujas mutações se complementem, havendo, assim, anastomose das hifas e formação de heterocários. Nesse caso, núcleos diferentes coexistem em um citoplasma comum onde, raramente, ocorre a fusão nuclear entre núcleos geneticamente diferentes, resultando em cleistotécios híbridos.

### 3.2.2. *Aspergillus nidulans* – Ciclo Parassexual

O ciclo parassexual consiste de anastomoses de hifas entre duas linhagens diferentes, formando o micélio heterocariótico; fusão somática rara de núcleos diferentes para a formação do diplóide; crossing-over mitótico e aneuploidias sucessivas ( $2n-1$ ) levando, por fim, à haploidização. A frequência de haploidização pode ser aumentada com o uso de vários agentes haploidizantes como a para-fluorofenilalanina (Bennett, 1985).

A fusão entre núcleos de diferentes constituições genotípicas é a fase mais importante deste ciclo, uma vez que, isso confere algumas vantagens da sexualidade. Como a haploidização independe do crossing-over, genes não ligados, segregarão independentemente e genes ligados somente em raras ocasiões o farão (como função da distância do mapa e frequência de recombinação). Durante a haploidização cromossomos inteiros segregam

juntos. Isto torna a haploidização uma poderosa ferramenta para o mapeamento de genes nos grupos de ligação (Clutterbuck, 1992).

A fusão de protoplastos é uma técnica que ultrapassa certas barreiras entre linhagens e espécies incompatíveis em cruzamentos parassexuais tradicionais e pode ampliar o uso da análise parassexual.

### **3.3. Expressão de Proteínas Heterólogas em *Aspergillus***

Fungos filamentosos, em particular do gênero *Aspergillus*, têm sido explorados pela sua habilidade em produzir altos níveis de proteínas extra-celulares de maneira barata. Vários aspectos, tais como, genética bem caracterizada e a disponibilidade de muitos mutantes, fizeram do *A. nidulans* o organismo de escolha para o desenvolvimento de sistemas de expressão-secreção, desde que muitas proteínas humanas com o potencial para serem usadas terapêuticamente são secretadas e requerem modificação pós-tradução para apresentar atividade biológica.

Linhagens recombinantes contêm, integrados, os cassetes de expressão frequentemente em múltiplas cópias, mitoticamente estáveis. Entre as muitas enzimas heterólogas expressas em *A. nidulans*, a expressão da pectato liase 3 (PL3) de *Erwinia carotovora* foi conseguida em três espécies de *Aspergillus*: *nidulans*, *niger* e *awamori*. Dos fungos transgênicos obtidos, o *A. nidulans* foi o que mais expressou a enzima: 2,0 mg/l (Bartling *et al.*, 1996). Também foi conseguida em *A. nidulans*, a expressão e secreção do gene heterólogo para interleucina-6 humana (hIL6).

O tratamento com RNA, descrito por Zucchi *et al.* (1996), se apresenta como um método completamente diferente e econômico para a obtenção de novas características genéticas em linhagens receptoras, inclusive para a expressão de proteínas heterólogas em células de *A. nidulans* (*Emericella nidulans*). Esse tratamento pode também promover tanto inativação gênica mitótica (Zucchi, 1996; Pires e Zucchi, 1998) como meiótica (Zucchi, 1996).

### **3.4. Mecanismos Epigenéticos de Silenciamento Gênico**

#### **3.4.1. Proteção Contra Sequências Parasitas ou Invasoras**

O estudo das atividades dos genes em células somáticas especializadas e em desenvolvimento foi referido como epigenética por Waddington em 1953 (*in* Massini, 2001).

Atualmente, entende-se por epigenética mudanças na expressão gênica que não têm base em alterações da sequência do DNA, podendo este tipo de modificação ser herdado pela progênie. A herança epigenética tem um importante papel na evolução, na qual a pressão seletiva ou adaptativa pode agir capacitando os organismos a responderem rapidamente às alterações ambientais. O genoma de todos os eucariotos possui sequências repetidas, entre o rRNA e repetições associadas ao centrômero. Outras repetições como, elementos transponíveis e vírus, são “parasitas” moleculares que podem ter efeitos deletérios no hospedeiro. Em muitos eucariotos, sequências repetidas são modificadas por metilação em resíduos de citosina na posição 5'. As sequências de elementos transponíveis também podem ser metiladas impedindo uma expressão inadequada destes genes.

Uma variedade de parâmetros tem sido analisada em diversos organismos, para estudar as atividades de sequências repetidas do DNA. Dentro destes incluem-se, a transição e replicação, metilação do DNA, estado físico da cromatina, mutabilidade, recombinação e conversão gênica. A influência que cada um destes mecanismos exercem, pode resultar em distintos efeitos para reconhecer as sequências repetidas no DNA.

A metilação do DNA e as modificações na cromatina são dois mecanismos globais que regulam a expressão gênica. Genes eucarióticos podem ser silenciados por deacetilação (remoção do grupo acetil) através de uma acetil-lisina na região N-terminal das histonas. Trabalhos recentes relacionam a deacetilação de histonas com o aumento do número de repressores, sugerindo que isto pode estar relacionado com o sistema de repressão transcricional (Huck-Hui e Bird, 2000).

Os fenômenos da epigenética são adequados para explicar variações de expressão de genes, sendo vários os fatores que podem disparar os mecanismos de metilação do DNA eucariótico.

Bestor e Tycko (1996) sugeriram que a metilação da citosina seria parte de um sistema de defesa genômica que inativaria sequências parasitas, tais como, elementos transponíveis e DNA pró-viral. A maioria destes elementos está, de fato, metilada e é transcricionalmente inerte no genoma de mamíferos, de plantas e daqueles fungos que contém 5-metil-citosina (5-mC). O tratamento de células cultivadas com 5-Azacitidina pode ativar genes de retrovírus ou genes endógenos, que foram "silenciados" pela metilação *de novo* (e ectópica) das suas regiões reguladoras (Jaenisch *et al.*, 1985).

Foram estas informações que forneceram as bases para que Bestor e Tycko (1996), formulassem a hipótese de que a metilação da citosina é parte de um sistema de defesa do hospedeiro, que suprime a transcrição de sequências de elementos parasitas.

Esta hipótese da defesa genômica requer que a especificidade da ação do silenciamento seja determinada pelas diferenças estruturais de sequências particulares dos elementos parasitas. Esta defesa, pode agir no momento da invasão do genoma por vírus, por DNA transformante ou por transposição de elementos de DNA endógenos. A ação defensiva também pode ser desencadeada por interações de pareamento de elementos repetidos, que ocorrem na pré-meiose de genomas de organismos contendo duplicações. Esta hipótese, também requer que o aparato de defesa reconheça sequências específicas e comuns aos elementos invasores. Sabe-se que praticamente todos os intermediários de transposição e de integração viral apresentam certos aspectos estruturais comuns (Craig, 1995). O reconhecimento e a metilação *de novo* dos sítios CpG, dentro ou nas proximidades das sequências, devem garantir que a inativação do elemento invasor ocorra imediatamente após sua integração.

#### 3.4.1.1. Mecanismos de Silenciamento Gênico

- a.) Repeat-Induced Gene Silencing (RIGS) - fenômeno descrito em plantas do gênero *Arabidopsis* (Assad *et al.*, 1993). É um mecanismo similar aos descritos em fungos ascomicetos com relação à sequências repetidas. O mecanismo de inativação age em segmentos extras presentes no genoma dessas plantas.
- b) Rearranjo Induzido Pré-meioticamente (RIP) - “repeat-induced point mutation” que ocorre durante o ciclo sexual em *Neurospora crassa*, detecta e muta sequências repetidas com alta frequência (Selker e Garret, 1998; Selker *et al.*, 1987; Finchan, 1989). RIP altera cópias em duplicata promovendo uma transcrição do grupo GC-AT, sendo consequência de uma deaminação de resíduos de 5-metil-citosina;
- c) Metilação Induzida Pré-meioticamente (MIP), onde sequências repetidas são metiladas durante o ciclo sexual em *Ascobolus immersus* (Faugeron *et al.*, 1990, Goyon and Faugeron, 1989);
- d) “quelling” em *Neurospora crassa*, ocorre um sistema de silenciamento gênico epigenético durante o crescimento vegetativo e pode bloquear a expressão de genes

homólogos àqueles do DNA introduzido por transformação (Romano e Macino, 1992);

- e) Sistema de Inativação Gênica (GIS), que inativa, através de “pesada” metilação de resíduos de citosinas, genes duplicados durante o ciclo sexual de *Aspergillus nidulans* (Castro Prado e Zucchi, 1996). Este sistema age somente no período entre a fertilização e a cariogamia, como acontece em RIP, mas também ocorre em núcleos diplóides parecendo a meiose. Uma outra característica importante deste sistema é que ele causa inviabilidade dos ascóporos, gerando cleistotécios estéreis, afetando também o número total de classes parentais e recombinantes. A finalidade dos sistemas RIP e MIP é proteger o genoma de elementos transponíveis, isto é, dos transposons (Selker, 1997).

Os mecanismos RIP (Repeat Induced Premeiotically), MIP (Mutation Induced Point) e GIS, descritos em *N. crassa*, *Ascobolus immersus* e *A. nidulans*, respectivamente, apresentam muitas características comuns àquele conhecido como RIGS [Repeat Induced Gene Silencing] (Matzke e Matzke, 1995a; Matzke *et al.*, 1994), descrito para plantas. Este último é de tal forma eficiente, que multicópias de transgenes induzem o mútuo silenciamento ou mesmo o silenciamento das sequências homólogas residentes.

Frente aos diversos mecanismos de silenciamento que ocorrem na célula alguns autores têm citado os acentuadores (enhancers) transcricionais como uma adaptação que funcionaria “ligando e desligando” a regulação gênica em eucariotos para modular a ação dos sinais de silenciamento celular (Martin, 2001). A diferenciação celular requer um programa estável de expressão gênica, com alguns genes ativados e outros silenciados. Assim os acentuadores funcionariam antagonizando o silenciamento gênico.

#### **3.4.2. Silenciamento Pós-transcricional em Plantas – um mecanismo de ataque ou defesa?**

Nos silenciamentos dependentes de homologia (HDGS), denominados de “Post-Transcriptional Gene Silencing” (PTGS) e “RNA-mediated Virus Resistance” (RmVR) frequentes em plantas transgênicas (Wasseneger e Pelissier, 1998), foi demonstrado que o fenômeno HDGS pode ser consequência de diferentes mecanismos de controle agindo durante ou após a transcrição (Flavell, 1994; Matzke e Matzke, 1995a, b). Nestes casos, não há o

envolvimento de pareamento de DNA ou metilação (Peit e Russo, 1992; Selker, 1997), sendo proposto um mecanismo RNA-dependente agindo ao nível pós-transcricional (Cogoni *et al.*, 1996; Cogoni e Macino, 1997). Este fenômeno foi encontrado em *Neurospora*, após a introdução de um DNA por transformação e foi denominado de “quelling”.

O PTGS não é célula-autônomo, sugerindo a síntese de sinais sequência-específica, que são também amplificados, e a RNA polimerase RNA dirigida, recentemente clonada em várias espécies de plantas, é uma forte candidata a amplificar estes sinais (Sijen e Kooter, 2000). O PTGS parece atuar diretamente como uma defesa da planta contra as viroses.

A Co-supressão detectada em plantas transgênicas consiste no silenciamento do transgene e também de genes endógenos homólogos à estes (Sijen e Kooter, 2000). Foi primeiro observado com genes envolvidos na pigmentação de flores de petúnia (Van der Krol *et al.*, 1990; Napoli *et al.*, 1990). Assim, o Silenciamento de Genes Dependente de Homologia (HDGS) é um mecanismo comum em plantas. Existem 2 tipos de HDGS:

- a) Silenciamento Gênico Transcricional (TGS): resultado da metilação do DNA em sequências promotoras – os transgenes não são transcritos;
- b) Silenciamento Gênico Pós-Transcricional (PTGS): os (trans) genes são transcritos, mas são degradados. Todos os RNAs da célula com grau de homologia aproximadamente de 80% estão sujeitos a degradação.

### **Indução do PTGS**

Em uma transformação típica, um número variável de transformantes apresentam co-supressão e quando esta ocorre o transgene não codifica uma proteína funcional, indicando que é um processo baseado no DNA ou no RNA. O PTGS é mais comum em plantas que são homozigotas para o transgene, mas o silenciamento aumenta quando o RNA é mais estável e o número de cópias do transgene é maior (Sijen e Kooter, 2000). Existe um limite de RNA (conhecido como Modelo Limiar do RNA) o qual é responsável por disparar a inativação do promotor do transgene e com isto promover o silenciamento pós-transcricional (Sijen e Kooter, 2000).

Alguns autores (Dougherty e Parks, 1995; Stam *et al.*, 1997; English *et al.*, 1996; Grant, 1999; Baulcombe e English, 1996) têm indicado algumas alternativas para a elevada taxa de silenciamento em plantas:

- a) alta incidência de RNAs aberrantes (abRNA - são sequências repetitivas do RNA do transgene) transcritos a partir de transgenes altamente expressos: disparam o reconhecimento do Modelo Limiar de RNA aumentando o silenciamento;
- b) a presença de abRNAs endógenos: estes podem ser produzidos por genes endógenos que estão epigeneticamente alterados, devido às interações ectópicas com transgenes homólogos.

### **PTGS acionado ectopicamente por moléculas de DNA endógenas**

Experimentos com biolabística indicaram que o PTGS pode ser iniciado pelas moléculas de DNA homólogas ao transgene que foi inserido (Voinnet *et al.*, 1998; Palauqui e Balzergue, 1999). Com isto podemos concluir que as sequências de DNA introduzidas interagem com os genes homólogos ou endógenos levando à iniciação do processo de silenciamento por PTGS (Sijen e Kooter, 2000). Os RNAs endógenos complementares podem se hibridizar com o mRNA transgênico para formar o double-stranded RNA (dsRNA) (Pang *et al.*, 1997).

O PTGS é frequentemente associado com a metilação dos resíduos de citosina na região codificadora do transgene. A ligação entre o PTGS e a metilação do DNA pode envolver o dsRNA. Assim os RNAs com potencial para formar dsRNA, podem fazer a metilação de novo de maneira sequência específica (Pelissier *et al.*, 1999; Luff *et al.*, 1999). Segundo alguns autores, a metilação do DNA é uma consequência do PTGS e não uma causa.

### **PTGS como um mecanismo de defesa natural**

Certamente o PTGS em plantas não existe para defendê-las contra a transgenia. Por isto, é improvável que o PTGS seja usado frequentemente para modular a expressão gênica regular, já que o RNA alvo é quase todo eliminado, uma vez que, a degradação do RNA pode se espalhar pelos tecidos da planta. Assim o PTGS pode ser considerado uma estratégia de defesa do hospedeiro para controlar sequências de RNA parasitas, como as viroses e, *etc.*, elementos retrotransposáveis (Sijen e Kooter, 2000).

### **3.4.3. Inativação X Instabilidade Mitótica e Meiótica**

A maior parte das inativações gênicas são causadas devido à pesada metilação de resíduos de citosinas das sequências CpG nas regiões duplicadas e adjacentes a elas (Meilus e Castro-Prado, 1998b). Em estudos de uma linhagem de *A. nidulans*, portadora de um único segmento extraordinário, duplicação *Dp(II-I)*, verificou-se primeiramente que GIS (Gene Inactivation System) age pré-meioticamente, no ciclo sexual depois do processo de fertilização, mas antes da cariogamia. Meilus e Castro-Prado (1998a) verificaram a ocorrência de GIS também no ciclo parassexual de *A. nidulans*.

Estudos da instabilidade meiótica da linhagem de *A. nidulans* portadora da duplicação *Dp(II-I)*, foram essenciais para a compreensão da letalidade induzida pelo fenômeno GIS. A presença da duplicação *Dp(II-I)* no cromossomo I, foi consequência do tratamento da linhagem UT448 com o agente mutagênico MNNG (N-metil-N'-nitrosoguanidinae) e inclui os marcadores *Acr*, *w* e *met+* (Zucchi, 1990; Castro-Prado e Zucchi, 1991; 1992). A *Dp(II-I)* trata-se de um longo segmento do cromossomo II, duplicado e transposto para uma nova posição no cromossomo I.

Em cruzamentos meióticos, heterozigotos para a *Dp(II-I)*, o número de ascósporos e a viabilidade são drasticamente reduzidos (Castro-Prado *et al.*, 1996), como consequência de pesada metilação das sequências CpG do DNA, presentes no segmento em duplicata. Os segregantes F1 inativados, podem ser novamente submetidos ao mesmo processo GIS, quando cruzados com linhagens normais. O nível de metilação dentro das sequências repetidas, regula o nível da refratariedade do DNA ao processo GIS da linhagem portadora da duplicação (Castro-Prado *et al.*, 1996).

Estes estudos preliminares, ajudaram a compreensão das súbitas perdas de expressão de genes recém-introduzidos, por transformação de eucariotos com DNA ou com RNA, relatados em inúmeros outros sistemas eucarióticos. Genes silenciados por GIS podem ser reativados pelo tratamento com agentes hipometilantes como a 5-Azacitidina. A reativação de genes recém-inativados também pode ser observada espontaneamente durante o crescimento vegetativo e são devido às falhas na metilação de sítios hemi-metilados durante a replicação do DNA (Castro-Prado e Zucchi, 1996; Castro-Prado *et al.*, 1996).

Paralelamente a estes estudos de recombinação, metilação e inativação gênica feitos em eucariotos inferiores, há uma série de estudos em eucariotos superiores, que têm trazido, também, outras informações importantes para auxiliar a compreensão deste intrincado e importante mecanismo genético. Em eucariotos superiores, as alterações dos padrões de

metilação, alteram o conteúdo informacional dos genomas (Reinisch *et al.*, 1995) e são transmitidos por herança clonal (Pfeifer *et al.*, 1990). Também, nestes organismos, a metilação dos sítios CpG, dentro das sequências promotoras, reprimem a transcrição (Iguchi-Arigo e Schaffner, 1989).

Foi observado pela primeira vez por Colot *et al.* (1999) a demonstração direta da inibição da recombinação meiótica pela metilação, sugerindo que a metilação também pode afetar a recombinação mitótica uma vez que ambas podem usar a mesma maquinaria enzimática. E ainda, a desmetilação programada e a metilação *de novo* têm um papel direto no controle de genes durante o desenvolvimento (Holliday e Pugh, 1975; Riggs, 1975; Kass *et al.*, 1997), inclusive na regulação do crescimento somático.

Esta modificação natural do DNA, também pode vir a ser perigosa para as células, pois, a 5-metilcitosina (5-mC) é o maior mutagênico endógeno conhecido. Genes supressores de tumores podem ser inativados por metilação *de novo* de suas regiões promotoras (Herman *et al.*, 1994). De modo geral, as 5-mC podem ser deaminadas, resultando em mutação de transição C→T, nos sítios CpG, o que é responsável por 1/3 de todas as mutações já descritas em seres humanos (Bestor e Coxon, 1993).

Em humanos, segundo Szyf (1999), é a própria enzima DNA-metiltransferase, e não a metilação do DNA, que é a principal causa da transformação de células normais em cancerosas. Digamos que esta enzima estabelece, ao nível de forquilha de replicação do DNA, interações importantes com a proteína essencial à replicação, chamada de PCNA (Antígeno Nuclear de Células Proliferantes). Assim como as células cancerosas, as células normais se dividem, mas elas obedecem aos sinais de parada do ciclo celular, enquanto que as células tumorais não respondem. Entre as proteínas que transmitem o sinal de parada, está a proteína p21, que interage com a PCNA para formar um complexo que bloqueia a progressão da forquilha de replicação e leva as células a parar.

Como praticamente todos os eucariotos com genomas superiores a  $5 \times 10^8$  pb (*A. nidulans* possui  $3 \times 10^7$  pb) apresentam este mecanismo de metilação, ele deve ser essencial à vida e deve apresentar alguma vantagem seletiva. Já foi verificado que perturbações no padrão de metilação de um organismo podem ser letais, alterando, inclusive a diferenciação celular.

#### 3.4.4. Natureza Epigenética do Silenciamento de Genes – Metilação

A metilação do DNA ocorre pela ação da enzima DNA metiltransferase nos resíduos de 5-metilcitosina (5-mC) (Riggs e Porter, 1996). A metilação em sequências eucarióticas, principalmente regiões promotoras (Igushi-Arigo e Schaffner, 1989), está frequentemente associada com a regulação da expressão (Kass *et al.*, 1997) e inativação gênica (Yisraeli e Szyf, 1984), por interferir com a estrutura da cromatina, que por sua vez, afeta a interação DNA-proteína e conseqüentemente a replicação, mutação e recombinação (Selker, 1990). A reversão da metilação em sequências promotoras, pelo tratamento das células com 5-Azacidina, permite a expressão de genes “silenciados” e pode afetar o desenvolvimento de maneira geral (Jones, 1984; Bestor, 1999). Em trabalho recente, Kass e *et al.* (1997) sugerem a existência de repressores transcricionais específicos para o DNA metilado e cromatina.

Os efeitos da metilação são duradouros e podem ser transmitidos através de um sistema conhecido como manutenção da metilação, que reconhece sequências hemimetiladas e as converte em estados metilados (Lewin, 1998). Uma possibilidade de ação deste mecanismo, seria a transferência de metilação entre os alelos metilados e não metilados, através de interações físicas entre as duas moléculas de DNA parentais (Meyer *et al.*, 1993), e desta maneira, a recombinação seria um elemento fundamental para realização deste fato, como primeiramente apontado por Holliday (1987) e posteriormente por Colot *et al.* (1996).

Fenômenos epigenéticos, onde o fenótipo de um indivíduo é alterado, mas não o seu DNA, em sua maioria são correlacionados à metilação, incluindo o “imprinting genômico” em mamíferos (Tilghman, 1999), metilação induzida por sequências repetidas em fungos e regulação de transposons em milhos (Meyer *et al.*, 1993), levando a um mecanismo ancestral comum, além de mostrar que a natureza tem desenvolvido múltiplos mecanismos epigenéticos que podem servir como sistemas de auto-defesa genômica (Bestor e Tycko, 1996; Walsh *et al.*, 1998; Bestor, 1999).

Situações de estresse em eucariotos podem funcionar como estímulos para a metilação do DNA (Bestor e Coxon, 1993). Em bactérias, encontramos uma extensa gama de sistemas de Restrição-Modificação (R-M) sugerindo uma possível função na proteção contra infecções por fagos, não excluindo um papel adicional na recombinação genética (King e Murray, 1996). Mais recentemente, foi demonstrada a relação entre acetilação de histonas e

metilação, como fatores que atuam juntos para regulação da expressão gênica (Nan *et al.*, 1998; Bestor, 1999).

Desta maneira, estes fenômenos, individualmente ou associados, demonstram o desenvolvimento de muitos mecanismos de silenciamento de genes, os quais estão sendo extensivamente estudados para compreensão dos mais variados comportamentos celulares (Beisel *et al.*, 2002).

### **3.5 Metabolismo secundário**

Em certos grupos taxonômicos de microrganismo e plantas podemos encontrar duas grandes categorias de metabolismo: o metabolismo primário e o metabolismo secundário.

O metabolismo primário está presente em praticamente todas as formas de vida conhecidas. Envolve vias catabólicas, anfóbicas e anabólicas, com vistas a prover de energia as reações químicas e reunir os precursores biossintéticos para as macromoléculas estruturais, como o DNA, o RNA, proteínas, polissacarídeos, etc. (Martin e Demains, 1978; *in* Lourenço, 1996). Não existe vida sem o metabolismo primário ou sem uma regulação equilibrada deste.

As vias metabólicas secundárias são irregularmente distribuídas na natureza, sendo raras em animais, mas comum em plantas, fungos e bactérias.

As curvas de crescimento dos microrganismos dividem-se em duas fases: a trofofase, que é a fase de crescimento, e a idiofase, onde estes metabólitos secundários são sintetizados (Drew e Wallis, 1983). A síntese destes componentes depende de precursores e energia gerados durante o metabolismo primário. As vias metabólicas exigem um gasto considerável de energia (Krishna e Sinha, 1992) sugerindo que elas provavelmente confirmam certas vantagens seletivas para as espécies que as possuem (Drew e Wallis, 1983; Maggon *et al.*, 1977; *in* Lourenço, 1996).

Quinonas, antibióticos, alcalóides, pigmentos e toxinas são alguns exemplos genéricos de metabólitos secundários. A teoria mais difundida, sugere que os metabólitos secundários sejam formados quando uma grande quantidade de precursores do metabolismo primário, como acetatos, malonatos, piruvatos e aminoácidos se acumulam, ou seja após a trofofase, durante a idiofase. Os fungos são grandes produtores de metabólitos secundários e é dentro dessa categoria que as micotoxinas se enquadram (Lourenço, 1996).

### 3.5.1. Produção de micotoxina em *Aspergillus nidulans*: Esterigmatocistina

A esterigmatocistina (ST) é um metabólito secundário biologicamente ativo, toxigênico, carcinogênico, mutagênico e teratogênico produzido por várias espécies de *Aspergillus* sp., incluindo *A. versicolor*, *A. nidulans* e *A. chevalieri* e algumas espécies de *Bipolares* e *Chaetomonium* (Moss, 1991). É frequentemente encontrada como contaminante de diversos produtos alimentícios, como sementes oleaginosas e cereais.

A esterigmatocistina é um intermediário na biossíntese da aflatoxina (AF) e é muito semelhante à AF em sua estrutura química e atividade biológica. Holzappel *et al.* (1966, *in* Dezotti, 1999) foram os primeiros a detectarem a produção de esterigmatocistina em *Aspergillus nidulans*. Os genes responsáveis pela biossíntese de aflatoxina (AF) e de esterigmatocistina (ST) encontram-se agrupados em “clusters”. Estes “clusters” contêm a maioria dos genes estruturais que codificam as enzimas da via e também para o gene regulador da via (*aflR*) nas espécies toxigênicas de *Aspergillus* (Bennet e Keller, 1999).

O processo regulatório dos metabólitos secundários se torna ativo somente quando o crescimento do microrganismo é afetado, isto parece ser benéfico para o organismo quando este não pode mais competir no seu ambiente (Vining, 1990). Há vários mecanismos que regulam a produção de metabólitos secundários. Primeiramente, há um controle regulatório que interliga a produção desses metabólitos com baixos níveis de crescimento e, subseqüentemente, há uma regulação que é cepa-específica. Há também um outro fator que influencia o metabolismo secundário: a disponibilidade de metabólitos primários e intermediários servindo como precursores na biossíntese dos metabólitos secundários (Zähner *et al.*, 1983).

O gene da esterigmatocistina, chamado de *stcZ*, foi mapeado em *A. nidulans*, por Dezotti e Zucchi (2001). Este trabalho evidenciou a produção desta toxina em linhagens haplóides de UT196 e diplóide de UT448 // UT184 de *A. nidulans*, onde estas linhagens diplóides, individualmente não produziam ST. Este foi o melhor indício de que o gene selvagem *stcZ*<sup>+</sup> estava silenciado em ambas as linhagens UT448 e UT184, afetando a produção de ST (Dezotti e Zucchi, 2001).

Guzáman-de-Peña *et al.* (1998) utilizaram a linhagem de *Emericella nidulans* FGSC4 (*veA*<sup>+</sup>) para determinar o efeito da iluminação na biossíntese de esterigmatocistina. Verificou-se que o micélio crescido no escuro apresentou morfologia “fluffy” e com baixa

produção de ST. Este mesmo micélio, quando crescido na presença de luz, apresentou esporos verdes e quantidade de ST seis vezes maior. Desta forma, puderam concluir que a luz afetou tanto a esporulação assexual como a biossíntese da ST.

A extração de ST é usualmente feita com acetonitrila e cloreto de potássio aquoso (Stack e Rodricks, 1971). Esta micotoxina apresenta boa solubilidade para a maioria dos solventes orgânicos, mas é rapidamente solúvel em clorofórmio e insolúvel em água (Scott, 1994). A detecção e quantificação da ST, normalmente, são feitas por cromatografia em camada delgada (CCD) ou CCD-bidimensional (Van Egmond *et al.*, 1980) ou ainda por CCD de alta resolução (Lee *et al.*, 1980).

A ST possui fluorescência vermelho – tijolo sob luz U.V. de 364 nm em CCD, mas a visualização é aumentada quando a placa é borrifada com vapores de cloreto de alumínio e aquecida, resultando num “spot” de fluorescência amarelada (Davies *et al.*, 1960).

### 3.5.2. Metabolismo de glicose em *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* pode utilizar duas diferentes vias para o catabolismo da glicose: a Via da Hexose-bifosfato (glicólise) e o Desvio (“Shunt”) Hexosemonofosfato ou “Shunt” das Pentoses – fosfato. A Via da Hexose-bifosfato prevalece em condições de grande acúmulo de ácidos. No Shunt das Pentoses - fosfato, o *Aspergillus niger* e algumas outras espécies de fungo, formam a glicose oxidase, a qual catalisa a formação da glucona- $\delta$ -lactona a partir da glicose, assim, conectando a utilização de glicose (Esquema 1) com a formação do gluconato (Roehr *et al.*, 1983, *in* Kubicek *et al.* 1994).

Da mesma forma, os passos metabólicos envolvidos no acúmulo do ciclo do ácido tricarboxílico requerem a operação de três passos subsequentes: a) via glicolítica até piruvato; b) formação de oxaloacetato a partir de piruvato; c) ciclo do ácido tricarboxílico.

### 3.5.3. Regulação da biossíntese da glicose oxidase

O passo inicial da oxidação da glicose para glucona- $\delta$ -lactona é catalisada pela flavoproteína glicose oxidase com a redução concomitante do oxigênio à peróxido de hidrogênio (Esquema 1). A glucona- $\delta$ -lactona pode ser hidrolisada pela lactonase ou espontaneamente. O peróxido de hidrogênio é detoxificado pelas catalases. Embora a função fisiológica da glicose oxidase ainda não esteja muito clara, a sua contribuição mais notória estaria relacionada com a competitividade do organismo pela remoção da glicose, com a

resultante acidificação do meio e/ou pela formação de peróxido de hidrogênio, ao qual, o *A. niger* é resistente, já que o peróxido de hidrogênio tem sido reportado na literatura como um biocontrolador de fungos fitopatogênicos (Kim *et al.*, 1988).

Por muito tempo, considerou-se que a glicose oxidase de *A. niger* estava localizada intracelularmente nos peroxissomos (Pazur, 1966, *in* Kubicek *et al.* 1994). Entretanto, três argumentos favorecem a hipótese da localização extra-celular da glicose oxidase: 1) a enzima é fortemente glicosilada - já que isto nunca foi observada em uma proteína peroxissômica; 2) os valores de *K<sub>m</sub>* para glicose são altos (15mM), enquanto a concentração de glicose intracelular são relativamente baixos - isto não é compatível com alta eficiência da produção de gluconato; 3) o sequenciamento da glicose oxidase de *A. niger* indica que ela tem um peptídeo sinal, indicando uma proteína secretória (Kriechbaum *et al.*, 1989; Frederick *et al.*, 1990; Whittington *et al.*, 1990; *in* Kubicek *et al.* 1994).

Witteveen *et al.* (1992) usando métodos de imuno-citoquímica demonstraram que a glicose oxidase está de fato localizada na parede celular do fungo, ao passo que, marcações citoquímicas da atividade da catalase, indicam que ela está presente, tanto na parede celular quanto nos peroxissomos. Esses autores também demonstraram a presença de quatro catalases em *A. niger*: duas delas são constitutivas, uma (CAT I) está localizada intracelularmente, enquanto a outra (CAT II) ocorre na parede celular. Sob condições de indução da glicose oxidase as duas outras catalases aparecem, uma na forma intracelular (CAT III) e a outra na forma extra-celular (CAT IV), portanto, protegendo a célula do fungo contra o peróxido de hidrogênio com uma barreira dupla.

A lactonase também é secretada e distribuída em quantidades iguais no meio de cultura e na parede celular (Witteveen *et al.*, 1992). Quantidades relativas de glicose oxidase (80%), catalase (>95%) e lactonase (50%) ficam retidas pela parede celular em função dos seus tamanhos. Estudos da localização destas enzimas explicam o porque de alguns autores sugerirem a reutilização do micélio em subseqüentes fermentações (Reuss *et al.*, 1986; *in* Kubicek *et al.* 1994). Visando a obtenção de mutantes super produtores de glicose oxidase Frederick *et al.* (1990) introduziram e expressaram o gene da glicose oxidase em leveduras sob controle do promotor híbrido regulável ADH<sub>2</sub>-GAPDH e em *Aspergillus nidulans* foi utilizado seu próprio promotor (Whittington *et al.*, 1990; Witteveen *et al.*, 1993; *in* Kubicek *et al.* 1994). Em levedura, a enzima é secretada e torna-se hiper-glicosilada (MW 350-400 kDa)

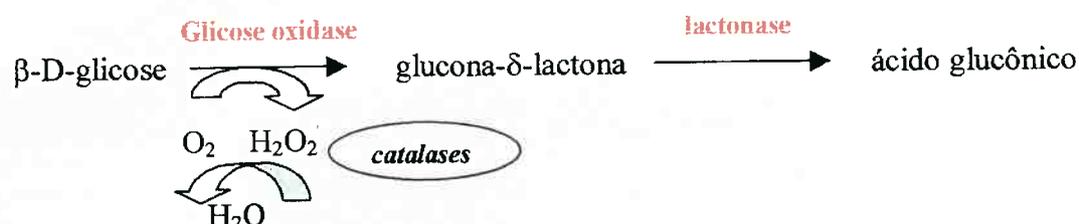
enquanto que os pesos moleculares desta enzima expressa por *A. niger* e *A. nidulans* são praticamente equivalentes (150-180 kDa).

Independente da regulação da via glicolítica, o seu produto final é o piruvato. Em células “normais”, o destino catabólico do piruvato é entrar na mitocôndria e ser usado para a formação de acetyl-CoA. Em *Aspergillus*, dentre outros fungos, existe a piruvato carboxilase (em lugar da piruvato - desidrogenase que, na mitocôndria, converteria o piruvato em acetil - CoA) que forma oxaloacetato a partir do piruvato e dióxido de carbono (Osmani e Scrutton, 1983; Bercovitz *et al.*, 1990; Jaklitsch *et al.*, 1990; 1991). Esta enzima também só é induzida na presença de altas concentrações de carboidrato e, ao contrário dos outros eucariotos, em *Aspergillus* ela é encontrada no citosol e não na mitocôndria. Esta parece ser uma vantagem para o acúmulo de ácido: o oxaloacetato não pode ser transportado para a mitocôndria e precisa primeiro ser reduzido a malato.

A localização da piruvato carboxilase pode ajudar a esclarecer este catabolismo: os ácidos málico e oxálico são formados sem nenhum envolvimento da mitocôndria. E portanto, a síntese de málico se dá totalmente no citosol. Da mesma forma, o ácido oxálico também é formado no citoplasma a partir da oxaloacetato hidrolase (Kubicek *et al.*, 1988).

Altos rendimentos destes dois ácidos a partir da glicose (128%) têm sido indicativos da ocorrência extra-celular do  $\text{CaCO}_3$  (Peleg *et al.*, 1988) o que sugere que o *Aspergillus* pode utilizar o  $-\text{HCO}_3$  a partir do meio extra-celular para a formação do oxaloacetato. Da mesma forma, em *Aspergillus*, o cis-aconitato descarboxilase está localizado no citoplasma, enquanto a aconitato hidratase é exclusivamente mitocondrial (Jaklitsch *et al.*, 1990), implicando na exportação do cis-aconitato e não do citrato a partir da mitocôndria.

Esquema 1: Envolvimento da glicose oxidase, catalase e lactonase na formação do ácido glucônico pelo *A. niger*.



Fonte: Kubicek *et al.* (1994)

### 3.5.3.1. Determinação da Atividade da Glicose Oxidase

A glicose oxidase é específica para a catálise da glicose, o que tornou seu emprego muito comum nas análises clínicas. Vários métodos são propostos para a determinação do peróxido de hidrogênio formado como produto da reação da catálise, dos quais podemos citar o da  $\sigma$ -dianisidina,  $\sigma$ -toluidina, Trinder, sensor elétrico, dentre outros (Berset, 1985; Free, 1963; *in* Rodas, 1997).

A maioria dos estudos cinéticos da glicose oxidase têm sido confirmados com as enzimas de *A. niger* e de espécies de *Penicillium* (Rodas, 1997). As enzimas de *A. niger* são dímeros de peso molecular de 186000 Da, tendo duas moléculas de FAD ligadas por dímeros. Cada unidade no dímero é composta de duas cadeias polipeptídicas conectadas por uma ligação dissulfeto (Bright e Porter, 1975).

A glicose oxidase é ativa em uma ampla faixa de pH, envolvendo valores de pH tão baixos quanto 3 ou tão altos quanto 9. O efeito catalítico ótimo é exercido do pH 4 ao 7 (Free, 1963; *in* Rodas, 1997).

A glicose oxidase imobilizada tem uma grande aplicação no desenvolvimento de biossensores para a determinação da glicose (Von Storp e Guilbault, 1973; Updike *et al.* 1979; Dumont e Fortier, 1996). Esta enzima é também adicionada aos vinhos ou sucos de frutas artificiais para eliminar traços de oxigênio e assim com uma função de conservante. A

catalase de *A. niger* é usada para remover traços de peróxido de hidrogênio do leite e outros materiais (Carlile e Watkinson, 1996).

### **3.6. Relação entre o Consumo de glicose e o Peso Micelial**

O consumo de glicose pode ser mensurado com o objetivo de avaliar o crescimento do fungo, uma vez que, o peso celular é proporcional às quantidades de nutrientes consumidas. Porém, há ocasiões em que a glicose é convertida em outras substâncias ou oxidada e não utilizada. Dessa forma, grandes quantidades de glicose podem desaparecer sem que isso signifique incremento do peso celular (Calam, 1969, in Lourenço, 1996).

A pesagem da massa micelial é uma medida direta desta relação entre o consumo de glicose do meio de cultura e o crescimento fúngico.

O peso úmido micelial é baseado na pesagem do micélio imediatamente após a separação deste do meio de cultura, eliminando apenas o excesso de água através da prensagem em papel de filtro (Lourenço, 1996). É algumas vezes empregado para fungos quando se requer uma estimativa rápida do crescimento, não é muito preciso, pois é muito difícil avaliar a contribuição da água intracelular e da água que fica aderida às superfícies celulares no momento da pesagem final (Malette, 1969).

Em situações em que se requer uma maior precisão na pesagem tende-se a optar pelo peso seco do micélio. Apesar do método do peso seco apresentar alguns inconvenientes, como o fato de não refletir necessariamente um aumento do número de células nem discriminar células viáveis de não viáveis (Stanier et al., 1969; Mandels, 1965; in Lourenço, 1996), há um consenso em se exporem dados na base de peso seco para os fungos (Malette, 1969). Este fato é comprovado pela evidente predominância desse método em inúmeros trabalhos científicos relacionados com o tema (Bennett e Horowitz, 1979; Sharma et al., 1980; Bennett et al., 1981; Wicklow e Shotwell, 1983; Mert e Ekmekci, 1988; Criseo et al., 1990; Mahmoud, 1994). O peso seco é considerado um ótimo referencial, especialmente quando se trabalha com outros parâmetros de conteúdo de material biológico.

### **3.7. Relação entre o Consumo de Glicose e o pH do Meio de Cultura**

O Shunt das Pentoses - fosfato (via de consumo da glicose através da glicose oxidase) é uma via que funciona em uma faixa de pH bastante ampla, variando do pH 3 ao 9.

Em contraste com a formação do ácido glucônico (gluconato), a biossíntese do ciclo do ácido tricarbóxico requer um pH bastante específico para o seu acúmulo em quantidades consideráveis (Tabela 1). A análise da tabela 1 indica que somente em alta concentração de glicose (100 g/L) e sob pH ácido este ciclo é ativado, dessa maneira, em condições normais de cultivo, dificilmente esta via será acionada. Por outro lado, a partir do tempo de incubação aproximado de 80 horas, na idiofase, a principal atividade metabólica do *Aspergillus* tende a ser o ciclo do ácido cítrico (Guebel e Darias, 2001), dessa forma, em condições de aumento acentuado de consumo de glicose, deve-se acompanhar as variações do pH, para se precisar em qual fase do ciclo o fungo está.

Assim, o acompanhamento das variações do pH durante o cultivo pode nos dar indícios das vias metabólicas envolvidas na respectiva fase de crescimento (Guebel e Darias, 2001).

Tabela 1: Parâmetros de nutrientes ótimo para a acumulação no ciclo do ácido cítrico

Parâmetros	Condições ótimas
Tipo de açúcar	Facilmente metabolizável
Concentração de açúcar	Alta (>100g/L)
Fonte e concentração de nitrogênio	Baixa ( $\text{NH}_4 > \text{NO}_3$ )
Concentração de fosfato	Baixa (para ser balanceada com traços de metais)
Íons metais traços	$\text{Fe}^{+3}$ , $\text{Zn}^{+2}$ baixo, $\text{Mn}^{+2}$ muito baixo (para ser balanceado com fosfato)
pH	< 3

Fonte: Kubicek et al. (1994)

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Linhagens haplóides e linhagens tratadas

Neste trabalho foi utilizado o fungo *Emericella nidulans* (Eidam) Vuillemin, pertencente a Subdivisão Ascomycotina, cuja fase anamórfica é designada de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter.

As linhagens haplóides de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter originárias de Glasgow, foram obtidas a partir dos estoques de Utrecht, Holanda. Os seus genótipos estão descritos abaixo.

De acordo com a nomenclatura proposta por Clutterbuck (1999), os alelos mutantes das linhagens UT448, UT184 e UT196 com seus respectivos grupos de ligação são os descritos a seguir:

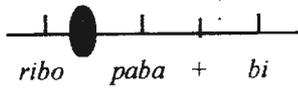
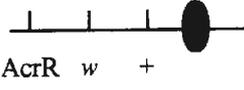
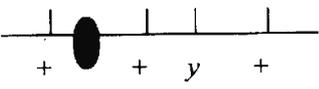
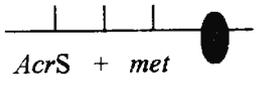
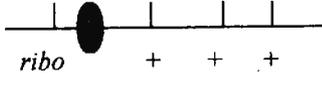
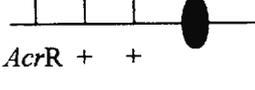
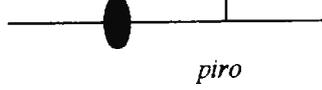
**UT448:** *wA2* (II) conídios brancos; *riboA1*, *pabaA124*, *biA1* (I), com requerimentos para riboflavina, ácido *p*-aminobenzóico e biotina, respectivamente; *AcrA1* (II), resistente à Acriflavina (Quadro 1; figura 1).

**UT184:** *chaA1* (VIII) conídios chartreuse (coloração verde clara); *piroA4* (IV), *nicB8* (VIII), *riboB2* (VIII), *sB3*(VI), com requerimentos para piridoxina, nicotinamida, riboflavina e tiosulfato de sódio, respectivamente; *galA1* (III), *facA303* (V), *lacA1* (VI), incapaz de crescer em meio com galactose, acetato de amônio e lactose, respectivamente, como única fonte de carbono; *SulA1* (I), *AcrA1* (II), resistente à Sulfanilamida e Acriflavina, respectivamente (Quadro 1, figura 1).

**UT196:** *yA1* (I) conídios amarelos; *methA17* (II), *pyroA4* (IV), com requerimentos para metionina e piridoxina, respectivamente (Quadro 1; figura 1).

**Linhagens tratadas com RNA:** RT 1<sup>4</sup>, RT 2<sup>1</sup>, RT 2<sup>6</sup>, RT S1<sup>3</sup>, RT S1<sup>10</sup> e RT S1.2<sup>6</sup>. Esta última linhagem foi obtida a partir da linhagem RT 2<sup>6</sup> (setor branco da linhagem RT 2<sup>6</sup> verde) com o objetivo de acompanhar as alterações fenotípicas e genotípicas após o evento de instabilidade mitótica. Os seus genótipos são apresentados no Quadro 3 e fenótipos nas Figuras 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6.

**Quadro 1:** Mapa genético parcial das linhagens mestras UT448, UT196 e UT184 de *Aspergillus nidulans*

Linhagens	Genótipos
UT448	I  II 
	IV 
UT196	I  II 
	IV 
UT184	I  II 
	IV 

**Nota:** A cor dos conídios em *Aspergillus nidulans* depende da expressão de pelo menos dois genes: *yA* e *wA* (in Zucchi, 1996). O produto de *yA* é a *p*-difenoiloxidase, ou lacase, que transforma o pigmento amarelo precursor em pigmento verde ( $y^+$ ). O gene *wA* codifica uma policetônico sintase; mutações nesse gene resultam em linhagens com esporos brancos (Mayorga e Timberlake, 1992). A cor dos conídios depende do alelo  $w^+$  presente no cromossomo II. Conídios verdes ou amarelos dependem da presença dos alelos  $y^+$  ou  $y$ , respectivamente, no cromossomo I. Desse modo, genótipos  $y^+w^+$ ,  $y^+w$ ,  $yw^+$ , e  $yw$  resultam em conídios com fenótipos verde, branco, amarelo e branco, respectivamente (Mayorga e Timberlake, 1990; Tilburn *et al.*, 1990; Timberlake e Marshall, 1988).

#### 4.1.2 Meios de cultura e soluções

**Meio Mínimo Concentrado (MMC)** (Van de Vate e Jansen, 1978; Zucchi, 1990): 6,0 g/l de nitrato de sódio; 0,52 g/l de sulfato de magnésio heptahidratado; 0,50 g/l de cloreto de potássio; 1,52 g/l de fosfato dihidrogenado de potássio; 1,0 mg/l de sulfato de ferro heptahidratado; 1,0 mg/l de sulfato de zinco heptahidratado; 1,0 mg/l de sulfato de cobre heptahidratado; 10,0 g/l de glicose; completar o volume para 1 litro com água destilada.

**Meio Completo (MC)** (Van de Vate e Jansen, 1978; Zucchi, 1990): 2,0 g/l Bacto peptona; 1,0 g/l Bacto casaminoácidos; 2,0 ml/l solução de vitaminas; 2,5 ml/l solução estoque de hidrolisado de ácidos nucleicos; 10 g/l de glicose; 0,5 g/l de extrato de leveduras; 100 ml/l de MMC líquido; completar o volume para 1 litro com água destilada; pH 6,0. Para preparar MC sólido, adicionar 12,0 g/l de Bacto ágar.

**Meio Mínimo (MM)** (Van de Vate e Jansen, 1978; Zucchi, 1990): 10,0 g/l de glicose; 100 ml/l de MMC; completar o volume para 1 litro com água destilada; pH 6,0. Para preparar o MM sólido, adicionar 12,0 g/l de Bacto ágar.

**Meio Completo de Regeneração dos Protoplastos (MCR)** (Pires e Zucchi, 1998): Para a regeneração dos protoplastos foi adicionado ao Meio Completo sólido 1,2 M de Sorbitol.

**Meio Sólido de Aveia** (Hajjar *et al.*, 1989) modificado: 10 g de aveia em flocos finos e 30 mL de água destilada. Autoclavar por 1 hora a 120°C e 1 atm de pressão.

**Meio Seletivo (SM):** Consta de MM suplementado de acordo com os requerimentos das linhagens utilizadas. Os nutrientes são adicionados ao SM à partir de soluções estoques:

Quadro 2: suplementos do Meio Seletivo

Requerimentos Nutricionais	Abreviaturas	Concentração da solução estoque (mg/100ml)	Adicionar a 200 ml de MM	Concentração final no meio de cultura (µg/ml)
<b>Riboflavina</b>	<i>ribo</i>	20,0	1,0 mL	1,0
<b>Ácido p-aminobenzóico</b>	<i>paba</i>	13,7	1,0 mL	0,68
<b>Biotina</b>	<i>bi</i>	0,4	1,0 mL	0,02
<b>Acriflavina</b>	<i>acr</i>	500,0	0,25 mL	6,25
<b>L-metionina</b>	<i>met</i>	200,0	2,0 mL	20,0
<b>Piridoxina</b>	<i>piro</i>	10,0	1,0 mL	0,5
<b>Tioissulfato de sódio</b>	<i>s</i>	24.800,0	1,0 mL	1.240,0
<b>Ácido nicotínico</b>	<i>nic</i>	20,0	1,0 mL	1,0
<b>Galactose</b>	<i>gal</i>	20.000,0	10,0 mL	10.000,0
<b>Lactose</b>	<i>lac</i>	20.000,0	10,0 mL	10.000,0
<b>Acetato</b>	<i>fac</i>	24.000,0	10,0 mL	12.000,0

As soluções estoque são esterilizadas em banho-maria, sob vapor fluente, por 20 minutos e conservadas em frascos escuros a 4°C, e adicionado 1 ml de clorofórmio. Meio seletivo sólido contém 12,0 g/L de Bacto ágar.

**Solução de Vitaminas** (Van de Vate e Jansen, 1978): 10 mg/l de biotina; 250,0 mg/L de piridoxina; 250,0 mg/L de ácido p-aminobenzóico; 250,0 mg/L de ácido fólico; 500,0 mg/L de nicotinamida; 500,0 mg/L de riboflavina; 1,0 g/L de ácido pantotênico; 1,0

g/L de cloreto de colina; 2,0 g/L de meso-inositol; 250mg/L de tiamina; completar o volume para 1 litro com água destilada. A solução é esterilizada em banho-maria, sob vapor fluente, por 20 minutos e conservada em frasco âmbar a 4°C contendo 1,0 ml de clorofórmio.

**Hidrolisado de Ácidos Nucléicos** (Van de Vate e Jansen, 1978): Misturam-se 2,0 g de ácido nucléico (RNA sódico de leveduras) com 15,0 ml de solução 1N NaOH e 2,0 g ácido nucléico (DNA sódico de timo de bezerro) com 15,0 ml de solução 1N de HCl. As soluções são aquecidas em banho-maria por 20 minutos, misturadas e filtradas, o pH ajustado em 6,0. O volume é complementado para 40,0 ml com água destilada. A solução é conservada em frasco âmbar a 4°C, contendo 1,0 ml de clorofórmio.

**Solução Salina:** 8,5 g de NaCl em 1000 ml de água destilada.

**Solução Salina Tween:** Tween 80 a 0,01% em solução salina. Usar 0,5 ml em 200 ml de meio.

**Solução Polietilenoglicol (PEG)** (Pires e Zucchi, 1998): 25% de PEG 6000, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM TrisHCl pH7,5.

**Solução Novozym** (Pires e Zucchi, 1998): 0,6 M de KCl e 5 mg/ml Novozym.

**Tampão para extração de RNA** (Pires e Zucchi, 1998): 0,06M acetato de sódio, 3mM de EDTA, 0,12 M Tris-HCl pH 7,2.

#### 4.1.3. Soluções padrão

Padrão de Insulina Humana: insulina: BioBRÁS - NPH Mista (Bovina e Suína)  
Altamente Purificada – IOLIN, lote

Padrão Quantitativo de Esterigmatocistina (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> - peso molecular = 324,3):  
Padrão da Sigma Chemical Company, n° S - 3255, 1 mg. O padrão foi diluído em benzeno na concentração de 20µg/ml, foi armazenado em balão volumétrico, envolto em papel alumínio e mantido a 10°C negativos.

#### 4.1.4 Linhagem de *Escherichia coli*

- **HB101:** F<sup>-</sup> Δ (*gpt-proA*) 62*leuB6 supE44 ara-14 galk2 lacy1* Δ (*mcrC-mrr*) *rpsL20 (Str<sup>r</sup>)xyl-5 mtl-1 recA13*

#### 4.1.5 Plasmídeos

- **pRA12:** plasmídeo bifuncional (bactéria/levedura), resistente à ampicilina, que apresenta a sequência da cadeia A da insulina humana inserida em seu genoma.
- **pRB78:** plasmídeo bifuncional (bactéria/levedura), resistente à ampicilina, que apresenta a sequência da cadeia B da insulina humana inserida em seu genoma.
- **pRP4:** plasmídeo bifuncional (bactéria/levedura), resistente à ampicilina, que apresenta a sequência da proinsulina humana inserida em seu genoma.
- **pRM12:** plasmídeo bifuncional (bactéria/levedura), resistente à ampicilina, que apresenta a sequência da miniproinsulina humana inserida em seu genoma.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Obtenção de suspensão de conídios

Conídios das linhagens mestras UT448, UT196, UT184 e das linhagens tratadas: RT 1<sup>4</sup>, RT 2<sup>1</sup>, RT 2<sup>6</sup>, RT S1<sup>3</sup>, RT S1<sup>10</sup> e RT S1.2<sup>6</sup> foram coletados à partir de placas inoculadas em um só ponto em MC sólido, crescidas por 5 dias a 37°C, lavando-se a superfície com 10,0 ml de solução salina Tween e raspando-se suavemente com bastão de vidro. A suspensão foi então centrifugada a 5.000 rpm por 15 minutos e lavada três vezes com 10,0 ml de solução salina. Após a última centrifugação, o tubo foi agitado e o conteúdo filtrado em lâ-de-vidro; o filtrado foi coletado em frasco âmbar com rolhas, e sonicados em ultra-som por 15 minutos para o completo isolamento das cadeias de conídios. O frasco foi mantido a 4°C. A densidade da suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Todos estes passos foram feitos sob condições de esterilidade.

### 4.2.2 Viabilidade dos conídios

O número de conídios foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. Amostras de suspensões de conídios em diluições apropriadas, foram semeadas em MC sólido e as colônias desenvolvidas depois de 48 horas de incubação a 37°C, foram contadas e correlacionadas ao número de conídios contados em câmara de Neubauer.

#### **4.2.3 Análise genotípica dos protoplastos regenerados sem tratamento com RNA**

Com o objetivo de excluir a possibilidade do tratamento de protoplastização e do processo (drogas, enzimas e soluções) e procedimentos utilizados para o tratamento com RNA interferirem nos resultados obtidos, refizemos os controles da linhagem originalmente submetida ao tratamento (UT448) e realizamos análise genotípica das colônias recuperadas. Somente a partir deste resultado, prosseguimos com os experimentos.

Para tanto a linhagem UT 448 foi protoplastizada. Teve seus protoplastos regenerados e submetidos a tratamento idêntico porém **sem o RNA**.

10<sup>6</sup> conídios da linhagem UT 448 foram inoculados em MM suplementado com os requerimentos necessários e incubados por 15 horas (para a obtenção da fase micelial) a 37°C em shaker sob agitação vigorosa (Bull *et al.*, 1988; Pires e Zucchi, 1998). O micélio foi centrifugado, lavado uma vez com 0,6 M de KCl, e ressuspensionado em 0,6 M KCl contendo 5mg/ml da enzima NovoZyme 234 (Novo Industri, DenMark). Os protoplastos foram liberados por agitação lenta em shaker por noventa minutos a 30°C. Os protoplastos foram coletados por centrifugação (10 minutos a 11.000 rpm) e lavados 2 vezes em 0,6 M KCl (Pires e Zucchi, 1998).

Os protoplastos obtidos como descrito acima foram utilizados para o procedimento do tratamento, porém sem o RNA (Bull *et al.*, 1988; Pires e Zucchi, 1998). Os protoplastos foram ressuspensionados em 0,6 M KCl / 50 mM CaCl<sub>2</sub> a uma concentração final de 0,5 – 5,0 x 10<sup>8</sup>/ml e foi adicionado 12,5 ml de tampão fresco (0,06 M acetato de sódio, 3 mM EDTA, 0,12 M TRIS-HCL, pH = 7,2) e incubado 20 minutos em gelo. Após a incubação foi adicionado 0,5 ml da solução PEG e misturado gentilmente e mantido em gelo por 05 minutos. Foi adicionado 1 ml de KCl/50 mM CaCl<sub>2</sub> e misturado por inversão. A mistura foi mantida em gelo até o momento do plaqueamento onde então foram inoculadas em 10,0 ml de meio completo de regeneração (MCR) top-Ágar e vertidas sobre o botton-Ágar contendo MCR (Pires e Zucchi, 1998). Este experimento foi realizado em triplicata.

Foram realizadas diluições sucessivas para garantir a obtenção de colônias isoladas em placas de petri com SM (MM suplementado com 1µg/ml riboflavina; 0,7 µg/ml ácido p-aminobenzóico; 0,02 µg/ml biotina; 0,5 µg/ml piridoxina; 1 µg/ml nicotinamida e 1,24 mg/ml de tiosulfato de sódio). Após a incubação por 48 horas a 37°C, 250 colônias foram coletadas e preparadas placas mestras (5X5), seguiu-se a análise das suas auxotrofias

em placas de petri contendo meio SM menos cada um dos requerimentos (Pires e Zucchi, 1998).

#### **4.2.4 Análise genotípica das linhagens tratadas e de alguns de seus setores**

A análise genotípica foi realizada inoculando-se as linhagens tratadas e alguns dos seus setores selecionados em meio seletivo (SM) com os requerimentos para as seguintes auxotrofias: ribo, paba, bi, met e piro; e SM menos cada um dos requerimentos. Para a análise da resistência à Acriflavina foi adicionado ao SM, 300 µL de Acriflavina.

#### **4.2.5 Análise da instabilidade mitótica das linhagens tratadas**

Para o estudo da não conformidade mitótica das linhagens tratadas (RT 1<sup>4</sup>, RT 2<sup>1</sup>, RT 2<sup>6</sup>, RTS1.2<sup>6</sup>, RT S1<sup>3</sup> e RT S1<sup>10</sup>), estas foram inoculadas em placas de MC sólido, com repique no centro da placa e o crescimento foi feito durante 5 dias a 37°C. Foram inoculadas 20 placas de cada linhagem. A análise foi feita através da contagem dos setores, que foram classificados conforme o tamanho em, macro e micro setores; a morfologia em, colônias normais e deterioradas (det); e também pela coloração dos conídios em, verdes, amarelos, brancos e chartreuse (coloração verde clara).

#### **4.2.6. Obtenção de heterocários obtidos a partir de conídios das linhagens tratadas e seus setores com linhagens controles UT448, UT184 e UT196**

Os conídios das linhagens tratadas e das linhagens mestras foram obtidos a partir de inóculos feitos no centro da placa de MC sólido. Estas placas foram incubadas durante 5 dias à 37°C.

Para a obtenção dos heterocários, estes conídios foram inoculados em MM líquido com 2% de MC e incubados à 37°C por 72 horas. Após este período, os heterocários formados foram coletados e transferidos para placas de MM sólido e incubados à 37°C por 5 dias.

#### **4.2.7. Análises dos cruzamentos meióticos**

Os heterocários dos cruzamentos meióticos foram obtidos como descrito acima. Estes foram inoculados em quatro pontos em placas de MM sólido vedadas (para impedir a passagem do oxigênio, forçando o cruzamento meiótico) e incubadas por 18 dias à 37°C.

Os conídios obtidos foram então utilizados para fazer suspensões. O número de conídios obtidos foi contado em câmara de Neubauer, e após, foram inoculados a partir de diluições apropriadas em placas de MC sólido para a obtenção de colônias isoladas. Estas colônias foram transferidas para placas mestras de MC sólido (5X5) e incubadas à 37°C por 48 horas e posterior determinação dos genótipos.

A análise genotípica foi realizada inoculando-se as colônias das placas mestras em meio seletivo (SM) com os requerimentos para as seguintes auxotrofias: *ribo*, *paba*, *bi*, *met* e *piro*, e SM menos cada um dos requerimentos. Para a análise da resistência à Acriflavina, foi adicionado ao SM, 300 µl de Acriflavina.

Seguiu-se a análise dos quadrados latinos dos cruzamentos que geraram recombinantes significativos.

São apresentados os cruzamentos das linhagens: RT 1<sup>4</sup>, RT 2<sup>1</sup>, RT 2<sup>6</sup>, RT S1<sup>3</sup> e RT S1<sup>10</sup> com as linhagens controles UT448 e UT196.

#### **4.2.8. Obtenção das linhagens diplóides**

Os heterocários obtidos do modo descrito no item 4.2.6., foram recolhidos dos tubos com alça de platina, cortados em 4 partes e posicionados separadamente na superfície de uma placa com meio mínimo e incubada a 37°C por 5 dias. Após esse período, foram observados setores de crescimento vigoroso e de cor verde entre as regiões heterocarióticas. Estes setores correspondem ao diplóide heterozigoto que consegue crescer em MM. Os conídios desses setores foram repicados mais uma vez em MM para isolamento completo do diplóide.

#### **4.2.9. Análises dos cruzamentos mitóticos**

Os diplóides obtidos do modo descrito acima, foram haploidizados em placas de MC contendo p-fluorfenilalamina (Morpurgo, 1961; Lhoas, 1961) e incubados a 37°C por 5 dias. Nesse período, o diplóide, que encontra-se numa fase de vida instável, tende a estabilizar seu genoma sofrendo aneuploidias sucessivas (2n-1) até chegar à completa haploidização. Desse modo, os diversos setores haplóides obtidos foram então purificados em placas de MC. Cada setor purificado foi transferido para uma das 25 posições definidas da "placa mestra" (PM) contendo MC e incubadas à 37°C por 48 horas. Estas placas mestras, após o total

desenvolvimento das colônias haplóides, foram replicadas, através de um replicador especial de níquel-cromo (com 25 pontos), para meio seletivo para posterior análise em meio seletivo (SM) com os requerimentos para as seguintes auxotrofias: *ribo*, *paba*, *bi*, *piro*, *tio*, *nic*, e SM menos cada um dos requerimentos. Para a análise da resistência à Acriflavina foi adicionado ao SM, 300 µL de Acriflavina.

Para a análise da fonte de carbono utilizada pelas colônias, não foi adicionada glicose ao SM, foram utilizadas galactose, lactose ou acetato.

Seguiu-se a análise dos quadrados latinos dos cruzamentos que geraram recombinantes significativos.

Todas as linhagens tratadas foram cruzadas com a linhagem master UT184.

**4.2.10 Quadrado latino para análise de dois pontos**

A apresentação dos resultados dos cruzamentos foi do tipo “quadrado latino”, obtido a partir dos resultados das listas de genótipos dos segregantes meióticos e mitóticos.

Através desta análise, o comportamento de cada um dos genes no cruzamento pode ser relacionado a todos os outros envolvidos no cruzamento meiótico.

Para a construção do quadrado latino os resultados devem ser apresentados na seguinte ordem:

- a) Os totais dos alelos mutantes e selvagens, segregantes de cada gene envolvido nos cruzamentos, devem ser dispostos nas duas metades dos quadros da diagonal maior (vide exemplo a seguir).
- b) A distribuição das 4 classes possíveis de parentais e recombinantes, entre dois genes, devem ser colocados à direita da diagonal maior, dispostos de tal forma que os números das classes parentais (P) fiquem em posição diagonal, perpendicular à diagonal maior e os números das classes recombinantes (R) fiquem também em posição diagonal, mas paralela à diagonal maior (vide exemplo a seguir).

Ex:  $ab \times a^+b^+$

a+	26	R	P
a	30	P	R
b+	FR a – b (%)		24
b		32	

- c) Nos quadros situados à esquerda da diagonal maior estão as frequências de recombinação (FR) entre cada dois marcadores, de onde é calculada por (Zucchi, 1986):

$FR = \frac{\text{n}^\circ \text{ de recombinantes}}{\text{n}^\circ \text{ de parentais} + \text{recombinantes}} \times 100$
--

A frequência de recombinação (FR) de 0,01 ou 1% é definida como uma unidade de mapa, ou também, referida como um centimorgan (cM), em homenagem a Thomas Hunt Morgan (Suzuki *et al.*, 1992).

Quadrado Latino 1: Análise meiótica do cruzamento controle UT196 x UT448. Foram analisados 499 segregantes. (in ZUCCHI, 1996).

UT196	+	<i>ribo</i>	+	<i>paba</i>	<i>y</i>	+	+	<i>bio</i>	<i>acr<sup>S</sup></i>	<i>acr<sup>R</sup></i>	+	<i>w</i>	<i>met</i>	+
<b>UT448</b>														
<i>ribo</i>		<b>236</b>	82	154	45	74	102	134	135	101	119	117	117	119
+	<b>263</b>		14	117	68	61	150	113	87	176	129	134	72	191
<i>paba</i>				<b>271</b>	27	114	66	205	148	123	141	130	129	142
+	39,9%	<b>228</b>			86	21	186	42	74	154	107	121	60	168
+						<b>135</b>	7	128	103	32	135	0	115	20
<i>y</i>	42,7%		19,4%		<b>113</b>		105	8	48	65	113	0	73	40
<i>bio</i>								<b>247</b>	133	114	136	111	115	132
+	43,1%		21,6%		6,0%	<b>252</b>			89	163	112	140	74	178
<i>acr<sup>R</sup></i>										<b>277</b>	97	180	63	214
<i>acr<sup>S</sup></i>		62,3%		60,5%		67,7%		59,3%	<b>222</b>		152	70	126	96
<i>w</i>												<b>250</b>	1	249
+	50,7%		52,5%		54,4%		55,3%		33,7%	<b>249</b>			242	7
+														<b>256</b>
<i>met</i>		61,7%		59,5%		62,5%		58,7%		31,9%		1,6%	<b>243</b>	

Nota: + indica o alelo selvagem; - indica alelo mutante; R e S indicam resistência e sensibilidade a acriflavina, respectivamente.

Quadrado Latino 2: Análise mitótica do diplóide UT448//UT184 (controle). Foram analisados 81 segregantes (*in* ZUCCHI, 1996).

184	+ ribo	+ paba	+ bio	+ w	gal	+ piro	+ fac	+ s	+ nic	+ cha
<b>448</b>										
<b>ribo</b>	57	14 43	15 42	23 30	35 22	32 25	42 15	32 25	33 24	10 13
<b>+</b>	24	24 0	24 0	10 14	14 10	12 12	16 4	11 13	9 15	0 10
<b>paba</b>		43	1 42	16 27	27 16	23 20	31 12	25 18	28 15	3 13
<b>+</b>	17,3%	38	38 0	17 21	22 16	21 17	27 11	18 20	14 24	7 10
<b>bio</b>			42	16 26	26 16	22 20	30 12	22 20	27 15	3 13
<b>+</b>	17,3%	1,2%	39	17 22	23 16	22 17	28 11	21 18	15 24	7 10
<b>w</b>				48	26 22	23 25	32 16	28 20	25 23	0 0
<b>+</b>	45,7%	45,7%	46,9%	33	23 10	21 12	26 7	15 18	17 16	10 23
<b>gal</b>					32	14 18	21 11	19 13	15 17	4 6
<b>+</b>	55,5%	53,1%	51,8%	44,4%	49	30 19	37 12	24 25	27 22	6 17
<b>piro</b>						37	30 16	25 12	19 18	4 8
<b>+</b>	54,3	49,4%	48,1%	43,2%	40,7%	44	28 7	18 26	23 21	6 15
<b>fac</b>							23	10 13	10 13	1 6
<b>+</b>	61,7	51,8%	50,6%	48,1%	40,7%	56,8%	58	33 25	32 26	9 17
<b>s</b>								38	19 19	1 17
<b>+</b>	55,5%	55,5%	49,4%	56,8%	54,3%	62,9%	43,2%	43	23 20	9 6
<b>nic</b>									39	8 9
<b>+</b>	59,3%	64,2%	62,9%	50,6%	45,7%	49,4%	44,4%	48,1%	42	2 14
<b>cha</b>										23
<b>+</b>	60,6%	39,4%	39,4%	69,7%	63,6%	57,6%	54,5%	21,2%	66,6%	10

#### **4.2.11 Análise do consumo de glicose em meio completo líquido**

A análise do consumo da glicose foi feita após o cultivo de  $10^6$  conídios/ml das linhagens em MC líquido sob baixa agitação em Shaker (40 rpm), a 37°C. Em paralelo, foi realizado o cultivo nas mesmas condições (MC líquido com concentração de conídios de  $10^6$ /ml) a 28°C estático durante o período de 10 dias, até a total redução de glicose do meio de cultura. A incubação foi realizada em triplicata para cada uma das linhagens e as dosagens foram feitas a cada 24 horas pelo método químico (Monitor de Glicemia ADVANTAGE).

Aliquotas de cada tempo, filtradas em millipore (0,22 $\mu$ m), foram estocadas em freezer 10°C negativos para análises posteriores.

A amostra final, após todo o período de incubação de 10 dias, foi concentrada 2 vezes, aproximadamente, em liofilizador. Foi aplicado o fator de correção nas posteriores análises de proteínas. Este sobrenadante concentrado foi utilizado para dosagem de proteínas totais e para a análise do perfil protéico das linhagens por cromatografia.

#### **4.2.12 Análise do consumo da glicose em meio completo a partir de sobrenadantes filtrados e sobrenadantes sem filtrar**

A análise do consumo da glicose, em MC líquido, foi realizada em dois experimentos em paralelo sob as mesmas condições, variando somente o material inoculado. No primeiro foram utilizados 100 $\mu$ l de sobrenadante filtrado em millipore (0,22 $\mu$ m), obtidos no cultivo acima. No segundo experimento, foram inoculados 100 $\mu$ l de sobrenadante com fungo (sem filtrar). Foram feitas inoculações em triplicatas para cada uma das linhagens tratadas e para linhagem controle UT 448. A incubação foi realizada em shaker a 37°C a 100rpm. As dosagens foram feitas em 48 e 96 horas utilizando o monitor de glicemia ADVANTAGE.

#### **4.2.13 Análise de proteínas**

##### **4.2.13.1. Dosagem de proteínas totais**

O teor de proteínas totais, secretadas pelas linhagens tratadas e controle, foi determinado pelo Método BSA (Protein Assay Reagent Kit) a partir do sobrenadante concentrado como descrito no item 4.2.11. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 562nm.

#### **4.2.13.2. Cromatografia de exclusão molecular**

O perfil cromatográfico foi analisado por gel filtração em HPLC (cromatografia de exclusão molecular). Foi utilizada a coluna TOSO HASS – TSK 2000 (faixa de separação 20µl amostra/corrída) com o fluxo de 1ml/minuto. Foram injetados 10µl de amostra.

Os diluentes utilizados foram: água, aceto-nitrila e ácido fosfórico na proporção 500:1:1. A leitura foi feita em 220nm (comprimento de onda da ligação peptídica).

#### **4.2.13.3. “Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)”**

Com o objetivo de reprocessar o material no HPLC, em fase reversa (coluna C18), as amostras da linhagem controle e da RTS1.2<sup>6</sup> foram processadas previamente em FPLC para impedir a obstrução dos poros desta coluna. Foram injetados 2ml de amostra. Foi utilizada uma coluna Superdex (Pharmacia) 75: comprimento 70cm e 1,6 cm de diâmetro.

Foi utilizada como fase móvel Tris 50mM pH 8.0 com fluxo de 0,5ml/minuto, totalizando 6 horas de corrida para cada amostra. Volume coletado por tubo: 1ml. A leitura foi feita a 280nm.

#### **4.2.13.4. Cromatografia de fase reversa**

O terceiro, dos três picos obtidos no experimento anterior (linhagens UT448 e RTS1.2<sup>6</sup>), foi coletado e passado no HPLC de fase reversa. Foi utilizada a coluna C18, foram aplicados 20µl de amostra : 180µl de água destilada. A leitura foi feita a 280nm contra o padrão de insulina humana.

### **4.2.14. Análise do teor micotoxigênico da linhagens tratadas e controle**

#### **4.2.14.1. Extração química da esterigmatocistina**

Para a extração da esterigmatocistina (ST) foram adicionados 216 ml de metanol p.a. e 24 ml de uma solução KCl 4% ao frasco do meio de cultura, que foi fechado com tampa, envolto em papel alumínio e agitado manualmente por 30 minutos. A suspensão foi filtrada em papel de filtro Whatmann nº 1 e uma alíquota de 120ml foi retirada e transferida para um becker de 600ml (Dezotti, 1999).

#### 4.2.14.2. Purificação da Esterigmatocistina

Aos 120ml do filtrado foram adicionados 120ml de uma solução clarificante de  $\text{CuSo}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  10% e 40 ml de celite, medido em becker. A suspensão obtida foi agitada com um bastão e, em seguida, filtrada em papel de filtro, de onde foram retirados 120ml e transferidos para um funil de separação de 500ml. Em seguida, foram adicionados 120ml de água destilada e 5 ml de clorofórmio. O conteúdo do funil foi agitado vigorosamente e, após separação das fases, foi recolhida a fase clorofórmica (inferior) em um frasco âmbar. A fração aquosa do funil foi extraída mais uma vez com 5ml de clorofórmio e concentrada no frasco âmbar até a secura, em placa aquecedora a 100°C.

#### 4.2.14.3. Cromatografia em camada delgada da esterigmatocistina

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada de acordo com Soarez e Rodriguez-Amaya (1989).

Foram utilizadas placas cromatográficas aluminizadas da Merck (código 1.05553), contendo sílica gel 60, sem indicador de fluorescência, de tamanho 20x20cm e de espessura 0,2mm, de acordo com Jones (1972).

A placa demarcada com "spots", localizados a 2cm da base inferior da placa, onde foram aplicadas as amostras e o padrão de esterigmatocistina. Foi delimitada uma linha de "front" de 12 cm da base da placa para limitar a fase móvel do sistema (solventes).

As amostras, previamente extraídas e purificadas, foram ressuspendidas em 1 ml de benzeno ou em 1 ml de acetonitrila. Em seguida, alíquotas de 10 $\mu$ l, tanto das amostras, quanto do padrão, foram aplicadas nos "spots" da placa cromatográfica.

A placa foi colocada verticalmente numa cuba cromatográfica, com tampa de vidro, saturada com sistema de solventes tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (60:40:0,5, v/v/v).

Após o sistema de solventes atingir a linha de front, a placa foi retirada da cuba, seca ao ar e observada sob câmara escura contendo uma lâmpada de luz ultra-violeta, de comprimento de onda de 365 nm, com emissão máxima de 125 watts, distante 30 cm da placa, de acordo com Jones (1972), para verificação de uma mancha de fluorescência vermelho-tijolo, característica da esterigmatocistina (Van Egmond *et al*, 1980).

Através de cada análise foi possível calcular a razão de fluxo de cada amostra, expressa pela fórmula:

$$RF = \frac{\text{Distância percorrida pela amostra}}{\text{Distância percorrida pelo solvente}}$$

#### 4.2.14.4. Testes confirmatórios para esterigmatocistina

Após a corrida cromatográfica, a placa foi borrifada com uma solução de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20% em etanol 75% e foi aquecida a  $110^\circ\text{C}$  por 10 minutos com posterior observação sob luz U.V. A identidade da toxina foi confirmada pela derivação da ST em 1,3,8-trihidroxixantona, uma substância de fluorescência amarela intensa, que é formada pela reação com o cloreto de alumínio, facilitando muito a sua visualização (Davies *et al.*, 1960).

#### 4.2.14.5. Cromatografia de fase reversa para dosagem da esterigmatocistina

As linhagens, tratadas e controle, foram crescidas em meio sólido de aveia, indutor da produção da ST, e posteriormente extraída e purificada quimicamente (Dezotti e Zucchi, 2001).

Uma vez que, o benzeno exerce uma grande interferência na leitura da curva em HPLC, foi utilizado como solvente a acetonitrila (Frisvad e Thrane, 1987). Em virtude dos resultados obtidos na cromatografia de camada delgada, quando comparamos, a força solubilizadora dos solventes benzeno e acetonitrila, e após verificarmos uma menor solubilidade das amostras em acetonitrila, promovemos uma adaptação na metodologia deixando a amostra mergulhada neste solvente por aproximadamente 10 minutos antes de aplicar no HPLC.

Foi utilizada uma coluna Microbondpack C18 marca Waters - 30cm / 3,9 mm. Foi utilizada como fase móvel A: ácido trifluoracético 0,05% e fase móvel B: 100% acetonitrila com fluxo de 1ml / minuto.

Foram injetados  $10\mu\text{l}$  das amostras e do padrão de ST, diluídos 1:2 em acetonitrila (concentração do padrão:  $20\mu\text{g/ml}$ ). O tempo de corrida foi de 50 minutos e feita a leitura em 245nm.

Os resultados obtidos a partir do tempo de retenção (RT) foram calculados por uma fórmula obtida a partir do programa ORIGIN de regressão linear feitas sobre as curvas traçadas da área em função das diferentes concentrações de ST.

Foram utilizadas as seguintes concentrações e obtidas as respectivas áreas:

Concentração de ST ( $\mu\text{g/ml}$ )	Tempo de Retenção (RT - minutos)	Área
5	21,4	1081676
10	21,52	2096284
20	21,74	3885557
⇓		⇓
Eixo X		Eixo Y

Regressão Linear:

Depois de feito o gráfico, os parâmetros forneceram a seguinte fórmula de regressão linear:

$$[ ] = \frac{\text{área (y)} - 187039,5}{185782,81}$$

$$Y = A + BX$$

|
|

ÁREA      [ ]

Esta fórmula foi utilizada para calcular cada concentração em função da área dada.

$$\text{Padrão: } 5 \mu\text{g/ml} = \frac{1081676 - 187039,5}{185782,81} = 4,8 \mu\text{g/ml}$$

$$10 \mu\text{g/ml} = \frac{2096284 - 187039,5}{185782,81} = 10,27 \mu\text{g/ml}$$

$$20 \mu\text{g/ml} = \frac{3885557 - 187039,5}{185782,81} = 19 \mu\text{g/ml}$$

#### 4.2.15. Obtenção de DNAs genômicos e plasmidiano

DNAs plasmidiano foram extraídos da bactéria *Escherichia coli* HB101, segundo Sambrook *et al.* (1989). DNAs de *A. nidulans* segundo Irelan *et al.* (1993).

##### 4.2.15.1. Dot blot das linhagens tratadas com RNA

Conídios das linhagens UT448, RT 1<sup>4</sup>, 2<sup>1</sup>, 2<sup>6</sup>, S1<sup>3</sup>, S1<sup>10</sup> e S1.2<sup>6</sup> foram inoculados em MC líquido e incubados durante aproximadamente 06 horas. O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo de Irelan *et al.* (1993). Aliquotas de 50,0 ng de DNA foram aplicadas na membrana de nylon (Boheringer Manhein Positively Charged) após desnaturação a 100°C.

O DNA foi fixado em U.V. As hibridizações procederam-se com o kit AlkPhos (Amersham Pharmacia Biotech), nas temperaturas de 62°C e 55°C, usando como sondas os plasmídeos pRA12, pRB78, pRP4, pRM12 e pRP4, respectivamente. Os resultados foram revelados após exposição da membrana em filme fotográfico durante 15 minutos. Os próprios plasmídeos foram usados como controles positivos.

#### 4.2.16. Relação entre o consumo de glicose, pH do meio de cultivo e o peso micelial

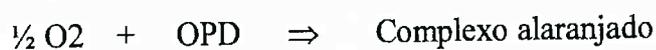
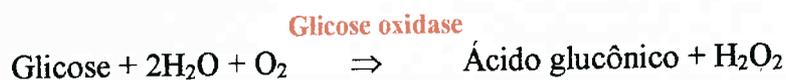
Com vistas a acompanhar a variação do pH durante os cultivos: as linhagens tratadas e controle foram incubadas em meio completo líquido em shaker sob agitação de 100 rpm a 37°C e foram coletadas as medidas do pH em paralelo com a análise do consumo da glicose durante 8 dias. Todo o experimento foi feito em triplicata.

Ao final deste cultivo os micélios foram imediatamente separados do meio de cultura, eliminando o excesso de meio através da prensagem em papel Whatman número 1 e posteriormente este foi colocado para evaporar em câmara de fluxo durante 12 horas com o objetivo de minimizar a interferência da água aderida à massa celular. Somente depois de tomadas as pesagens dos micélios (peso úmido) das colônias tratadas e controle, estes foram incubados a 80°C, por 4 dias (tempo necessário para se atingir o peso constante – Visser, 1967, Mahmoud, 1994) para secagem da massa fúngica.

#### 4.2.17. Determinação da Atividade da Glicose Oxidase

O método utilizado para determinar a atividade da glicose oxidase foi adaptado do método descrito por Spencer *et al.* (1998).

Por este método o peróxido de hidrogênio oxida a phenilenediamina (OPD) pela catálise da peroxidase (a reação segue abaixo), obtendo-se uma coloração alaranjada que foi medida a 450nm.



Neste experimento foi utilizada como fonte da enzima glicose oxidase o sobrenadante das linhagens tratadas e controle cultivadas em meio completo líquido por 6 dias em shaker a 37°C com rotação de 40 rpm. Este sobrenadante foi concentrado duas vezes no liofilizador.

Foram utilizados como reagente A: 0,5g de cromógeno (10g ácido cítrico + 14,5g de fosfato de sódio e 0,5g de OPD) em 19 mL de água destilada + 1mL de peroxidase (1mg/mL de salina) + 20mg/mL de glicose

Na reação foram adicionados 150µL do reagente A e 50 µL do sobrenadante do cultivo. Foi utilizado como branco de reação 50µL de salina e como controle positivo 0,5µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação ocorreu no escuro e foram feitas as leituras a cada 30 minutos durante o intervalo de 150 minutos.

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os protoplastos de *A. nidulans* após o tratamento com RNA, foram regenerados e formaram colônias com alterações nos genótipos e fenótipos da linhagem originalmente tratada. Embora as características das linhagens tratadas tenham sido alteradas em relação a linhagem controle e todas as evidências genéticas obtidas tenham indicado a ocorrência de eventos semelhantes ao da transformação genética, não obtivemos evidência física de que as linhagens que apresentaram genótipos e fenótipos alterados, diferentes da linhagem original, fossem transformantes verdadeiros, com insertos de segmentos exógenos no genoma.

Os resultados da análise da inserção do cDNA por *Dot blot*, nas linhagens tratadas com RNA, mostraram que as alterações encontradas são resultados do efeito do tratamento estressante com o RNA e não do efeito de inserções verdadeiras. Por outro lado, a alta instabilidade mitótica apresentada pelas linhagens não nos permitiu concluir se as inserções foram perdidas, durante os eventos de divisões celulares mitóticas e meióticas. Da mesma maneira, os resultados da cromatografia de exclusão molecular do sobrenadante das linhagens tratadas comprovou a ausência de insulina humana.

Por sua vez, o elevado número de alterações apresentadas pelas linhagens analisadas - desde alteração na expressão de alguns genes, até distorções na segregação das linhagens - não excluem a possibilidade de que cDNA retrotranscrito terem se inserido no genoma da linhagem receptora, mas somente através de criteriosa análise molecular este fato poderá ser afirmado. Este trabalho abre, portanto, a possibilidade de novos trabalhos com estas linhagens no sentido de esclarecer melhor esta questão.

Após o tratamento desta linhagem com RNA, selecionamos as linhagens sobreviventes, que, além de alterações nos marcadores genéticos: *riboA*, *pabaA*, *yA*<sup>+</sup>, *bioA* (I); *AcrA*, *wA*, *metA*<sup>+</sup> (II), apresentaram alto consumo do teor de glicose, quando cultivadas em meio completo líquido, contendo 10 g/L de glicose.

Cada uma daquelas linhagens que apresentaram o caráter de “rápido consumo de glicose” do meio de cultura, foi geneticamente, química e molecularmente analisadas.

Outro caráter investigado foi a possibilidade da linhagem receptora produzir micotoxina, a esterigmatocistina. Foi provado que o gene *stcZ*<sup>+</sup> está silenciado na linhagem receptora. A reativação deste gene é o melhor indicativo das alterações epigenéticas já apontadas por Dezotti e Zucchi (2001).

Visando a facilitar a exposição dos resultados, os quadros, tabelas e quadros latino seguem apresentados nos apêndices enquanto as figuras, gráficos e cromatogramas seguem nos anexos.

### 5.1 Análise genotípica dos protoplastos regenerados sem o tratamento com RNA heterólogo

Este ensaio foi realizado visando à obtenção de um experimento controle do tratamento, isto é, para termos certeza que o experimento de protoplastização juntamente com as manipulações e os reagentes utilizados no tratamento com o RNA não seriam suficientes para provocar as alterações nas linhagens utilizadas.

Os protoplastos tratados apenas com as soluções de tratamento (porém sem o RNA) e regenerados mantiveram genótipos 100% inalterados e idênticos aos da linhagem original UT448 (Tabela 5.1). Este experimento foi concordante com os resultados obtidos por Zucchi *et al.* 1989; Zucchi, 1996 e Pires e Zucchi, 1998. Pode-se concluir, portanto, que tanto a protoplastização quanto o tratamento com as soluções envolvidas no tratamento não afetaram a expressão dos genes da linhagem “master” UT448, evidenciando que somente o tratamento com RNA causou as alterações observadas neste trabalho.

Tabela 5.1. Genótipo dos protoplastos regenerados sem tratamento com RNA

Linhagens	Cor	SM	-ri	-pa	-bi	-meth	-pyro	+acr	Qtde.
UT448 Controle	B	+	-	-	-	+	+	acrR	10
UT448 Protoplastos	B	+	-	-	-	+	+	acrR	250

### 5.2 Análise genotípica das linhagens tratadas com RNA e dos seus setores mitóticos resultantes

A análise genotípica das linhagens tratadas de *A. nidulans* haplóide, foi comparada com a linhagem controle UT448 não tratada. As análises evidenciaram o impacto causado pelo tratamento com RNA sobre o genoma desta linhagem, de forma ectópica, porém sistemática. Estas análises focalizaram algumas características fenotípicas e genotípicas. Embora ainda não se tenha definições moleculares do processo, há que se considerar que estas alterações promovidas no genoma levaram às alterações no comportamento genético, mitótico e meiótico, das linhagens submetidas ao tratamento com agente biológico RNA (Quadro 3, Figuras 1; 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 e 2.6).

A primeira e mais visível das alterações promovidas pelo tratamento com RNA foi a alteração da cor dos conídios das colônias regenerantes: a receptora, originalmente com conídios brancos (Figura 1) ( $wy^+$ ), resultou em inúmeras colônias tratadas de cor verde ( $w^+y^+$ ) (Figuras 2.1, 2.2, 2.3, e 2.5), de crescimento normal e conidiação abundante. A reativação de genes  $wA$  (II) para  $w^+$ , sugere uma "reversão" da mutação  $wA2$ . Houve também o aparecimento de colônias normais amarelas que, por sua vez, sugerem, além da reativação de  $wA$ , o silenciamento ou inativação do gene  $y^+$ , da via biossintética da lacase (Figuras 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 e 2.6 e Quadro 3). Estas evidências de alternância de estados de expressão dos mesmos genes resultantes de um mesmo processo, não são as primeiras a serem observadas. Zucchi (1996) e Pires e Zucchi (1998) já observaram, em outros enfoques usando o tratamento com RNA, este comportamento típico de silenciamento e de reativação de expressão de genes, de uma determinada proteína ou dos genes que controlam sua expressão.

Os indícios genéticos mais visíveis de que as linhagens tratadas estudadas (Quadro 3) apresentam alterações em sequências de DNA, vêm das observações de setores mitóticos de primeira e de segunda ordem, espontâneos e conspícuos, que surgem nas colônias monospóricas. Estes setores mostram alterações na expressão dos genes para requerimentos nutricionais, de resistência a agentes anti-fúngicos, e dos genes que controlam funções vitais das células (mitose, meiose, recombinação, reparo, diferenciação celular, etc).

Todas as linhagens tratadas e eficientes no consumo de glicose apresentaram alterações nos seus requerimentos nutricionais, muitos com genótipo selvagem para os requerimentos riboflavina (*ribo*), ácido  $p$ -amino benzóico (*paba*) e biotina (*bi*). A linhagem RTS1<sup>3</sup>, que é um setor de primeira ordem da RT 1<sup>3</sup>, foi a única linhagem tratada que apresentou alteração nos passos da biossíntese de metionina, passando de *met*<sup>+</sup> para *met*; esta linhagem apresentou ainda aparente "reversão" da mutação *AcrA1*, passando de acriflavina resistente (*AcrRA1*) para acriflavina sensível (*AcrS*) (Quadro 3).

A análise genotípica dos 22 setores obtidos de cada linhagem, nos permitiu visualizar uma variedade de alterações nos seus genomas, que podem ser tanto consequência da presença de material genético em excesso como do processo de defesa genômica, desencadeado por prováveis fragmentos de sequências de cDNA exógeno. Todos os setores de 1.<sup>ª</sup> ou de 2.<sup>ª</sup> ordem mostraram genótipos diferentes das linhagens tratadas orginais, tendo alterado praticamente todos os marcadores genéticos focalizados, silenciando-os ou reativando-os por processos mitóticos.

Estes resultados preliminares nos permitiram sugerir duas hipóteses:

a) O tratamento promoveu rearranjos no genoma do UT448 receptor, desencadeando os mecanismos de defesa genômica do fungo receptor que podem causar alterações no padrão de metilação, acetilação ou muitos outros mecanismos já descritos. Os setores espontâneos mitóticos seriam evidências visíveis dos efeitos destes mecanismos epigenéticos no genoma.

b) Os insertos foram perdidos por crossing-over em alça intra-cromossômica, ou levaram ao pareamento de sequências homólogas às sequências residentes. O pareamento do DNA seria o sinal necessário para desencadear os mecanismos de silenciamento de uma das sequências duplicadas, comuns a todos eucariotos. Ambos processos resultam na perda do caráter exogeneamente introduzidos além de inviabilizar a expressão de alguns genes residentes.

Todas as possibilidades apresentadas aqui podem gerar grande variabilidade na expressão e estabilidade dos genes das linhagens tratadas.

**Quadro 3: Análise genotípica das linhagens tratadas, em meio seletivo**

Colônias	Cor	SM	- ribo	- paba	- bi	- met	- piro	Acr	MM
RT 1 <sup>4</sup>	V	+	+	+	+	+	+	R	+
RT 2 <sup>1</sup>	V	+	+	+	+	+	+	R	+
RT 2 <sup>6</sup>	V	+	+	+	+	+	+	R	+
RTS1.2 <sup>6</sup>	B	+	+	+	+	+	+	S	+
RT S1 <sup>3</sup>	A	+	+	+	+	-	+	S	-
RT S1 <sup>10</sup>	V	+	+	+	+	+	+	R	+
UT448	B	+	-	-	-	+	+	R	-

Coloração dos conídios das linhagens: V (Verde), A (Amarelo) e B (Branco).

Crescimento das linhagens: + (indica crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura) e - (indica o não crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura).

Resistência à Acriflavina: S (indica que a colônia é sensível à Acriflavina) e R (indica que a colônia é resistente à Acriflavina).

### 5.3 Instabilidade Mitótica

Todos os sobreviventes ao tratamento com RNA, apresentaram instabilidade mitótica gerando, espontaneamente, macro e micro setores nas colônias. Os macro setores surgem precocemente nas colônias e ocupam grande área (origem próxima ao centro da colônia) e os micro setores surgem tardiamente, próximos à periferia e com reduzida área. Alguns destes setores das linhagens tratadas mostraram a restauração do genótipo e fenótipo da linhagem originalmente tratada com RNA, mostrando que as novas características podem reverter simultânea ou independentemente, com frequências que variaram de 22,7% (RT1<sup>4</sup>), 9% (RT2<sup>1</sup> e RTS1<sup>10</sup>), 18,0% (RT2<sup>6</sup>), (Quadros 3.1, 3.2, 3.3, e 3.4). O setor de segunda ordem (obtidos a partir dos sobreviventes ao tratamento) RTS1<sup>10</sup> (conidiação verde) mostrou-se ainda muito instável, enquanto que os setores RTS1<sup>3</sup> (conidiação amarela) e RTS1.2<sup>6</sup> (conidiação branca) atingiram a estabilidade mitótica apesar das alterações apresentadas nos seus genomas. Estes dois setores não se mostraram instáveis quando replicados para as 20 placas de MC (não apresentaram setores).

Através da análise da instabilidade mitótica foi possível verificar o impacto que o tratamento causou nas linhagens tratadas (Gráficos: 1 e 2). A coloração dos conídios da linhagem controle UT448, receptora do RNA, é branca ( $w^+$ ), e as linhagens regeneradas apresentaram conídios coloridos ( $w^+$ ) (Figuras: 2.1; 2.2; 2.3; 2.4, 2.5; 2.6), mostrando portanto, a reativação da expressão do gene  $w$ , ou de genes que regulam a sua expressão.

Algumas colônias também apresentaram, o caráter deteriorado (*det*), ou seja, que faz com que a colônia apresente a morfologia alterada com pouca conidiação, compacta e escura (Tabela: 5.3.1).

Foram observadas, ainda, alterações das necessidades dos requerimentos nutricionais: alguns dos setores obtidos apresentaram genótipos diferentes dos genótipos do controle, tornando-se, prototróficos ou auxotróficos para um ou mais genes, simultaneamente (Quadros 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4). Com relação à resistência à acriflavina, alguns setores tornaram-se sensíveis quando comparados com a UT448 (Quadros: 3.1; 3.2; 3.3 e 3.4).

O número de setores obtidos por colônia a partir das linhagens tratadas foi muito alto, provando que o tratamento é realmente estressante para as células. Resultados obtidos por Zucchi (1975) e por Azevedo (1971) com linhagens A (*Dp* I-II) C e D (*Dp* III-VIII) e Z1 (*Dp* I-II) portadoras de duplicação simples (um único segmento de DNA em duplicata), mostraram também alta instabilidade mitótica, levando à produção espontânea de setores. As frequências de setores destas linhagens, no entanto é bem inferior à instabilidade das linhagens tratadas com RNA (Gráficos 1 e 2).

**Tabela 5.3.1: Instabilidade mitótica das linhagens tratadas com RNA medida pela frequência de setores espontâneos (macros e micros) de 20 colônias em meio completo**

Linhagens		UT448 (Controle)	RT 1 <sup>4</sup> (Verde)	RT 2 <sup>1</sup> (Verde)	RT 2 <sup>6</sup> (Verde)	RT S1 <sup>10</sup> (Verde)
<b>M</b>	<b>B</b>	00	26	10	10	25
<b>A</b>	<b>Bdet</b>	00	00	00	00	04
<b>C</b>	<b>A</b>	00	28	13	12	20
<b>R</b>	<b>V</b>	00	09	04	07	01
<b>O</b>	<b>Vdet</b>	00	33	13	10	16
	<b>Cha</b>	00	02	00	00	01
Total de Macro Setores		00	98	40	39	67
<b>M</b>						
<b>I</b>	<b>B</b>	00	17	20	22	22
<b>C</b>	<b>A</b>	00	08	20	10	23
<b>R</b>	<b>V</b>	00	02	02	00	02
<b>O</b>	<b>Vdet</b>	00	00	00	00	01
Total de Micro Setores		00	27	42	32	48
<b>Total de Setores</b>		<b>00</b>	<b>125</b>	<b>82</b>	<b>71</b>	<b>115</b>

#### 5.4. Análise dos cruzamentos meióticos

As análises meióticas e mitóticas, via ciclo sexual e parassexual respectivamente, podem fornecer outras informações que permitirão uma melhor verificação da extensão dos danos promovidos no comportamento genético das linhagens tratadas, já que as alterações podem afetar as frequências de recombinação (FR), a segregação dos alelos envolvidos nos cruzamentos e a distribuição das classes parental e recombinante. Estas alterações são evidências da ocorrência de alterações ectópicas, afetando indiferentemente qualquer intervalo cromossômico de modo a sugerir alterações no “linkage” dos diferentes marcadores genéticos. Os quadrados latinos, com as análises genéticas completas dos cruzamentos realizados estão apresentados nos apêndices.

De modo geral, as meioses mostraram drásticas reduções da viabilidade dos produtos meióticos (ascósporos). Por isto, todas as análises, envolveram os segregantes meióticos de 10 cleistotécios, em cada experimento.

Foram feitos os cruzamentos meióticos das linhagens tratadas com as linhagens master UT 196 e UT 448. Aproximadamente 100 colônias segregantes foram analisadas em cada cruzamento, e estes resultados estão apresentados nas tabelas 5.4.1 a 5.4.10. Os quadrados latinos referentes a estas tabelas estão no apêndice (Quadrados latinos do 1 ao 9).

Não foi possível obter o cruzamento da linhagem RT S1.2<sup>6</sup> com nenhuma linhagem Master, devido a algum tipo de incompatibilidade na formação dos heterocários.

A análise de todos os cruzamentos meióticos indicou alteração entre as classes parentais. No cruzamento 1<sup>4</sup>X448 (tabela 5.4.1) foi possível verificar que somente 13% dos segregantes correspondiam à linhagem master UT 448. O mesmo resultado foi verificado nos cruzamentos 2<sup>1</sup>X448; 2<sup>6</sup>X448; S1<sup>10</sup>X448; 2<sup>6</sup>X196; S1<sup>10</sup>X196 (tabelas 5.4.2; 5.4.3; 5.4.5; 5.4.8; 5.4.10) sendo que, destes cruzamentos, o S1<sup>10</sup>XUT448 não segregou a classe parental UT448.

Por outro lado os cruzamentos meióticos da linhagem RTS1<sup>3</sup> com as Master UT448 e UT196 também foi anômala mas desta vez houve redução da classe parental tratada (tabela 5.4.4 e 5.4.9), talvez porque esta linhagem era a única que apresentava requerimento para l-metionina (*met*).

Dos cruzamentos citados foi possível verificar a “reversão” do *acrR* para *acrS* em 81% dos segregantes do cruzamento RT1<sup>4</sup>X448; 93% em RT2<sup>1</sup>X448; 95% em RT2<sup>6</sup>X448; 74% do RT2<sup>6</sup>X196 (tabelas 5.4.1; 5.4.2; 5.4.3; 5.4.8).

O cruzamento meiótico das linhagens RT2<sup>6</sup>XUT448 mostrou acentuada alteração no padrão de segregação alélica (diferente de 1:1) e consequentes alterações nas frequências de recombinação. As alterações são estáveis e permanecem na progênie, ou seja, o processo meiótico foi incapaz de restaurar as alterações promovidas pelo tratamento. Apresentamos na tabela 2 alguns resultados resumidos a partir do quadrado latino 5 do apêndice

Tabela 2: O cruzamento RT2<sup>6</sup>XUT448 homocigoto para *acrR* e *y*<sup>+</sup> mostrou segregação anômala dos alelos, mutantes e selvagem destes genes, e inativação de *y* e reversão do *acrR*.

UT448	+	<i>y</i>	<i>acrR</i>	<i>acrS</i>
*RT2 <sup>6</sup>				
<i>y</i>			5	
+	93			
<i>acrS</i>				94
<i>acrR</i>			4	

\* Nota: -azul indica o genótipo da linhagem tratada; - negrito indica o genótipo da linhagem Master (os mesmos critérios serão usados nas tabelas subsequentes).

O cruzamento meiótico S1<sup>10</sup>X448 (quadrado latino 7, tabela 5.4.5) apresentava-se homozigoto para os genes *met*<sup>+</sup> e *pi*<sup>+</sup>. Alguns resultados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3: O cruzamento RT S1<sup>10</sup>XUT448 homozigoto para *met*<sup>+</sup>, *piro*<sup>+</sup>, apresentou inativação destes genes e reativação de *paba*.

	UT448	<i>pa</i>	+	+	<i>met</i>	+	<i>pi</i>
RTS1 <sup>10</sup>							
+							
<i>pa</i>		03					
<i>met</i>					02		
+							
<i>pi</i>							02
+							

\* valores em: vermelho indicam alteração na segregação (segue o mesmo para as demais tabelas)

O cruzamento RT1<sup>4</sup>XUT196 homozigoto para os genes *ri*<sup>+</sup>, *pa*<sup>+</sup>, *bi*<sup>+</sup> apresentou acentuada inativação do gene *bi*<sup>+</sup> (11% tornaram-se *bi*) foram também inativados os genes *met*<sup>+</sup> e *piro*<sup>+</sup>, dados extraídos do quadrado latino 8 (no apêndice) e apresentados na tabela 4.

Tabela 4: O cruzamento RT 1<sup>4</sup>XUT196, homozigoto para *bi*<sup>+</sup>, apresentou inativação deste gene e também dos genes *met*<sup>+</sup> e *piro*<sup>+</sup>.

	UT196	<i>bi</i>	+	+	<i>met</i>	+	<i>pi</i>
RT1 <sup>4</sup>							
+							
<i>bi</i>		11					
<i>met</i>					63		
+							
<i>pi</i>							63
+							

O cruzamento RTS1<sup>3</sup>XUT196, homocigoto para *acrS* e *met*, apresentou reativação do gene *acrR* (quadrado latino 9) e do gene *met*<sup>+</sup>, estes dados seguem apresentados na tabela 5.

Tabela 5: O cruzamento RT S1<sup>3</sup>XUT196, homocigoto para *acrS* e *met*, apresentou reativação destes genes .

UT196	<i>met</i>	+	<i>acrS</i>	<i>acrR</i>
RTS1 <sup>3</sup>				
+		69		
<i>met</i>	55			
<i>acrR</i>				68
<i>acrS</i>			56	

### 5.5. Análise dos cruzamentos mitóticos

As linhagens tratadas também foram analisadas via ciclo parassexual. Os diplóides obtidos deste cruzamento com a linhagem master UT184 foram haploidizados em MC contendo *p*-fluorfenilalanina (pFA). Foram analisados 173 segregantes mitóticos diplóides RT1<sup>4</sup>//UT184; 168 do diplóide 2<sup>1</sup>//184; 208 do diplóide 2<sup>6</sup>//184; 127 segregantes diplóides do S1<sup>3</sup>//184 e 145 colônias do S1<sup>10</sup>//184. Estes resultados encontram-se nas tabelas de 5.5.1 à 5.5.5 e nos quadrados latinos de 10 à 14 (nos apêndices).

A distorção entre os parentais P1:P2 pode ser visualizada em todos os cruzamentos mitóticos, já que a frequência do parental da linhagem master UT184 foi de cerca 0% em quase todos os cruzamentos.

Nos cruzamentos mitóticos com a linhagem UT184 os diplóides apresentaram segregações alélicas semelhantes, principalmente com relação aos genes relacionados as outras fontes de C: *gal*, *lac*, *fac*. Todos os cruzamentos heterozigotos para estes genes (tabelas 5.5.1; 5.5.2; 5.5.3; 5.5.5 e quadrados latinos 10, 11, 12, 14) apresentaram reativação destes genes. Esta reativação fica demonstrada até mesmo no cruzamento RTS1<sup>3</sup>//UT184 (tabela 5.5.4 e quadrado latino 13) que é homozigoto para *gal*, *lac*, *fac* e estes aparecem reativados nos segregantes diplóides, onde a distorção chega a 1:6 para o gene *fac* (tabela 6).

Tabela 6: Cruzamento mitótico RT S1<sup>3</sup>//UT184 homozigoto para os genes *gal*, *lac*, *fac* mostrando aparente reativação destes genes.

	UT184	<i>gal</i>	+	<i>fac</i>	+	<i>lac</i>	+
RTS1 <sup>3</sup>							
+			87				
<i>gal</i>		40					
+				110			
<i>fac</i>			17				
+							86
<i>lac</i>						41	

Da mesma forma, neste cruzamento (RTS1<sup>3</sup>//UT184) homocigoto para *pa*<sup>+</sup>, *bi*<sup>+</sup>, *s* foi possível verificar distorções entre os diplóides indicando inativação de *pa* e *bi* e reativação de *s*, os resultados são indicados na tabela 7.

Tabela 7: Cruzamento mitótico RT S1<sup>3</sup>//UT184, homocigoto para os genes *pa*<sup>+</sup>, *bi*<sup>+</sup>, *s*, mostraram inativação de *pa* e *bi* e reativação de *s*.

	UT184	+	<i>pa</i>	+	<i>bi</i>	<i>s</i>	+
RTS1 <sup>3</sup>							
<i>pa</i>			35				
+		92					
<i>bi</i>					44		
+				83			
+							97
<i>s</i>						30	

Outro fato típico de características epigenéticas neste cruzamento é a ausência da classe parental (P1 - UT184 = 0% e P2 - RT1<sup>4</sup> = 32,3%). A elevada distorção entre os parentais P1: P2, não pode ser atribuído ao processo de fertilização/haploidização. O cruzamento controle UT448//UT184 (quadrado latino 2) apresentou segregação dos parentais de 1:1.

A análise mitótica do diplóide RT1<sup>4</sup>//UT184 evidenciou a segregação anômala de alguns alelos (1:4). A distorção da segregação ocorre provavelmente devido a redução das classes segregantes, portadoras do alelo mutante. Os resultados obtidos (Tabela 5.5.1, quadrado latino 10 no apêndice), indicam segregação anômala, para todos os genes. Entre os segregantes apareceu o caráter *det*, ausente nas classes parentais. O caráter *det* foi o que apresentou maior discrepância na segregação 1:28. Este caráter só surgiu durante o processo de haploidização do diplóide, o que permite especular-se sobre o silenciamento de genes de desenvolvimento, envolvidos na conidiação, conhecidos por serem características típicas epigenéticas.

A análise do cruzamento mitótico entre as linhagens RT2<sup>6</sup> e UT184 (tabela 5.5.3 e quadrado latino 12) evidenciou a segregação alélica anômala de alguns genes, os quais não apresentaram uma segregação mendeliana típica (1:1), dentre eles, os genes *Acr*, *s*, *gal*, *piro*,

*fac*, *lac* e *nic* que apresentaram proporção 1:5. Enquanto o gene que apresentou maior discrepância na segregação também foi o gene *det* que apresentou a frequência de 1:68.

As distorções da segregação alélica, das frequências de recombinação e da distribuição das classes recombinantes e parentais, em todos os genes e intervalos gênicos, de forma sistemática indicam, que os alelos mutantes, de modo geral, são excluídos seletivamente (ou reativados) durante os processos da fertilização, formação de diplóide e haploidização.

A análise dos segregantes haplóides dos diplóides RT1<sup>4</sup>//UT184; RT2<sup>1</sup>//UT184; RT2<sup>6</sup>//UT184; RTS1<sup>10</sup>//UT184 (tabelas 5.5.1; 5.5.2; 5.5.3; 5.5.5 e quadrados latinos 11; 12; 13; 15), evidenciou a segregação anômala de alguns alelos, que não apresentaram segregação mendeliana típica (1:1). Dentre os genes que apresentaram maior discrepância na segregação do cruzamento RT2<sup>1</sup>//UT184 foram, da mesma forma que do diplóide RTS1<sup>3</sup>//UT184 (tabela 6), relacionados a degradação de outras fontes de carbono no *lac* (1:10), *gal* e *fac* (1:12). Estes dados extraídos do quadrado latino 11 (em apêndice) são apresentados na tabela 8.

Tabela 8: Alterações nas expressões dos genes *gal*, *lac*, *fac* mostrando que estes foram reativados no cruzamento mitótico RT 2<sup>1</sup>//UT184.

	UT184	<i>gal</i>	+	<i>fac</i>	+	<i>lac</i>	+
RT2 <sup>1</sup>							
+							
<i>gal</i>		13					
+							
<i>fac</i>				13			
+							
<i>lac</i>							15

A análise da frequência de recombinação deste cruzamento (RT2<sup>1</sup>//UT184), quando comparado ao cruzamento controle UT448//UT184 (Quadrado latino 2), evidenciou elevada alteração em relação à diversos genes, dentre eles, a elevada frequência de recombinação do gene *acr* com os demais genes, da ordem de 90% são indícios do drástico efeito do tratamento, que alterou a expressão dos genes essenciais que controlam sua expressão e/ou segregação, dados extraídos do quadrado latino 11.

## 5.6 Análise do consumo da glicose em meio completo líquido

O tratamento com o RNA heterólogo provocou algumas alterações nas características da linhagem receptora tais como alterações morfológicas e alta instabilidade. Também foi possível verificar acentuada variação na capacidade de consumir a glicose do meio de cultura.

Tendo em vista a dificuldade de precisar a fase ideal do crescimento fúngico que potencializaria a produção do fator de consumo da glicose, foi realizado o cultivo até o consumo total da glicose do meio de cultura com o objetivo de analisar este fenótipo nas diferentes fases. Apesar da controvérsia em torno do tempo necessário para atingir a idiofase (fase de produção de metabólitos secundários) foi estabelecida uma metodologia que permitiu a comparação da taxa de consumo da glicose durante a trofofase (fase de crescimento e do metabolismo primário) e durante a idiofase.

A aeração constante, melhorada com a agitação também constante, tende a manter o fungo na primeira fase (Gupta *et al.*, 1971; Lourenço, 1996) quando espera-se uma maior produção do fator de consumo da glicose, uma vez que, sendo responsável pelo aporte energético do sistema, e portanto de grande importância para o microrganismo, era esperado encontrar sua produção acentuada nesta fase. Em contrapartida, foi realizado, concomitantemente, o cultivo em condições que favorecessem o metabolismo secundário, crescimento estático a 28°C.

A análise dos quadros 4 e 5, bem como, dos gráficos 3 e 4, são indícios de que o fator responsável pelo consumo da glicose resultou de um metabolismo secundário, já que ocorreu um aumento do consumo da glicose no segundo cultivo, estático e a 28°C, (Quadro 5, Gráfico 4). O efeito altamente estressante pode também ter alterado os genes reguladores ou responsáveis pelas fases de crescimento nas linhagens tratadas, prolongando a trofofase e com isto a produção do fator, caso este seja produto do metabolismo primário.

De maneira geral, excetuando-se a linhagem RTS1<sup>10</sup> no experimento a 37°C todas as linhagens, nos dois experimentos (a 37°C e a 28°C) consumiram a glicose mais rapidamente que a linhagem controle UT448. Dessa forma, o alto consumo da glicose, evidenciado em todas as linhagens tratadas, reflete o quadro de alta desorganização do metabolismo do fungo em resposta ao estresse provado pelo tratamento.

Quadro 4: Dosagem da glicose residual do meio de cultura a 37°C

Linhagens Período	UT448	RT 1 <sup>4</sup> (mg/dL)	RT 2 <sup>1</sup> (mg/dL)	RT 2 <sup>6</sup> (mg/dL)	RT S1 <sup>3</sup> (mg/dL)	RT S1 <sup>10</sup> (mg/dL)	RT S1.2 <sup>6</sup> (mg/dL)
0h	798	798	798	798	798	798	798
18h	792	765	771	770	769	745.5	780
42h	807	770	755	750	770	760.5	784
66h	655.5	616.5	666	642	577.5	770	714
90h	537	522	586.5	549	477	648	607.5
114h	417	321	403.5	406.5	258	518	486
138h	318	255	292.5	288	54.5	502	456
162h	286.5	117.5	226.5	146.5	0	412	250
186h	169.5	51	147	87	0	387	140

Quadro 5: Dosagem da glicose residual do meio de cultura a 28°C

Linhagens Período	UT448	RT 1 <sup>4</sup> (mg/dL)	RT 2 <sup>1</sup> (mg/dL)	RT 2 <sup>6</sup> (mg/dL)	RT S1 <sup>3</sup> (mg/dL)	RT S1 <sup>10</sup> (mg/dL)	RT S1.2 <sup>6</sup> (mg/dL)
0h	798	798	798	798	798	798	798
18h	765	800	727.5	801	810	815	802.5
42h	760	767	750	792	800	800	797
66h	691.5	777	735	780	790	784	775.5
90h	534	480	645	687	729	666	507
114h	585	402	471	384	453	561	282
138h	492	273	309	306	324	303	189
162h	339	159	120	99	180	120	105
186h	255	102	78	72	123	101	39
210h	87	36	16	0	18	0	0

A análise do consumo da glicose é mais um indicador da instabilidade observada nas linhagens tratadas, dada a grande variação do consumo de glicose entre as linhagens analisadas nos diferentes tempos de cultivo. Dentre as linhagens analisadas, a linhagem RT S1.2<sup>6</sup>, linhagem mitoticamente estável, apresentou elevado consumo de glicose durante o cultivo à 28°C, maior do que as outras linhagens. Na temperatura de 37°C o maior consumo da glicose foi feita pela linhagem estável RT S1<sup>3</sup>. Dessa forma, é possível concluir que as linhagens setores de primeira ordem mitoticamente estáveis, conseguiram manter as características de rápido consumo de glicose após os “rounds” mitóticos (Gráfico 3, 4 e Quadro 4, 5).

No cultivo a 28°C a linhagem RT S1.2<sup>6</sup> reduziu 95,1% da glicose do meio até o tempo de 186h, o segundo maior consumidor neste cultivo foi sua linhagem original RT 2<sup>6</sup>, que reduziu 90,9% da glicose do meio de cultura no mesmo tempo.

A linhagem RT S1<sup>3</sup> consumiu a 37°C em 138h 93,1% da glicose. Esta linhagem zerou a glicose do meio com 162h de cultivo enquanto a RT 1<sup>4</sup> tinha consumido somente 85,27%.

Cabe ressaltar aqui, que apesar do alto teor de consumo de glicose manifestado por quase todas as linhagens, praticamente nenhum dos resultados obtidos se repetiu nos dois cultivos. A linhagem RT S1<sup>3</sup> que mais consumiu glicose no cultivo a 37°C, não o fez no cultivo a 28°C. Da mesma maneira, a linhagem RT S1.2<sup>6</sup> que mais consumiu glicose no cultivo a 28°C, no cultivo a 37°C foi uma das linhagens que consumiu a glicose mais lentamente. A variação se repete: a linhagem RT S1<sup>10</sup> que apesar de ter consumido a glicose mais lentamente no cultivo a 28°C, quando comparada com as outras linhagens do mesmo cultivo, a 37°C foi a que apresentou o menor consumo de glicose, inclusive quando comparada com a linhagem controle UT448.

A análise do teor de glicose consumido pela linhagem controle, também variou consideravelmente nos dois cultivos. No cultivo a 28°C esta linhagem reduziu no tempo 186h 68,04% da glicose do meio, enquanto para o cultivo a 37°C no mesmo tempo a linhagem reduziu 78,75% da glicose. Esta variação no comportamento das linhagens de um cultivo para outro era esperada, uma vez que, cada linhagem apresenta um comportamento para uma variação mínima em um determinado ambiente. Mas a variação considerável do teor de consumo de glicose de um cultivo para outro, nos dá informações sobre o efeito do

tratamento. Houve maior consumo da glicose por parte das linhagens tratadas a 28°C, ao contrário do resultado da linhagem controle que apresentou maior consumo a 37°C, assim, pode-se concluir que o fator responsável pelo consumo é potencializado nas condições que favorecem o metabolismo secundário, cultivo a 28°C estático. Embora seja prematuro afirmar que este fator seja de fato um metabólito secundário, devido ao efeito altamente estressante provocado pelo tratamento. Este tratamento pode ter promovido grandes alterações no ciclo celular e bioquímico das linhagens tratadas.

Assim, o alto consumo da glicose apresentado pelos setores estáveis pode indicar que a estabilidade mitótica é restabelecida mas a expressão do fator não é perdida neste processo. Isto é um forte indicativo de que o novo caráter represente alguma vantagem para o fungo nas condições do cultivo.

### **5.7 Análise do consumo da glicose em meio completo líquido a partir dos sobrenadantes filtrados e dos sobrenadantes sem filtrar**

Com o objetivo de analisar se o rápido consumo da glicose pelas linhagens tratadas era resultado da ação de alguma enzima extra-celular capaz de oxidar a glicose do meio de cultura, utilizamos como inóculo o sobrenadante obtido a partir do experimento anterior. A análise do consumo da glicose em MC líquido foi realizada com dois experimentos em paralelo sob as mesmas condições, variando somente o material inoculado.

No primeiro foram utilizados 100µL do sobrenadante filtrado em *millipore*. No segundo experimento, foram inoculados 100µL do sobrenadante com fungo (sem filtrar).

A concentração inicial de glicose no meio de cultura era de 410mg/DL. Os resultados obtidos em todas as linhagens são indicativos que a enzima provavelmente foi secretada para o meio de cultura e oxida a glicose mesmo sem a ação do fungo. Por outro lado, os dados do quadro 7 e gráfico 6 indicam que o consumo da glicose foi maior no experimento com o fungo, provavelmente devido ao fato da glicose ser utilizada como fonte de carbono para as linhagens, e ainda, devido ao aporte maior desta enzima no meio de cultura.

A linhagem controle UT448, no experimento com o fungo foi a que mais consumiu a glicose do meio (Quadros 6 e 7, Gráficos 5 e 6), provavelmente, porque nas linhagens tratadas, sua ativação seja tardia, ou dependa de um maior crescimento do fungo para sua acumulação. Salvo o consumo da glicose pela linhagem controle, os resultados

obtidos são concordantes com os anteriores, as linhagens RT S1<sup>3</sup>, RT 2<sup>6</sup> e RT S1.2<sup>6</sup> foram as que mais consumiram a glicose.

A análise da linhagem RT S1<sup>3</sup> nos dois experimentos mostrou resultados praticamente iguais em ambos, discordando com os resultados obtidos das outras linhagens, inclusive da linhagem controle.

**Quadro 6: Consumo da glicose do meio completo com sobrenadante das culturas filtrado**

Linhagens Período	UT448	RT 1 <sup>4</sup> (mg/dL)	RT 2 <sup>1</sup> (mg/dL)	RT 2 <sup>6</sup> (mg/dL)	RT S1 <sup>3</sup> (mg/dL)	RT S1 <sup>10</sup> (mg/dL)	RT S1.2 <sup>6</sup> (mg/dL)
48h	369	419	317	458	442	344	397
96h	394	323	290	430	253	247	336
Consumo de glicose (%)	-	22%	8%	6%	42%	28%	15%

**Quadro 7: Consumo da glicose do meio completo com sobrenadante bruto das culturas (sem filtrar)**

Linhagens Período	UT448	RT 1 <sup>4</sup> (mg/dL)	RT 2 <sup>1</sup> (mg/dL)	RT 2 <sup>6</sup> (mg/dL)	RT S1 <sup>3</sup> (mg/dL)	RT S1 <sup>10</sup> (mg/dL)	RT S1.2 <sup>6</sup> (mg/dL)
48h	334	352	339	327	410	331	367
96h	169	224	188	173	223	194	195
Consumo de glicose (%)	49%	36%	44%	47%	45%	41%	46%

## 5.8 Análise de proteínas

### 5.8.1. Dosagem de proteínas totais

Os cálculos das quantidades de proteínas totais secretadas foi feito com base no cálculo da curva padrão de Albumina de Soro Bovino (Gráfico 7).

A análise dos resultados indicaram um alto nível de proteínas expressas e secretadas pelas linhagens tratadas, quando comparadas com a linhagem controle UT448 (Quadro 8 e Gráfico 8).

Todas as linhagens analisadas apresentaram quantidades de proteínas totais superiores às secretadas pelas linhagem controle, variando de 34% a mais na linhagem RT 1<sup>4</sup> a 61% na linhagem RT 2<sup>1</sup>.

**Quadro 8: Dosagem de proteínas totais em linhagens tratadas com RNA**

<b>Linhagens</b>	<b>Absorbância (582nm)</b>	<b>Concentração de Proteína (µg/ml)</b>
UT448	0,035	336
RT1 <sup>4</sup>	0,133	444,8
RT2 <sup>1</sup>	0,221	542,6
RT2 <sup>6</sup>	0,192	510,4
RTS1 <sup>3</sup>	0,170	486
RTS1 <sup>10</sup>	0,172	488,2
RTS1.2 <sup>6</sup>	0,166	481,5

### 5.8.2. Cromatografia de exclusão molecular

A análise do perfil cromatográfico dos sobrenadantes das culturas não indicou diferenças qualitativas entre as linhagens tratadas e controle. Entretanto, diferenças quantitativas foram observadas de acordo com os resultados obtidos no ensaio do BSA.

O padrão de insulina humana utilizado eluiu da coluna com o tempo de retenção (RT) de 37,46 minutos (Cromatograma 1). Devido aos limites de resolução da coluna não foi possível separar um pico com o RT (tempo de retenção) semelhante ao da insulina nas

linhagens analisadas, já que, devido a composição do meio de cultura, havia muito material de baixo peso molecular nas amostras analisadas que eluíam junto com o pico de interesse.

Embora a análise dos perfis cromatográficos das linhagens tratadas, indiquem variação significativa nos níveis de proteínas secretadas, quando comparadas com o perfil apresentado pela linhagem controle, as amostras apresentaram perfis cromatográficos bastante similares, entretanto, os picos de todas as linhagens tratadas, foram muito mais elevados e com área relativa muito maior do que o da linhagem UT448 (Cromatograma 2).

O pico de RT 19,28 minutos da linhagem UT448, aparece muito maior nas linhagens RT1<sup>4</sup> (Cromatograma 3 - correspondente ao RT 19,60 minutos), RT2<sup>1</sup> (Cromatograma 4 - RT 19,50 minutos), RTS1<sup>10</sup> (Cromatograma 7 - 19,48 minutos) e na linhagem RTS1.2<sup>6</sup> (Cromatograma 8) corresponde ao pico preponderante com RT de 19,60 minutos. Nesta linhagem RTS1.2<sup>6</sup> todos os picos apresentam-se com áreas relativas muito maiores do que os da linhagem controle e das outras linhagens tratadas.

A linhagem RT1<sup>4</sup> apresenta também vários picos bastante pronunciados em relação ao controle, os picos com RT 21,56 minutos; 23,58 minutos; 24,43 minutos e 25,56 minutos também apresentam uma área relativa maior.

As linhagens RT2<sup>6</sup> (Cromatograma 5) e RTS1<sup>3</sup> (Cromatograma 6) apresentaram um perfil cromatográfico qualitativamente semelhante ao da linhagem controle, mas apresentaram também uma variação quantitativa significativa em relação a esta linhagem.

### **5.8.3. "Fast protein liquid chromatography" (FPLC)**

Devido a dificuldade de análise do pico que seria o correspondente ao da insulina, já que este estava eluindo juntamente com outros componentes, os picos com RT de aproximadamente 38,43 minutos da linhagem RTS1.2<sup>6</sup> e de 39,64 minutos da linhagem controle UT448 foram coletados em FPLC.

Estes picos foram fracionados em 3 picos pequenos:

Linhagem UT448 (Cromatograma 9)

Pico 1: 68 a 83

Pico 2: 84 a 94

Pico 3: 94 a 104

Linhagem RTS1.2<sup>6</sup> (Cromatograma 10)

Pico 1: 69 a 84

Pico 2: 85 a 96

Pico 3: 97 a 110

Os terceiros picos de ambas as linhagens foram coletados e reprocessados em HPLC de fase reversa.

#### **5.8.4. Cromatografia de fase reversa**

Após um fracionamento inicial através de gel filtração preparativa, as amostras correspondentes aos terceiros picos coletados no FPLC (item 5.8.3) foram analisados em HPLC de fase reversa, contra o padrão de insulina, que neste caso eluiu com RT de 15,30 minutos (Cromatograma 11).

Foi analisada somente a linhagem tratada RTS1.2<sup>6</sup>, pois, sendo esta a maior consumidora de glicose, a presença do fator de consumo da glicose, se tivesse peso molecular semelhante ao da insulina, seria facilmente detectado no sobrenadante desta linhagem.

As análises das amostras das linhagens UT448 (Cromatograma 12) e da linhagem RTS1.2<sup>6</sup> (Cromatograma 13) foram conclusivas, indicando a ausência de insulina nas amostras.

Dessa forma, foi completamente descartada a possibilidade da atividade da insulina como o fator responsável pelo rápido consumo de glicose nas amostras.

## **5.9. Análise do teor micotoxigênico das linhagens tratadas e controle**

### **5.9.1. Cromatografia em camada delgada da esterigmatocistina**

Contando com a assistência de outros integrantes do nosso grupo (Mariana Saldanha e Dra. Nanci Dezotti) verificamos um outro efeito do nosso tratamento: a ativação da produção de esterigmatocistina. Esta micotoxina não é produzida normalmente pela linhagem controle UT448, mas foi produzida em quantidades consideráveis nas linhagens tratadas (Figura 5 – cedida por Mariana Saldanha), este resultado é um indicador da ativação de genes pelo tratamento estressante com RNA e despertou um interesse no sentido de quantificar esta micotoxina e acompanhar este fenótipo, não só por ser um novo fator indicador do estresse provocado pelo tratamento, mas também por questões de melhoramento biotecnológico e de biossegurança.

### **5.9.2. Cromatografia de fase reversa para dosagem da esterigmatocistina**

As amostras foram submetidas à extração química e, após a confirmação da presença de esterigmatocistina na cromatografia de camada delgada (Figura 5), foram analisadas em HPLC de fase reversa (Frisvad e Thrane, 1987) para a dosagem da esterigmatocistina.

O padrão de esterigmatocistina (10µg/ml) eluiu com RT (tempo de retenção) de 21,52 minutos. Os cálculos feitos pelo Origen, indicaram praticamente a mesma concentração da amostra utilizada: 10,27µg/ml (Cromatograma 14).

A linhagem controle UT448 não apresentou um pico que pudesse ser identificado como correspondente ao da esterigmatocistina (Quadro 9 e Cromatograma 15)

Da mesma forma, a linhagem RTS1<sup>3</sup> não apresentou produção detectável (Cromatograma 19). A linhagem RT1<sup>4</sup> apresentou 2,79µg/ml (Cromatograma 16), a linhagem RT2<sup>1</sup> apresentou 2,34µg/ml (Cromatograma 17), a linhagem RT2<sup>6</sup> apresentou 11,8µg/ml (Cromatograma 18), RTS1<sup>10</sup> produziu 0,46µg/ml (Cromatograma 20).

Os resultados indicaram que o gene *stcZ* é expresso nas linhagens tratadas e encontra-se silenciado na linhagem controle. Este resultado sugere a reativação do gene da micotoxina, como um mecanismo de defesa genômica.

**Quadro 9: Quantificação da esterigmatocistina em HPLC**

<b>Linhagem</b>	<b>Tempo de retenção – RT (minutos)</b>	<b>Dosagem de esterigmatocistina (µg/ml)</b>
<b>Padrão ST</b>	21,52	10
<b>UT448</b>	-	-
<b>RT1<sup>4</sup></b>	23,9	2,79
<b>RT2<sup>1</sup></b>	23,26	2,74
<b>RT2<sup>6</sup></b>	23,2	11,8
<b>RTS1<sup>3</sup></b>	-	-
<b>RTS1<sup>10</sup></b>	24,7	0,46

**5.10. Análise do Dot Blot das linhagens tratadas com RNA e controle**

Para verificarmos se as linhagens tratadas com RNA apresentavam insertos de segmentos de DNA nos seus genomas que correspondessem ao gene da insulina humana, foram realizados ensaios de Dot blot.

Os DNAs dos plasmídeos pRA12, pRB78, pRP4 e pRM12 foram marcados e usados como sondas.

Os resultados estão apresentados nas figuras 3 e 4. Nenhuma das linhagens analisadas apresentou qualquer sinal de hibridização, revelando que não há insertos dos fragmentos da insulina humana em seus genomas. Foram usadas 04 diferentes construções. Cada uma representando uma região do gene, ou o próprio gene completo.

Embora não tenhamos observado a inserção de qualquer segmento do gene da insulina humana, o genoma destas linhagens apresenta outras alterações provocadas pelo tratamento com o RNA mensageiro total. A instabilidade (genotípica e fenotípica) das linhagens é o maior indício deste processo e possivelmente, durante as várias gerações mitóticas, as linhagens tratadas, que, buscando um equilíbrio genômico, eliminaram as sequências heterólogas no genoma, inclusive os segmentos referentes ao gene da insulina humana.

Figura 3: Eletroforese em gel de agarose (0,8%) mostrando os DNAs extraídos das linhagens tratadas de *A. nidulans* e da linhagem controle UT448

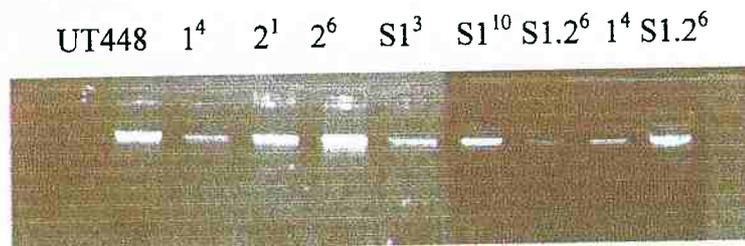
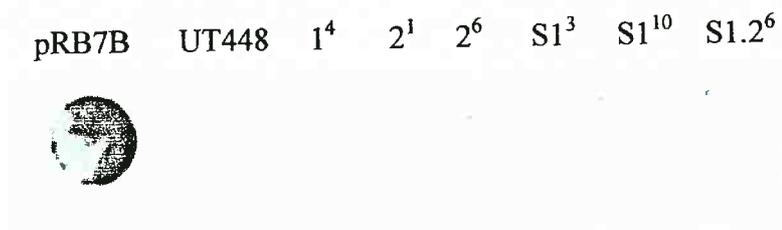


Figura 4: Dot blot das linhagens com a sonda pRB7B (cadeia B da insulina humana)



### 5.11. Relação entre o consumo de glicose, pH do meio de cultivo e o peso micelial

A análise da tabela 9 indica uma considerável variação do pH durante o cultivo das linhagens, variando do pH 5,7 ao 7,9. Estes dados indicam que não ocorreu a acidificação dos sobrenadantes das linhagens durante o cultivo, indício de que o metabolismo das linhagens não entrou no ciclo do ácido cítrico.

Estes dados são concordantes com a bibliografia, a qual sugere que o fungo só entraria nesta via a partir de concentrações muito altas de glicose (100g/L). Dessa forma, estes dados sugerem uma via alternativa.

Tabela 9: Consumo de glicose e variação do pH durante o cultivo das linhagens tratadas e controle

<b>Linhagens</b>	<b>UT448</b>	<b>RT 1<sup>4</sup></b>	<b>RT 2<sup>1</sup></b>	<b>RT 2<sup>6</sup></b>	<b>RT S1<sup>3</sup></b>	<b>RT S1<sup>10</sup></b>	<b>RT S1.2<sup>6</sup></b>
<b>Período</b>	<b>(mg/DL)</b> <b>pH</b>						
<b>0h</b>	724/5,88	724/5,7	724/5,86	724/5,7	724/5,8	724/5,98	724/5,87
<b>66h</b>	701/5,95	690/5,91	660/6,0	694/5,98	685/6,02	690/6,13	572/5,99
<b>90h</b>	625/6,2	495/6,32	510/6,45	470/6,1	410/6,6	530/6,9	445/6,3
<b>138h</b>	480/6,6	355/6,7	374/6,7	260/6,51	180/7,01	480/7,2	280/6,9
<b>162h</b>	401/7,2	197/6,95	240/7,01	147/7,0	103/7,48	378/7,7	96/7,3
<b>186h</b>	345/7,5	51/7,13	147/7,13	87/7,35	0/7,7	245/7,98	0/7,9

Os dados da tabela 10 indicam pequena variação no peso micelial entre as linhagens tratadas e a controle. As linhagens que apresentaram menor peso micelial foram as linhagens RT2<sup>1</sup> e RTS1<sup>10</sup>, que são também, as linhagens que aparentemente menos consumiram a glicose (Tabela 9). Por outro lado, a acentuada variação entre o consumo da glicose pelas linhagens tratadas (e seus setores) e pela linhagem controle não se repete em relação aos seus pesos miceliais.

O alto consumo de glicose pelas linhagens tratadas não parece ter uma relação direta com o crescimento celular, indicando que parte da glicose do meio de cultura foi oxidada e não utilizada para o crescimento celular.

Tabela 10: Peso micelial das linhagens tratadas e controle

<b>Linhagens</b>	<b>Peso Micelial Úmido (g)</b>	<b>Peso Micelial Seco (g)</b>
UT448 (controle)	25,37	0,99
RT1 <sup>4</sup>	25,63	1,02
RT2 <sup>1</sup>	19,00	0,79
RT2 <sup>6</sup>	23,17	0,97
RTS1 <sup>3</sup>	24,45	0,87
RTS1 <sup>10</sup>	17,36	0,77
RTS1.2 <sup>6</sup>	25,26	0,99

Com base nestes dados dentre outras evidências sugerimos que as linhagens tenham ativado o Shunt das Pentoses-fosfato, e com o objetivo de esclarecer este ponto resolvemos verificar se a enzima responsável pela rápida oxidação da glicose nas linhagens tratadas corresponde a glicose oxidase.

### 5.12. Determinação da atividade da glicose oxidase (GOD)

A análise dos resultados obtidos segundo método descrito por Spencer et al. (1998) nos permitiu concluir que as linhagens tratadas estão produzindo maior quantidade da glicose oxidase que a linhagem controle (Tabela 11 e Gráfico 9).

As linhagens que mais produziram esta enzima foram as linhagens que mais consumiram a glicose: RT S1.2<sup>6</sup> e RT S1<sup>3</sup>, indicando uma forte relação entre o fenótipo de consumo rápido da glicose e alta produção da glicose oxidase.

Tabela 11: Atividade da glicose oxidase em função do tempo

Tempo (minutos)	UT448	RT1 <sup>4</sup>	RT2 <sup>1</sup>	RT2 <sup>6</sup>	RTS1 <sup>3</sup>	RTS1 <sup>10</sup>	RTS1.2 <sup>6</sup>
30	0,039	0,075	0,064	0,067	0,073	0,045	0,076
60	0,069	0,101	0,091	0,099	0,115	0,078	0,109
90	0,099	0,168	0,161	0,166	0,179	0,120	0,185
120	0,106	0,204	0,198	0,206	0,216	0,141	0,225
150	0,131	0,221	0,213	0,216	0,228	0,197	0,241

Em paralelo ao experimento acima fizemos um teste rápido para verificar se houve a ação de alguma das catalases do fungo expressa extra-celularmente e interferindo nos resultados. Com esta finalidade utilizamos uma amostra com controle positivo do experimento 0,5µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e outra amostra com esta mesma quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5µL) e 50µL do sobrenadante da linhagem que mais consumiu a glicose RT S1.2<sup>6</sup>.

Os resultados obtidos seguem na tabela 12.

Tabela 12: Teste da influência de catalases extra-celulares na reação

Tempo (minutos)	Controle Positivo (50µL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ABS em nm	RTS1.2 <sup>6</sup> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + sobrenadante) ABS em nm
30	0,413	0,422
60	0,414	0,420

Com este experimento, era esperado que caso houvesse secreção da catalase no sobrenadante da linhagem tratada, o resultado obtido seria consideravelmente superior ao da primeira amostra com a ação enzimática só da peroxidase. Mas os resultados obtidos foram muito próximos, indicando que provavelmente as catalases, nas linhagens tratadas, tenham ficado aderidas ao micélio no momento da filtração, dado concordante com o encontrado na bibliografia que indica a ação das catalase intracelular e de membrana.

## VI. CONCLUSÕES

A análise genotípica das linhagens de *A. nidulans* tratadas com RNA e de seus setores nos permitiu visualizar uma grande alteração nos seus genomas, consequência do estresse provocado pelo tratamento.

A mitose e a meiose, reparo e recombinação, são os mecanismos mais apropriados para expor alterações de genes "silenciados".

Por sua vez, a elevada alteração do padrão mendeliano, esperada e encontrada nos processos meióticos e mitóticos, foi um dos efeitos do tratamento no genoma da linhagem receptora. As alterações das frequências de recombinação, em relação aos cruzamentos controles sugerem modificações relacionadas às várias alterações genômicas, incluindo-se a expressão de genes ou dos genes que controlam as suas expressões.

Estes resultados nos permitiram formular duas hipóteses:

a) O estresse do tratamento disparou os mecanismos de defesa genômica que envolvem silenciamento e ativação de genes.

b) O tratamento inativou genes importantes para replicação e para algumas funções essenciais das linhagens como a capacidade de entrar em mitose e meiose, resultando em fenótipos e genótipos variados. Este processo resultou na perda do caráter exogeneamente introduzido além de inviabilizar a expressão de alguns genes residentes.

As análises do consumo de glicose indicaram que o fenótipo de rápido consumo de glicose variou entre as linhagens e, apesar da instabilidade mitótica, persistiu durante todas as análises.

A alteração do padrão protéico confirmou que o tratamento promoveu a regulação de genes relacionados a expressão de proteínas.

Da mesma forma, a expressão da esterigmatocistina, comprovou que os mecanismos de ativação e inativação de genes foram acionados com o tratamento. Esta comprovação ficou evidente após os resultados das análises mitóticas e meióticas. O desencadeamento destas alterações foi causado pelo estresse do tratamento com RNA.

As análises dos pHs dos meios de cultivo, dos pesos miceliais, juntamente com o resultado obtido no experimento de "consumo de glicose em meio completo sem fungo (filtrado)" mostraram que a glicose foi oxidada e degradada no meio extra-celular devido a

ativação de uma via alternativa: o Shunt das Pentoses-fosfato. Isto confirma os dados encontrados na bibliografia que sugerem a localização extra-celular da glicose oxidase em *A. niger* e com este trabalho é possível fazer a mesma afirmação também para *A. nidulans*.

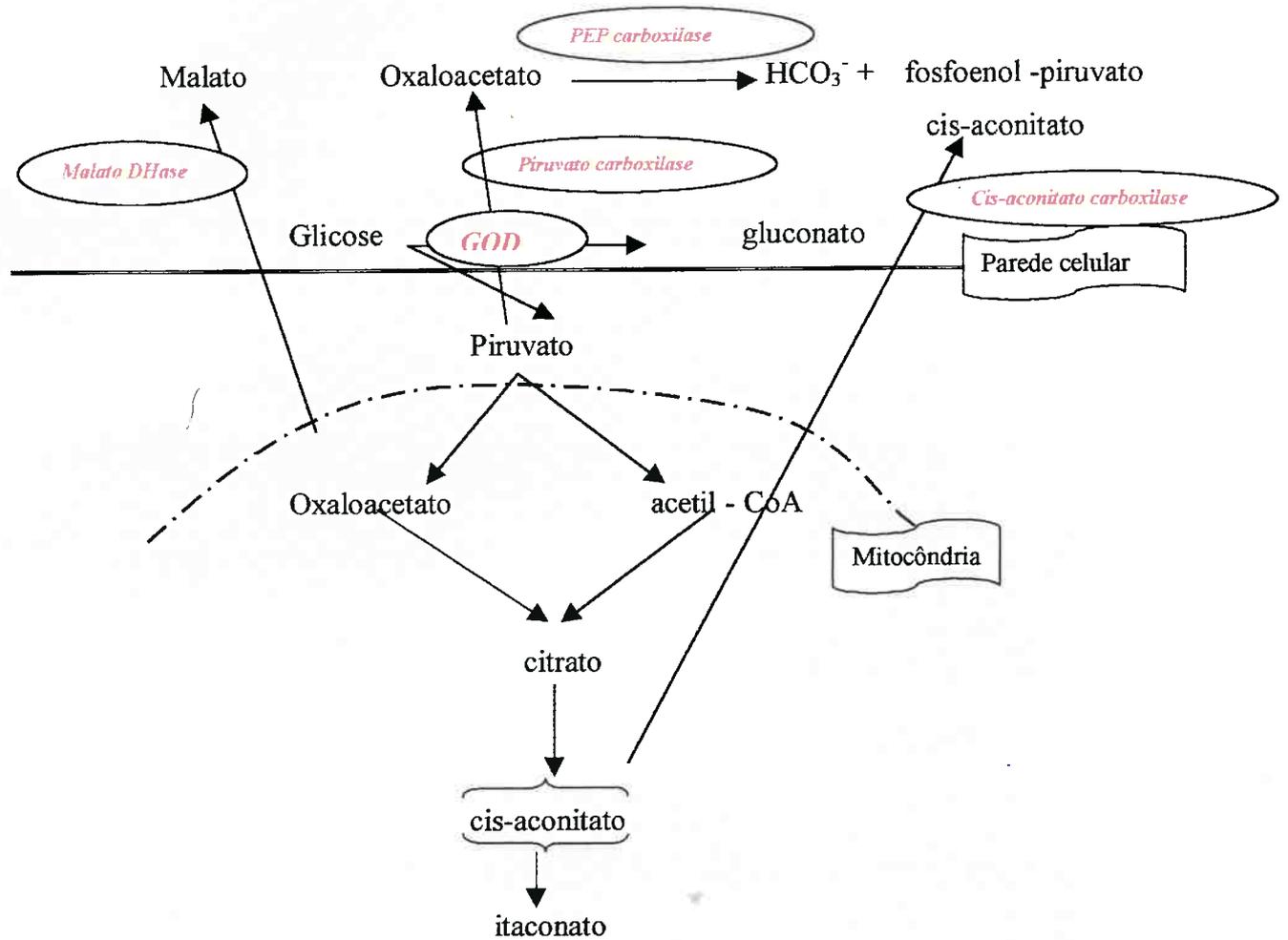
Os resultados obtidos nos experimentos que determinaram a atividade desta enzima confirmaram que sua produção encontra-se acentuada nas linhagens tratadas quando comparadas com a controle.

A glicólise é a via preferencial para a oxidação da glicose, a Via das Pentoses-fosfato é uma via alternativa, dessa forma, a proporção de açúcar que é metabolizada por cada uma das vias ainda está pouco esclarecida (Carlile e Watkinson, 1996).

Dentre as vantagens do fungo desviar o metabolismo da glicose para a Via das Pentoses-fosfato podemos citar a presença de inibidores da via glicolítica como iodoacetato e fluoreto ou quando esta via for regulada por ATP ou enzimas da própria via. Existe ainda a possibilidade da Via das Pentoses-fosfato como um mecanismo de defesa em resposta a algum estresse osmótico.

Todos estes resultados juntamente com os dados da bibliografia consultada, permitiram a proposição de uma hipótese para o metabolismo do *Aspergillus nidulans* (Esquema 2) que sugere a localização extra-celular de várias enzimas relacionadas ao metabolismo da glicose, justificando o aumento do pH do meio de cultura durante o cultivo. Apesar de interessante e plausível este modelo carece ainda de outras análises.

Esquema 2: Relações metabólicas gerais entre os ácidos orgânicos produzidos por *A. niger*, *A. terreus* e *Aspergillus nidulans*.



Fonte: Modificado a partir de Kubicek et al. (1994)

## VII. APÊNDICES

## 7.1. Instabilidade Mitótica

Quadro 3.1: Análise genotípica de 22 setores de primeira ordem obtidos a partir da linhagem tratada RT 1<sup>4</sup>

Colônia tratada e seus setores de 1 <sup>a</sup> ordem	Cor	-ribo	-paba	-bi	-met	-piro	+Acr	MM	Quantidade
RT 1 <sup>4</sup>	V	+	+	+	+	+	R	+	
Setores	B	-	-	-	+	+	R	-	05
Setores	B	+	+	+	+	+	R	+	04
Setores	A	+	+	+	-	+	S	-	03
Setores	A	+	+	+	+	+	R	+	04
Setores	A	-	-	-	+	+	R	-	01
Setores	A	-	-	+	-	+	S	-	01
Setores	Cha	+	+	+	+	+	R	+	02
Setores	V	-	-	-	-	+	S	-	02
UT448	B	-	-	-	+	+	R	-	

Quadro 3.2: Análise genotípica de 22 setores de primeira ordem obtidos a partir da linhagem tratada RT 2<sup>1</sup>

Colônia tratada e seus setores de 1 <sup>a</sup> ordem	Cor	-ribo	-paba	-bi	-met	-piro	+Acr	MM	Quantidade
RT 2 <sup>1</sup>	V	+	+	+	+	+	R	+	
Setores	B	+	+	+	+	+	R	+	07
Setores	B	-	-	-	+	+	R	-	02
Setores	B	+	+	-	+	+	R	-	02
Setores	Cha	+	+	+	+	+	R	+	02
Setores	V	-	-	-	-	+	S	-	02
Setores	A	+	+	+	-	+	R	-	01
Setores	A	+	+	+	+	+	R	+	06
UT448	B	-	-	-	+	+	R	-	

**Quadro 3.3: Análise genotípica de 22 setores de primeira ordem obtidos a partir da linhagem tratada RT 2<sup>6</sup>**

Colônia tratada e seus setores de 1 <sup>a</sup> ordem	Cor	-ribo	-paba	-bi	-met	-piro	+Acr	MM	Quantidade
<b>RT 2<sup>6</sup></b>	<b>V</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>R</b>	<b>+</b>	
<b>Setores</b>	<b>B</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>R</b>	<b>+</b>	<b>04</b>
<b>Setores</b>	<b>B</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>R</b>	<b>-</b>	<b>02</b>
<b>Setores</b>	<b>B</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>R</b>	<b>-</b>	<b>02</b>
<b>Setores</b>	<b>A</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>R</b>	<b>+</b>	<b>05</b>
<b>Setores</b>	<b>A</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>S</b>	<b>-</b>	<b>01</b>
<b>Setores</b>	<b>A</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>S</b>	<b>-</b>	<b>01</b>
<b>Setores</b>	<b>A</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>S</b>	<b>-</b>	<b>01</b>
<b>Setores</b>	<b>V</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>R</b>	<b>+</b>	<b>04</b>
<b>Setores</b>	<b>Cha</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>R</b>	<b>+</b>	<b>02</b>
<b>UT448</b>	<b>B</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>R</b>	<b>-</b>	

**Quadro 3.4: Análise genotípica de 22 setores de segunda ordem obtido a partir da linhagem tratada RT S1<sup>10</sup>**

Colônia tratada e seus setores de 2ª ordem	Cor	-ribo	-paba	-bi	-met	-piro	+Acr	MM	Quantidade
RT S1 <sup>10</sup>	V	+	+	+	+	+	R	+	
Setores	B	+	+	+	+	+	R	+	05
Setores	B	-	+	+	+	+	R	-	01
Setores	B	-	-	-	+	+	R	-	02
Setores	B	-	-	+	+	+	R	-	01
Setores	Cha	-	-	-	+	+	R	-	01
Setores	Cha	-	-	-	+	-	R	-	01
Setores	Cha	+	+	-	+	-	R	-	01
Setores	Cha	+	+	+	+	+	R	+	03
Setores	V	-	-	-	-	+	S	-	01
Setores	V	-	-	-	+	+	R	-	02
Setores	V	+	+	+	+	+	R	+	01
Setores	A	+	+	+	-	+	S	-	01
Setores	A	+	+	+	+	+	R	+	01
Setores	A	-	+	+	-	+	S	-	01
UT448	B	-	-	-	+	+	R	-	

## 7.2. Análise Meiótica

Tabela 5.4.1. Genótipos das colônias ascospóricas obtidas a partir do cruzamento meiótico das linhagens RT 1<sup>4</sup> e UT448

Colônias	Cor	-ribo	-paba	-bi	-met	-piro	+Acr	MM	Quantidade
	<b>B</b>	-	-	-	+	+	<b>R</b>	-	<b>13</b>
	B	+	+	+	+	+	R	+	02
	V	+	+	+	+	+	S	+	81
	V	+	+	-	+	+	S	-	01
	V	+	+	-	-	-	S	-	01
	A	+	+	+	+	+	S	+	01
<b>UT448</b>	<b>B</b>	-	-	-	+	+	<b>R</b>	-	
<b>RT 1<sup>4</sup></b>	<b>V</b>	+	+	+	+	+	<b>R</b>	+	

Quadrado Latino 3: Análise meiótica do Rt 1<sup>+</sup> x UT448 (Tabela 5.4.1)

Total de colônias analisadas: 99

	<i>ri</i>	+	<i>pa</i>	+	+	<i>y</i>	<i>bi</i>	+	<i>Acr-</i>	+	<i>w</i>	+	+	<i>met</i>	+	<i>piro</i>
+	<b>86</b>	00	86	13	83	01	84	02	84	02	84	85	01	85	01	
<i>ri</i>	<b>13</b>	13	00	03	00	13	00	13	00	13	00	13	00	13	00	
+			<b>86</b>	13	70	02	84	02	84	02	84	85	01	85	01	
<i>pa</i>	00%	<b>13</b>	03	13	13	00	13	00	13	00	13	00	13	00	13	00
<i>y</i>				<b>83</b>	02	81	00	83	00	83	82	01	82	01		
+	13.13%	26.20%	<b>16</b>	13	03	15	01	15	01	16	00	16	00			
+					<b>84</b>	02	82	02	82	84	00	84	00			
<i>bi</i>	2.02%	2.02%	5.00%	<b>15</b>	13	02	13	02	14	01	14	01				
<i>Acr+</i>						<b>84</b>	00	84	83	01	83	01				
<i>Acr-</i>	2.02%	5.00%	1.00%	4.00%	<b>15</b>	15	00	15	00	15	00	15	00			
+							<b>84</b>	83	01	83	01					
<i>w</i>	2.02%	2.02%	1.00%	4.00%	00%	<b>15</b>	15	00	15	00	15	00				
<i>met</i>								<b>01</b>	00	01						
+	85.00%	85.00%	82.0%	85.00%	83.8%	83.8%	<b>98</b>	98	00							
<i>piro</i>									<b>01</b>							
+	85.00%	85.00%	82.0%	85.00%	83.8%	83.0%	00%	<b>98</b>								

**Tabela 5.4.2.:** Genótipos das colônias ascospóricas obtidas a partir do cruzamento meiótico das linhagens RT 2<sup>1</sup> e UT448

Colônias	Cor	-ribo	-paba	-bi	-met	-piro	+Acr	MM	Quantidade
	<b>B</b>	-	-	-	+	+	<b>R</b>	-	<b>03</b>
	<b>V</b>	+	+	+	+	+	<b>S</b>	+	<b>93</b>
	<b>A</b>	+	+	+	+	+	<b>S</b>	+	<b>03</b>
<b>UT448</b>	<b>B</b>	-	-	-	+	+	<b>R</b>	-	
<b>RT 2<sup>1</sup></b>	<b>V</b>	+	+	+	+	+	<b>R</b>	+	

**Quadrado Latino 4: Análise meiótica do RT 2' x UT448 (Tabela 5.4.2)**

**Total de colônias analisadas: 99**

	<i>ri</i>	<i>pa</i>	<i>y</i>	<i>bi</i>	<i>Acr-</i>	<i>w</i>	<i>met</i>	<i>piro</i>
<i>ri</i>	96 03	00 03	96 93	03 03	00 03	96 00	00 03	96 00
<i>pa</i>	00%	03	96 03	03 00	00 03	96 00	00 03	96 00
<i>y</i>			03	00 03	00 03	00 03	03 00	03 00
<i>bi</i>	93.00%	93.00%	96	03	93	03	93	93
<i>Acr+</i>				96	00	96	00	96
<i>Acr-</i>	00%	00%	93.00%	03	00	03	00	03
<i>w</i>					96	00	96	96
<i>met</i>	00%	00%	93.00%	00%	03	00	03	00
<i>piro</i>						96	96	00
	96.90%	96.90%	3.00%	96.90%	96.90%	96.90%	99	99
	96.90%	96.90%	3.00%	96.90%	96.90%	00%	00%	99

**Tabela 5.4.3.:** Genótipos das colônias ascospóricas obtidas a partir do cruzamento meiótico das linhagens RT 2<sup>6</sup> e UT448

Colônias	Cor	-ribo	-paba	-bi	-met	-piro	+Acr	MM	Quantidade
	<b>B</b>	-	-	-	+	+	<b>R</b>	-	<b>04</b>
	<b>V</b>	+	+	+	+	+	<b>S</b>	+	<b>87</b>
	<b>V</b>	+	+	-	+	+	<b>S</b>	-	<b>02</b>
	<b>A</b>	+	+	+	+	+	<b>S</b>	+	<b>05</b>
<b>UT448</b>	<b>B</b>	-	-	-	+	+	<b>R</b>	-	
<b>RT 2<sup>6</sup></b>	<b>V</b>	+	+	+	+	+	<b>R</b>	+	

Quadrado Latino 5: Análise meiótica do RT 2<sup>6</sup> x UT448 (Tabela 5.4.3)

Total de colônias analisadas: 98

	<i>ri</i>	<i>pa</i>	<i>y</i>	<i>bi</i>	<i>Acr-</i>	<i>w</i>	<i>met</i>	<i>piro</i>							
<i>ri</i>	94	00	94	89	05	02	92	00	94	00	94	94	00	94	00
<i>pa</i>	00%	04	00	04	00	04	00	04	00	04	00	04	00	04	00
<i>y</i>			94	89	05	02	92	00	94	00	94	94	00	94	00
<i>bi</i>	2.02%	2.02%	88.7%	06	04	02	04	02	04	02	06	00	06	00	00
<i>Acr+</i>					94	00	94	94	00	94	00	94	00	94	00
<i>Acr-</i>	00%	00%	90.8%	2.02%	04	04	00	04	00	04	00	04	00	04	00
<i>w</i>	00%	00%	90.08%	2.02%	00%	04	04	00	94	94	00	94	00	94	00
<i>met</i>											00	00	00	00	00
<i>piro</i>	94.90%	94.90%	5.10%	92.90%	94.90%	94.90%	94.90%	98	98	00	98	98	00	00	00
	94.90%	94.90%	5.10%	92.90%	94.90%	94.90%	94.90%	00%	98	98	00	98	98	00	00

**Tabela 5.4.4. Genótipos das colônias ascospóricas segregantes do cruzamento meiótico das linhagens RTSI<sup>3</sup> e UT448**

Colônias	Cor	-ribo	-paba	-bi	-met	-piro	+acr	MM	Quantidade
	A	+	+	+	+	+	S	+	28
	A	+	+	+	-	+	S	-	10
	A	+	+	+	+	+	R	+	7
	A	+	+	+	-	+	R	-	1
	B	-	-	-	+	+	R	-	48
	B	-	-	-	-	+	R	-	1
	B	-	+	-	+	+	R	-	1
	B	-	-	+	+	+	R	-	3
UT448	B	-	-	-	+	+	R	-	
RTSI <sup>3</sup>	A	+	+	+	-	+	S	-	

Coloração dos conídios das linhagens: V (Verde), A (Amarelo) e B (Branco).

Crescimento das linhagens: + (indica crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura) e - (indica o não crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura).

Resistência à Acriflavina: S (indica que a colônia é sensível à Acriflavina) e R (indica que a colônia é resistente à Acriflavina).

Quadrado Latino 6: Análise meiótica do RT S1<sup>3</sup> x UT448 (Tabela 5.4.4)

Total de colônias analisadas: 99

	ri	+	paba	+	+	y	bi	+	acrS	R	w	+	+	met	+	piro
+		47	00	47	00	47	03	47	09	38	00	47	36	11	47	00
ri	52		51	01	00	00	49	03	52	00	52	00	50	02	52	00
+				48	00	47	1	47	10	38	01	47	37	11	48	00
paba	1.0%	51			00	00	48	03	51	00	51	00	49	02	51	00
y						47	00	47	09	38	00	47	36	11	47	00
+	00%	00%	0	52			00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
+								50	12	38	03	47	39	11	50	00
bi	3.0%	4.0%			00%	49			49	00	49	00	47	02	49	00
acrS										38	01	38	28	10	38	00
acrR	9.1%	10.1%			19.1%	12.1%			61		52	09	58	03	61	00
+												47	36	11	47	00
w	00%	1.0%			00%	3.0%			9.1%	52			50	02	52	00
met														13	13	00
+	38.4%	39.4%			76.6%	41.4%			31.3%	38.4%	38.4%	86		86	00	00
piro																00
+	47.5%	48.5%			100.0%	50.5%			38.4%	47.5%	47.5%	13.1%		99		

**Tabela 5.4.5.:** Genótipos das colônias ascospóricas obtidas a partir do cruzamento meiótico das linhagens RT S1<sup>10</sup> e UT448

Colônias	Cor	-ribo	-paba	-bi	-met	-piro	+acr	MM	Quantidade
	V	+	+	+	+	+	R	+	89
	V	+	+	+	+	+	S	+	11
	V	+	+	-	+	+	R	-	12
	V	+	-	-	+	+	R	-	1
	V	+	-	-	-	-	R	-	2
	B	+	+	+	+	+	R	+	1
UT448	B	-	-	-	+	+	R	-	
RT S1 <sup>10</sup>	V	+	+	+	+	+	R	+	

Coloração dos conídios das linhagens: V (Verde), A (Amarelo) e B (Branco).

Crescimento das linhagens: + (indica crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura) e

- (indica o não crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura).

Resistência à Acriflavina: S (indica que a colônia é sensível à Acriflavina) e

R (indica que a colônia é resistente à Acriflavina).

Quadrado Latino 7: Análise meiótica do RT S1<sup>10</sup> x UT448 (Tabela 5.4.5)

Total de colônias analisadas: 99

	ri	+ paba	+ +	y	bi	+acrR	S	w	+ +	met	+ piro				
+	99	03	96	98	00	15	84	88	11	01	98	97	02	97	02
ri	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
+			96	95	00	12	84	85	11	01	95	96	00	97	00
paba	3.0%	03	03	00	03	00	03	00	00	00	03	01	02	01	02
y				0	01	00	01	00	01	00	00	00	00	00	00
+	100.0%	96.9%	98	15	83	87	11	00	98	96	02	96	02		
+					84	73	11	01	83	84	00	84	00	84	00
bi	15.2%	12.1%	84.7%	15	15	00	00	15	13	02	13	02			
acrS							11	01	11	11	00	11	00	11	00
acrR	88.9%	85.9%	11.2%	73.7%	88			01	87	86	02	86	02		
+									98	97	02	97	02		
w	1.0%	4.0%	100.0%	16.2%	87.9%	01			01	00	01	00			
met										02	01	02			
+	98.0%	99.0%	2.0%	86.9%	13.1%	97.0%	97				97	00			
piro												02			
+	98.0%	99.0%	2.0%	86.9%	13.1%	97.0%	00%	97							

**Tabela 5.4.6:** Genótipos das colônias ascospóricas obtidas a partir do cruzamento meiótico das linhagens RT 1<sup>4</sup> e UT196

Colônias	Cor	-ribo	-paba	-bi	-met	-piro	+Acr	MM	Quantidade
	<b>A</b>	+	+	+	-	-	<b>S</b>	-	<b>56</b>
	A	+	+	-	-	-	R	-	06
	A	+	+	-	+	+	R	-	01
	A	+	-	+	+	+	R	-	01
	A	+	+	+	+	+	R	+	01
	<b>V</b>	+	+	+	+	+	<b>+/-</b>	+	<b>18</b>
	V	+	+	+	-	-	+/-	-	01
	V	+	+	-	+	+	+/-	-	04
	B	+	+	+	+	+	R	+	04
<b>UT196</b>	<b>A</b>	+	+	+	-	-	<b>S</b>	-	
<b>RT 1<sup>4</sup></b>	<b>V</b>	+	+	+	+	+	<b>R</b>	+	

Quadrado Latino 8: Análise meiótica do RT 1<sup>4</sup> x UT196 (Tabela 5.4.6)

Total de colônias analisadas: 99

	<i>ri</i>	<i>pa</i>	<i>y</i>	<i>bi</i>	<i>Acr-</i>	<i>w</i>	<i>met</i>	<i>piro</i>
<i>ri</i>	92	01	27	11	04	04	29	29
<i>pa</i>	00	91	01	00	01	01	01	01
<i>y</i>	00	00	65	07	00	00	03	03
<i>bi</i>	00	00	00	81	04	04	24	24
<i>Acr+</i>	00	00	00	00	88	00	25	25
<i>Acr-</i>	00	00	00	00	04	04	04	04
<i>w</i>	00	00	00	00	00	88	25	25
<i>met</i>	00	00	00	00	00	04	63	63
<i>piro</i>	00	00	00	00	00	00	00	63
	1.00%	1.01%	27.27%	11.11%	4.34%	4.34%	29.29%	29.29%
	29.30%	30.43%	27.27%	11.11%	16.30%	11.90%	11.90%	11.90%
	11.90%	13.04%	32.60%	11.11%	16.30%	11.90%	11.90%	11.90%
	4.34%	5.40%	25.00%	16.30%	4.34%	4.34%	4.34%	4.34%
	4.34%	5.40%	25.00%	11.90%	00%	4.34%	4.34%	4.34%
	31.50%	30.40%	4.34%	32.60%	27.1%	27.10%	29.29%	29.29%
	31.50%	30.40%	4.34%	32.60%	27.1%	27.10%	00%	29.29%

**Tabela 5.4.7:** Genótipos das colônias ascospóricas obtidas a partir do cruzamento meiótico das linhagens RT 2<sup>1</sup> e UT196

Colônias	Cor	-ribo	-paba	-bi	-met	-piro	+Acr	MM	Quantidade
	A	+	+	+	-	-	S	-	32
	V	+	+	+	+	+	R	+	63
	V	+	+	-	+	+	+/-	-	05
<b>UT196</b>	<b>A</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>S</b>	<b>-</b>	
<b>RT 2<sup>1</sup></b>	<b>V</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>R</b>	<b>+</b>	

**Tabela 5.4.8:** Genótipos das colônias ascospóricas obtidas a partir do cruzamento meiótico das linhagens RT 2<sup>6</sup> e UT196

Colônias	Cor	-ribo	-paba	-bi	-met	-piro	+Acr	MM	Quantidade
	A	+	+	+	-	-	S	-	15
	A	+	+	+	+	-	S	-	01
	V	+	+	+	+	+	+/-	+	73
	V	+	+	-	+	+	S	-	09
<b>UT196</b>	<b>A</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>S</b>	<b>-</b>	
<b>RT 2<sup>6</sup></b>	<b>V</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>R</b>	<b>+</b>	

**Tabela 5.4.9:** Genótipos das colônias ascospóricas obtidas a partir do cruzamento meiótico das linhagens RT S1<sup>3</sup> e UT196

Colônias	Cor	-ribo	-paba	-bi	-met	-piro	+acr	MM	Quantidade
	V	+	+	+	+	+	R	+	67
	A	+	+	+	-	-	S	-	50
	A	+	+	+	-	+	S	-	5
	A	+	+	+	+	+	S	+	1
	A	+	+	+	-	+	R	-	1
UT196	A	+	+	+	-	-	S	-	
RT S1 <sup>3</sup>	A	+	+	+	-	+	S	-	

Coloração dos conídios das linhagens: V (Verde), A (Amarelo) e B (Branco).

Crescimento das linhagens: + (indica crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura) e - (indica o não crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura).

Resistência à Acriflavina: S (indica que a colônia é sensível à Acriflavina) e R (indica que a colônia é resistente à Acriflavina).

**Quadrado Latino 9: Análise meiótica do RT SI<sup>3</sup> x UT196 (Tabela 5.4.9)**

**Total de colônias analisadas: 124**

	+	ri	+	paba	y	+	+	acr bi S	acr R	+	w	met	+	piro	+
<b>ri</b>		00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
+	124	124	00	56	68	124	00	56	68	124	00	55	69	52	72
<b>paba</b>			00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
+	00%	124	56	68	124	00	56	68	124	00	55	69	52	72	
+				68	68	00	1	67	68	00	01	67	02	66	
<b>y</b>	54,8%	54,8%	56	56	00	55	1	56	00	54	02	50	06		
<b>bi</b>					00	00	00	00	00	00	00	00	00		
+	0%	0%	54,8%	124	56	68	124	00	55	69	52	72			
<b>acrR</b>						68	00	00	68	2	66				
<b>acrS-</b>	54,8%	54,8%	1,6%	54,8%	56	56	00	55	01	50	06				
<b>w</b>							00	00	00	00					
+	0%	0%	54,8%	0%	54,8%	124	55	69	52	72					
+								69	02	67					
<b>met</b>	55,6%	55,6%	2,4%	55,5%	0,8%	55,6%	55	50	05						
+									63						
<b>piro</b>	58,1%	58,1%	6,5%	58,1%	6,5%	58,1%	5,6%	52							

**Tabela 5.4.10:** Análise meiótica do cruzamento das linhagens RT S1<sup>10</sup> e UT196

Colônias	Cor	-ribo	-paba	-bi	-met	-piro	+acr	MM	Quantidade
	V	+	+	+	+	+	R	+	88
	V	+	+	-	+	+	R	-	1
	A	+	+	+	-	-	S	-	24
	A	-	+	+	-	-	S	-	7
UT196	A	+	+	+	-	-	S	-	
RT S1 <sup>10</sup>	V	+	+	+	+	+	R	+	

Coloração dos conídios das linhagens: V (Verde), A (Amarelo) e B (Branco).

Crescimento das linhagens: + (indica crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura) e - (indica o não crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura).

Resistência à Acriflavina: S (indica que a colônia é sensível à Acriflavina) e R (indica que a colônia é resistente à Acriflavina).

## 7.3. Análise Mitótica

Tabela 5.5.1. Genótipos das colônias haplóides segregantes dos diplóides *Rt1<sup>+</sup>// UT184*

Cols.	Cor	-ri	-pa	-bi	-pi	+acr	-tio	-nic	+gal	+lac	+fac	Qtde
	V	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	9
	V	+	+	+	-	R	+	+	+	+	+	3
	V	-	+	+	-	R	+	-	+	+	+	1
	V	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	56
	V	+	+	-	+	R	+	+	+	+	+	4
	V	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	1
	V	-	-	-	-	S	+	+	+	+	+	1
	V	+	+	-	-	S	+	+	+	+	+	1
	V	+	-	-	-	R	-	-	+	-	-	1
	V	+	-	+	-	R	+	-	+	+	+	1
	V	-	-	-	+	R	+	+	+	+	+	1
det	V	-	-	-	-	R	+	-	+	+	+	3
det	V	+	+	-	+	R	+	+	+	+	+	1
	V	+	+	-	-	R	+	+	+	+	+	1
	V	-	-	-	-	S	-	+	+	+	+	1
	V	-	-	-	-	R	+	-	+	+	+	1
	V	-	-	-	-	R	+	-	+	-	+	1
	B	-	-	-	-	R	+	+	+	+	+	5
	B	-	-	-	+	R	+	-	+	+	+	3
	B	-	-	-	+	R	+	-	+	+	+	1
	B	-	-	-	-	R	+	-	+	+	+	5
	B	-	-	+	-	R	+	-	+	+	+	1
	B	-	-	-	-	R	-	+	+	+	+	1
	B	+	+	+	-	R	+	+	+	+	+	4
<i>Rt in1<sup>+</sup></i>	V	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	
UT184	Cha	-	+	+	-	R	-	-	-	-	-	

**Tabela 5.5.1. Genótipos das colônias haplóides segregantes dos diplóides RTI<sup>4</sup>// UT184 (continuação)**

Cols.	Cor	-ri	-pa	-bi	-pi	+acr	-tio	-nic	+gal	+lac	+fac	Qtde
<i>det</i>	B	+	+	+	-	R	+	+	+	-	+	1
<i>det</i>	B	+	+	+	-	R	+	+	+	+	+	1
	B	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	22
	B	-	-	-	-	R	+	+	-	+	+	1
	B	-	-	-	+	R	+	+	+	+	+	11
	B	-	+	+	+	R	+	+	+	+	+	1
	B	-	-	+	+	R	+	+	+	+	+	2
	A	-	-	-	-	S	+	-	-	-	-	2
	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	18
	A	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	4
	A	-	-	-	+	S	-	-	-	-	-	1
	A	+	+	-	+	R	+	+	-	+	+	1
	A	-	-	-	-	S	-	+	-	-	-	1
<b>Rt in1<sup>4</sup></b>	<b>V</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>R</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	
<b>UT184</b>	<b>Cha</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>R</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	

Coloração dos conídios das linhagens: V (Verde), A (Amarelo) e B (Branco).

Crescimento das linhagens: + (indica crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura) e - (indica o não crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura).

Resistência à Acriflavina: S (indica que a colônia é sensível à Acriflavina) e R (indica que a colônia é resistente à Acriflavina).

*det*: colônias com conidiação deteriorada

**Quadrado Latino 10: Análise mitótica do diplóide RT 1<sup>4</sup> // UT184 (Tabela 5.5.1)**

**Total de colônias analisadas: 173**

184 1	+ ribo	+ paba	+ y	+ bio	acr R	acr S	+ w	s	+ gal	+ piro	+ fac	+ lac	+ nic	+ det
ribo +	72	2 70	68 22 59*	5 67	39 33	41 31	32 42	33 39	52 20	32 40	34 25	47 25	3 69	
	<b>101</b>	99 2	19 5 59	92 9	100 1	18 83	1 100	1 100	13 88	1 100	1 99	2 99	3 98	
paba +		72	20 22 59	2 68	39 33	42 30	33 59	33 39	53 19	33 101	34 38	48 24	3 69	
	2,3%	<b>101</b>	67 5 59	93 8	100 1	72 29	0 101	1 100	12 89	0 39	1 100	1 100	3 98	
y +	**6,4%	23,6%	87	27 4 23 59	5 22 59	27 59	20 7 59	23 04 59	21 06 59	22 05 59	22 5 59	21 6 59	3 24 59	
bio +	8%	5,7%	26,3%	97	42 34 97	49 27 0	33 43 97	34 42 0	53 23 85	33 43 97	34 42 96	46 30 94	4 72 2 95	
acrS acrR	35,7%	35,7%	14,9%	37,5%	<b>139</b>	34 0 80 59	30 4 3 136	31 3 3 136	33 1 32 107	31 3 02 137	31 3 4 135	30 4 19 120	6 133	
w +	71,6%	41%	24,1%	46,8%	53,7%	<b>114</b>	1 58 32 82	1 58 33 81	19 40 46 68	0 59 33 81	1 58 34 80	10 49 39 75	2 57 4 110	
+ s	76,3%	77,4%	84,8%	75,1%	95,9%	47,9%	<b>33</b>	<b>140</b>	4 136 32 1	33 107 31 2	2 138 31 2	4 136 31 2	19 121 30 3	
+ gal	76,8%	76,8%	89,2	75,1%	96,5%	47,3%	<b>4,0%</b>	<b>34</b>	139 32 3	33 106 32 2	1 138 32 2	3 136 32 2	18 121 31 3	
+ piro	80,9%	82%	74,1%	79,7%	80,9%	50,2%	19,6%	20,2%	65 108	32 33 1 107	34 31 4 107	45 17 5 60		
+ fac	76,3%	41,6%	87,5%	75,1%	97,1%	46,8%	2,3%	<b>1,7%</b>	19,6%	<b>33</b>	2 138 33 0	17 123 32 1	6 134 0 33	
+ lac	76,8%	77,4%	86,6%	75,1%	95,9	46,8%	3,4%	<b>2,8%</b>	18,4%	1,1%	<b>35</b>	16 122 33 2	5 133 1 34	
+ nic	84,3%	85,5%	80,3%	80,9%	86,7%	49,1%	12,7%	<b>12,1%</b>	12,1%	10,4%	10,4%	<b>49</b>	3 46 167	
+ det	58,3%	58,3%	77,6%	57,2%	76,8%	64,7%	22,5%	23,1%	35,2%	22,5%	22,5%	28,3%	6	

Legenda: \* Linhagens brancas – genótipo  $w\bar{y}^2$

\*\* Frequência de recombinação com genótipo  $w\bar{y}^2$ , utilizando como total de 112 colônias para efetuar as contas.

Tabela 5.5.2. Genótipos das colônias haplóides, segregantes dos diplóides RT2<sup>1</sup>//UT184

Cols.	Cor	-ri	-pa	-bi	-pi	+acr	-tio	-nic	+gal	+lac	+fac	Qtde
	V	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	69
	V	+	+	-	-	R	+	+	+	+	+	2
	V	+	+	+	-	R	+	+	+	+	+	2
	V	-	-	-	-	R	+	+	+	+	+	1
	V	+	+	-	+	R	+	+	+	+	+	4
	V	+	+	-	+	R	+	-	+	+	+	1
	V	+	+	-	-	R	+	-	+	+	+	2
	V	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	3
	V	+	+	+	+	S	+	+	+	+	+	1
	V	-	+	+	-	R	+	+	+	+	+	3
	V	-	+	+	+	R	+	+	+	+	+	1
	B	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	16
	B	-	-	-	+	R	+	+	+	+	+	2
	B	+	+	+	+	R	+	-	+	-	+	1
	B	-	-	-	-	R	+	+	+	+	+	2
	B	+	+	+	-	R	+	+	+	+	+	3
	B	-	-	+	-	R	+	+	+	+	+	1
	B	-	-	-	+	R	+	-	+	-	+	1
	B	-	-	-	-	R	+	+	+	+	+	6
	B	-	-	-	+	R	+	-	+	+	+	2
	B	+	-	+	-	R	+	+	+	+	+	1
	B	+	+	-	+	R	+	+	+	+	+	2
Rt in2 <sup>1</sup>	V	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	
UT184	Cha	-	+	+	-	R	-	-	-	-	-	

**Tabela 5.5.2. Genótipos das colônias haplóides, segregantes dos diplóides RT2<sup>1</sup>//UT184 (continuação)**

Cols.	Cor	-ri	-pa	-bi	-pi	+Acr	-tio	-nic	+gal	+lac	+fac	Qtde
	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	9
	A	+	+	+	+	R	+	-	+	+	+	4
	A	-	-	+	-	S	-	-	-	-	-	1
	A	+	+	-	-	R	+	+	+	+	+	3
	A	+	-	+	-	R	+	+	+	+	+	1
	A	+	-	-	-	R	-	-	+	+	+	1
	A	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	22
<b>Rt in2<sup>1</sup></b>	<b>V</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>R</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	
<b>UT184</b>	<b>Cha</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>R</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	

Coloração dos conídios das linhagens: V (Verde), A (Amarelo) e B (Branco).

Crescimento das linhagens: + (indica crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura) e - (indica o não crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura).

Resistência à Acriflavina: S (indica que a colônia é sensível à Acriflavina) e R (indica que a colônia é resistente à Acriflavina).

**Quadrado Latino 11: Análise mitótica do diplóide RT 2<sup>1</sup>//UT184 (Tabela 5.5.2)**

**Total de colônias analisadas: 168**

184 2 <sup>1</sup>	+ ribo	+ paba	+ y	+ bio	acr R	acr S	+ w	s	+ gal	+ piro	+ fac	+ lac	+ nic
ribo	33	4 29	8 10	6 27	20 13	18 15	13 20	13 20	26 7	13 20	14 16	22 10	
+	135	132 3	81 31	120 15	134 1	112 23	1 134	0 135	15 120	0 135	1 135	9 127	
paba		32	4 12	4 28	19 13	16 16	14 18	13 19	26 06	13 19	14 18	23 9	
+	4,1%	136	85 29	122 14	135 1	114 22	0 136	0 136	15 121	0 136	1 135	8 128	
y	**		41	28 13	31 10	41	11 30	10 31	15 26	10 31	10 31	15 26	
+	23,2%	19,6%	89	76 13	85 4	89	3 86	30 86	13 76	3 86	3 86	6 83	
bio			38	42	34 8	26 16	13 29	12 30	29 13	12 30	13 29	25 17	
+	18,4%	10,7%	31,5%	126	120 6	102 22	1 125	1 125	12 114	1 125	2 124	6 120	
acrS					14	14 0	13 1	13 1	13 1	13 1	13 1	13 1	
acrR	12,5%	11,9%	26,9%	23,8%	154	116 38	1 153	0 154	28 126	0 154	2 152	18 136	
w						38	0 38	0 38	13 25	13 25	15 23	10 28	
+	24,4%	22,6%	31,5%	28,5%	30,9%	130	14 116	13 117	28 102	0 130	0 130	21 109	
s							14	154	0 154	27 127	0 154	2 152	
+	87,5%	89,2%	74,6%	82,1%	98,8%	69%	14	13 1	13 1	14 0	13 1	13 1	
gal								155	28 127	0 155	2 153	18 137	
+	88%	88,6%	73,8	81,5%	99,4%	69,6%	0,59%	13	13 0	13 0	13 0	13 0	
piro									127	0 127	2 125	9 118	
+	86,9%	87,5%	70%	85,1%	82,7%	68,4%	16%	16,6%	41	13 28	13 28	22 19	
fac										155	2 153	16 137	
+	88%	88,6%	73,8%	81,5%	99,4%	85,1%	0,59%	0%	16,6%	13	13 0	13 0	
iac											153	16 137	
+	88,6%	88,6%	73,8%	81,5%	98,2%	86,3%	1,7%	1,1%	17,8%	1,1%	15	15 0	
nic												137	
+	88,6%	89,8%	75,3%	86,3%	88,6%	70,8%	10,1%	10,7%	16,6%	10,7%	9,5%	31	

Legenda: \* Linhagens brancas – genótipo  $w\bar{y}^2$

\*\* Freqüência de recombinação com genótipo  $w\bar{y}^2$ , utilizando como total de 130 colônias para efetuar as contas.

**Tabela 5.5.3. Genótipos das colônias haplóides segregantes dos diplóides RT2<sup>6</sup>//UT184**

Cols.	Cor	-ri	-pa	-bi	-pi	+acr	-tio	-nic	+gal	+lac	+fac	Qtde
	V	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	89
	V	-	-	-	-	S	+	+	-	-	+	1
	V	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	1
	V	+	+	-	+	S	+	+	+	+	+	1
	V	+	+	-	+	R	+	+	+	+	+	2
<i>det</i>	V	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	1
<i>det</i>	V	+	+	+	+	R	+	+	-	+	+	2
	B	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	44
	B	-	-	-	+	R	+	+	+	+	+	34
	B	-	-	+	+	R	+	+	+	+	+	1
	B	+	-	-	+	R	+	+	+	+	+	1
	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	29
	A	-	-	-	-	S	-	-	-	+	-	1
	A	-	-	+	-	S	-	-	-	-	-	1
<b>Rt in2<sup>6</sup></b>	<b>V</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>R</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	
<b>UT184</b>	<b>Cha</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>R</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	

Coloração dos conídios das linhagens: V (Verde), A (Amarelo) e B (Branco).

Crescimento das linhagens: + (indica crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura) e - (indica o não crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura).

Resistência à Acriflavina: S (indica que a colônia é sensível à Acriflavina) e R (indica que a colônia é resistente à Acriflavina).

*det*: colônias com conidiação deteriorada

**Quadrado Latino 12: Análise mitótica do diplóide RT 2<sup>6</sup> // UT184 (Tabela 5.5.3)**

**Total de colônias analisadas: 208**

184 2 <sup>6</sup>	+ ribo	+ paba	+ y	+ bio	acr R	acr S	+ w	s	+ gal	+ piro	+ fac	+ lac	+ nic	+ det
ribo	68	0 68	2 31	2 66	35 33	33 35	32 36	33 35	33 35	32 36	32 36	32 36	32 36	0 68
+	140	139 1	95 0	136 4	139 1	95 45	0 140	2 138	0 140	0 140	0 140	0 140	0 140	3 137
paba		69	2 31	2 67	36 33	33 36	32 37	33 36	33 36	32 37	32 37	32 37	32 37	0 69
+	0.5%	139	95 0	136 3	138 1	95 44	0 139	2 137	0 139	0 139	0 139	0 139	0 139	3 136
y	**		31	1 30	0 31	31	31 0	31 0	31 0	31 0	31 0	30 1	31 0	0 31
+	1.5%	15%	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
bio			97	37 40	94 03	97	1 96	4 93	2 95	1 96	2 95	1 96	2 95	1 96
+	2.8%	2.4%	32%	138	137 1	93 45	1 137	3 135	1 137	1 137	1 137	1 137	1 137	0 70
acrS	17.3%	17.7%	2.3%	18.2%	174	34 0	2 32	33 1	33 1	32 2	32 2	32 2	32 2	0 34
+	17.3%	17.7%	2.3%	18.2%	174	94 80	0 174	2 172	0 174	0 174	0 174	0 174	0 174	3 171
w						80	0 80	0 80	0 80	0 80	0 80	0 80	0 80	0 80
+	37.5%	37%	24.2%	38.4%	54%	128	32 96	35 93	33 95	32 96	32 96	32 96	32 96	3 125
s							176	3 173	1 175	0 176	1 175	0 176	1 175	3 173
+	82.6%	82.2%	99.2%	80.7%	99%	46.5%	32	32 0	32 0	32 0	31 1	32 0	32 0	0 32
gal								173	0 173	0 173	0 173	0 173	0 173	1 172
+	82.2%	81.7%	96%	80.2%	98.5%	44.7%	1.4%	35	33 2	32 3	32 3	32 3	32 3	2 33
piro									175	0 175	0 175	0 175	0 175	3 172
+	83.1%	82.6%	98.4%	81.2%	99.5%	45.6%	0.48%	0.96%	33	32 1	32 1	32 1	32 1	0 3
fac										176	1 175	0 176	0 176	3 173
+	82.6%	82.2%	99.2%	80.7%	99%	46.1%	0%	1.4%	0.48%	32	31 1	32 0	32 0	0 32
lac											176	1 175	3 173	3 173
+	82.6%	82.2%	97.6%	80.7%	99%	46.1%	0.96%	1.4%	0.48%	0.96%	32	31 1	0 32	0 32
nic												176	3 173	3 173
+	82.6%	82.2%	99.2%	80.7%	99%	46.1%	0%	1.4%	0.48%	0%	0.96%	32	0 32	205
det													16.8%	3
+	65.8%	65.3%	73.4%	64.9%	82.2%	60%	16.8%	16.3%	17.3%	16.8%	16.8%	16.8%	16.8%	3

Legenda: \* Linhagens brancas – genótipo w<sup>+</sup>y<sup>+</sup>

\*\* Frequência de recombinação com genótipo w<sup>+</sup>y<sup>+</sup>, utilizando como total de 128 colônias para efetuar as contas.



Tabela 5.5.4. Genótipos das colônias haplóides segregantes das linhagens diplóides *RTS1<sup>3</sup>//UT184* (continuação)

Cols.	Cor	-ri	-pa	-bi	-pi	+acr	-tio	-nic	+gal	+lac	+fac	Qtde
	B	-	-	-	-	R	+	+	+	+	+	4
	B	-	-	-	-	S	-	+	-	-	-	2
	B	-	-	-	-	S	-	-	-	-	+	2
	B	+	+	+	-	R	+	+	+	+	+	2
	B	+	-	+	-	R	+	-	+	+	+	1
	B	+	+	+	+	R	+	-	+	+	+	1
	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	+	3
	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	9
	A	+	+	-	+	R	+	+	+	+	+	1
	A	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	1
	A	-	-	-	-	R	-	+	-	-	-	1
	A	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	1
	A	-	-	-	-	S	-	-	-	+	-	1
	Cha	-	+	+	-	R	-	-	-	-	-	2
	Cha	-	+	-	-	R	-	-	-	-	-	1
	Cha	-	-	-	-	S	-	-	-	-	+	5
	Cha	-	+	-	-	S	-	-	-	-	+	1
	Cha	-	+	+	-	S	-	-	-	-	+	1
	Cha	-	-	+	-	S	+	+	+	+	+	1
	Cha	-	+	-	-	S	-	-	-	-	+	1
	Cha	+	+	-	+	S	+	-	+	+	+	1
<b>Rt inS1<sup>3</sup></b>	<b>A</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>S</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	
<b>UT184</b>	<b>Cha</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>R</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	

Coloração dos conídios das linhagens: V (Verde), A (Amarelo) e B (Branco).

Crescimento das linhagens: + (indica crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura) e - (indica o não crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura).

Resistência à Acriflavina: S (indica que a colônia é sensível à Acriflavina) e R (indica que a colônia é resistente à Acriflavina).

**Quadrado Latino 13: Análise mitótica do diplóide RT S1<sup>3</sup>//UT184 (Tabela 5.5.4)**

**Total de colônias analisadas: 127**

184	+ ribo	+ paba	+ y	+ bio	acr R	acr S	+ w	s	+ gal	+ piro	+ fac	+ lac	+ nic	+ cha
SI	42	9 33	19 15	6 36	16 26	34 8	30 12	33 9	40 2	17 25	33 9	32 10	12 30	
ribo	85	83 2	79 2	77 8	83 2	81 4	0 85	7 78	2 64	0 85	8 77	21 64	1 84	
paba		35	15	3 32	12 23	26 9	24 11	28 7	35 0	14 21	27 8	24 11	6 29	
+	8,6%	92	87 2	80 12	87 5	89 3	6 86	12 80	26 66	3 89	14 78	29 63	7 85	
y	**		17	1 16	4 13	17	15 2	15 02	15 02	12 05	14 3	14 3	0 17	
+	18,2%	11,3%	98	82 28	95 15	98	11 87	21 77	35 63	3 95	23 75	35 63	13 85	
bio			12	44	19 25	36 8	27 17	31 13	38 6	15 29	31 13	33 11	9 27	
+	11%	11,8%	16,5%	83	80 3	79 4	3 80	9 74	23 60	2 81	10 73	20 63	4 75	
acrS					28	24 4	25 3	25 3	26 2	12 16	24 4	24 4	10 14	
acrR	14,1%	13,3%	16,5%	17,3%	99	91 8	5 94	15 84	35 64	5 94	17 82	29 70	3 88	
w						12	4 8	4 8	8 4	2 10	4 8	4 8	12	
+	29,9%	22,8%	14,7%	31,4%	25,1%	115	26 91	36 79	53 62	15 100	37 78	49 66	13 102	
-							97	10 87	31 66	0 97	12 85	26 71	2 87	
s	90,5%	86,6%	88,6%	84,2%	93,7%	74,8%	30	30 0	30 0	17 13	29 1	27 3	11 15	
+								87	22 65	0 87	3 84	22 65	2 77	
gal	87,4%	85%	80%	82,6%	85,8%	65,3%	7,8%	40	39 1	17 23	38 2	31 9	11 25	
+									66	0 66	3 63	14 52	1 64	
piro	81,8%	79,5%	67,8%	77,1%	78,7%	55,1%	24,4%	18,1%	61	17 44	38 23	39 22	12 38	
-										110	25 85	39 71	10 90	
fac	80,3%	81,1%	93%	75,5%	83,4%	80,3%	10,2%	18,1%	34,6%	17	16 01	14 3	3 12	
+											86	24 62	2 76	
lac	86,6%	82,6%	77,3%	81,8%	83,4	64,5%	10,2	3,9%	20,4%	20,4%	41	29 12	11 26	
+												74	1 65	
nic	75,5%	68,5%	66,9%	54,3%	74%	55,1%	22,8%	24,4%	28,3%	33%	28,3%	53	12 37	
+													114	
cha	75,5%	71,6%	73,9%	66,1%	77,1%	80,3%	13,38%	21,2%	30,7%	17,3%	22%	29,9%	13	

Legenda: \* Linhagens brancas – genótipo  $w\bar{y}^2$   
 \*\* Frequência de recombinação com genótipo  $w\bar{y}^2$ , utilizando como total de 115 colônias para efetuar as contas.

**Tabela 5.5.5. Genótipos das colônias haplóides segregantes das linhagens *RTS1<sup>10</sup>//UT184***

Cols.	Cor	-ri	-pa	-bi	-pi	+acr	-tio	-nic	+gal	+lac	+fac	Qtde
	V	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	60
	V	-	-	-	-	R	+	+	+	+	+	2
	V	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	6
	V	-	-	-	+	R	+	+	+	+	+	2
	V	-	+	-	-	R	-	-	+	+	+	1
	B	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	42
	B	-	-	-	+	R	+	+	+	+	+	9
	B	+	-	-	+	R	+	+	+	+	+	1
<i>det</i>	B	-	-	-	+	R	+	+	+	+	+	10
<i>det</i>	B	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	1
	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	10
	A	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	1
<b>Rt inS1<sup>10</sup></b>	<b>V</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>R</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	
<b>UT184</b>	<b>Cha</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>R</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	

Coloração dos conídios das linhagens: V (Verde), A (Amarelo) e B (Branco).

Crescimento das linhagens: + (indica crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura) e - (indica o não crescimento da linhagem no seu respectivo meio de cultura).

Resistência à Acriflavina: S (indica que a colônia é sensível à Acriflavina) e R (indica que a colônia é resistente à Acriflavina).

*det*: colônias com conidiação deteriorada

**Quadrado Latino 14: Análise mitótica do diplóide RT S1<sup>10</sup> // UT184 (Tabela 5.5.5)**

**Total de colônias analisadas: 145**

184 S1 <sup>10</sup>	+ ribo	+ paba	+ y	+ bio	acr R	acr S	+ w	s	+ gal	+ piro	+ fac	+ lac	+ nic	+ det
ribo	40	1 39	11 10	44 40	24 16	21 19	17 23	16 24	19 21	16 24	16 24	17 23	10 30	
+ 105	104 1	60 1	60 1	105 0	61 44	0 55	0 105	0 105	0 105	0 105	0 105	0 105	1 104	
paba	40	30 10	0 40	24 16	20 20	16 24	16 24	18 22	16 24	16 24	16 24	10 30		
+ 1,3%	105	104 1	104 1	105 0	62 43	1 104	0 105	1 104	0 105	0 105	0 105	1 104	1 104	
y	**	11 10	1 10	1 10	11 10	10 1	10 01	10 01	10 01	10 01	10 01	10 01	11	
+ 14,6%	37,8%	71	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	
bio	31%	0,68%	74,3%	104	25 16	21 20	17 24	16 25	19 22	16 25	16 25	17 24	10 30	
+ 31%	0,68%	74,3%	104	104 0	61 43	0 104	0 104	0 104	0 104	0 104	0 104	0 104	1 104	
acrS	16,5%	16,5%	8,5%	17,2%	129	16 0	16 0	16 0	16 0	16 0	16 0	16 0	0 16	
acrR	16,5%	16,5%	8,5%	17,2%	129	66 63	1 128	0 129	3 126	0 129	0 129	1 128	11 118	
w	44,8%	43,4%	13,4%	44,1%	54,4%	63	0 63	0 63	0 63	0 63	0 63	0 63	11 52	
+ 44,8%	43,4%	13,4%	44,1%	54,4%	82	17 65	16 66	19 63	16 66	16 66	16 66	17 65	0 82	
s	84,1%	82,7%	90,2%	83,4%	99,3%	44,8%	17	128	0 128	2 126	0 128	0 128	11 127	
+ 84,1%	82,7%	90,2%	83,4%	99,3%	44,8%	17	128	0 128	2 126	0 128	0 128	0 128	11 127	
gal	83,4%	83,4%	91,4	82,7%	0,01%	45,5%	0,68%	129	3 126	0 129	0 129	1 128	11 118	
+ 83,4%	83,4%	91,4	82,7%	0,01%	45,5%	0,68%	129	3 126	0 129	0 129	1 128	11 118		
piro	88,5%	84,1%	87,8%	84,8%	97,9%	43,4%	1,37%	2,06%	19	16 0	16 0	16 0	0 16	
+ 88,5%	84,1%	87,8%	84,8%	97,9%	43,4%	1,37%	2,06%	19	16 0	16 0	16 0	16 0	0 16	
fac	83,4%	83,4%	91,4%	82,7%	0,01%	45,5%	0,68%	0%	2,06%	16	0 129	1 128	11 118	
+ 83,4%	83,4%	91,4%	82,7%	0,01%	45,5%	0,68%	0%	2,06%	16	0 129	1 128	11 118		
lac	83,4%	83,4%	91,4%	82,7%	0,01%	45,5%	0,68%	0%	0%	0%	16	16 0	0 16	
+ 83,4%	83,4%	91,4%	82,7%	0,01%	45,5%	0,68%	0%	0%	0%	16	16 0	16 0	0 16	
nic	82,7%	82,7%	90,2%	82,7%	99,3%	44,8%	0%	0,68%	1,37%	0,68%	0,68%	17	11 117	
+ 82,7%	82,7%	90,2%	82,7%	99,3%	44,8%	0%	0,68%	1,37%	0,68%	0,68%	17	11 117		
det	78,6%	78,6%	86,5%	78,6%	81,3%	64,1%	19,3%	18,6%	20,6%	18,6%	18,6%	19,3%	11 134	
+ 78,6%	78,6%	86,5%	78,6%	81,3%	64,1%	19,3%	18,6%	20,6%	18,6%	18,6%	18,6%	19,3%	11 134	

Legenda: \* Linhagens brancas – genótipo  $w\bar{y}^2$

\*\* Frequência de recombinação com genótipo  $w\bar{y}^2$ , utilizando como total de 82 colônias para efetuar as contas.

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSAD, F. F.; TUCKER, K. L.; SIGNER, E. R. Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. **Plant Mol. Biol.**, v.22, 1067-1985,1993.
- AYOAMA, H. AND LITVAK, S. RNA-dependent activity for wheat germ DNA polymerase A. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 29, p. 267-278, 1986.
- AZEVEDO, J.L. Mitotic non conformity in *Aspergillus nidulans*. England, University of Sheffield. 1971, 240p. (Ph.D. Thesis).
- BARTLING, S., VAN DEN HOMBERGH, J.P., OLSEN, O., VON WETTSTEIN, D., VISSER, J. Expression of an *Erwinia* pectate lyase in three species of *Aspergillus*. **Curr. Genet.**, v. 29, n. 5, p. 474-481, 1996.
- BAULCOMBE, D. C.; ENGLISH, J. J. Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional silencing in transgenic plants. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 7, p 173-80, 1996.
- BEISEL, C.; IMHOF, A.; GREENE, J.; KREMMER, E.; SAUER, F. Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature*. 2002. Disponível em: [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature). Acesso em: 9 out. 2002.
- BELJANSKI, M. Reverse transcriptase in bacteria: small RNAs as genetic vector and biological modulator. **Brazil. J. Genet.**, v. 14, p. 873-895, 1991.
- BELJANSKI, M., MANIGAULT, P., BOURGAREL, P. Transformation of *Agrobacterium tumefaciens* into a non-oncogenic species by an *Escherichia coli* RNA. **Proc. Natl. Acad. USA.**, v. 69(1), p. 191-195, 1972.
- BELJANSKI, M., NIU, L.C., BELJANSKI, M.S., YAN, S., NIU, M.C. Iron stimulated RNA-dependent DNA polymerase activity from goldfish eggs. **Cell. Mol. Biol.**, v. 34, p. 17-25, 1988.
- BENNETT, J. W. Differentiation and secondary metabolism in mycelial fungi (1981). In: Bennett, J. W.; Ciegler, A. (Eds). **Secondary Metabolism and Differentiation in Fungi**. New York: Marcel Dekker. 1983, p. 1-32.

- BENNETT, J. W. **Taxonomy of fungi and biology of the *Aspergilli***. Stoneham, MA: Butterworths Publishers, p. 359-406, 1985.
- BENNETT, J. W.; KELLER, N. P. Mycotoxins and their prevention. In Dezotti, N.O.C.R. Estudo genético da produção de esterigmatocistina em *Aspergillus nidulans*, 1999. 159p. Tese de (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BENNETT, J. W.; HOROWITZ, P. C. Production of sclerotia by aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycol.*, v. 71, p. 415-422, 1979.
- BERCOVITZ, A.; PELEG, Y.; BATTAT, E.; ROKEM, J. S.; GOLDBERG, I. Localisation of pyruvate carboxylase in organic acid producing *Aspergillus* strains. *Appl. Envir. Microbiol.*, v. 56, p. 1594-1597, 1990.
- BERSET, C. Enzimas imobilizadas. In: Scriban, R. (coord.) **Biotechnology**. São Paulo, S.P.: Manole. 1985. P. 221-237.
- BESTOR, T.H.; COXON, A. The pros and cons of cytosine methylation. *Curr. Biol.*, v. 3, p. 384-386, 1993.
- BESTOR, T.H.; TYCKO, B. Creation of genomic methylation. *Nat. Genet.*, v. 12, p. 363-367, 1996.
- BESTOR, T.H. Gene silencing: methylation meets acetylation. *Nature*, v. 393, p 311-312, 1999.
- BRIGHT, H. J.; PORTER, D. J. T. Flavoproteins Oxidases. In: Boyer, P. D. The enzymes. Oxidation reduction – part B. 3ed. New York, N. Y.: **Academic**, 1975, 12: 421-505.
- BULL, J.H.; SMITH, D. J.; TURNER, G. Transformation of *Penicillium chrysogenum* with a dominant selectable marker. *Curr. Genet.*, v. 13, p. 377-382, 1988.
- CALAM, C. T. The evaluation of mycelial growth. In: LOURENÇO, A. **Cinética de crescimento de cepas toxigênicas de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxina B1**. São

Paulo, 1996. 87p. Dissertação de (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. The fungi. Academic Press. Harcourt Brace & Company, Publishers. 482p. 1996.

CASTRO-PRADO, M.A.A. AND ZUCCHI, T.M.A.D. Stabilization of a duplicated segment *Dp(II-I)* in an *uvr* mutant of *Aspergillus nidulans* through genetic mechanisms. **Brazil J. Genet.**, v. 14, p. 239-248, 1991.

CASTRO-PRADO, M.A.A.; ZUCCHI, T.M.A.D. Inactivation of DNA sequences in *Aspergillus nidulans* through non-linked duplication. **Brazil J. Genet.**, v. 16, p. 211-217, 1993.

CASTRO-PRADO, M.A.A.; ZUCCHI, T.M.A.D. Characterization of the *Dp(II,I)* in *Aspergillus nidulans*: presence of the *AcrA<sub>1</sub>* gene and its regulatory transcription sequence in the transposed segment. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 15, p. 777-788, 1992.

CASTRO-PRADO, M.A.A., GEBARA, J.S., QUEROL, C.B., ZUCCHI, O.L.D., ZUCCHI, T.M.A.D. Duplicated gene inactivation affects ascospore viability in *Aspergillus nidulans*. **Braz. J. Genet.**, v. 19, p. 381-386, 1996.

CASTRO-PRADO, M.A.A.; ZUCCHI, T.M.A.D. A gene inactivation system acting in meiosis of a duplicated strain of *A. nidulans*. **Brazil J. Genet.**, v.19, p. 17-25, 1996.

CLUTTERBUCK, A. J. *Aspergillus nidulans*. In Dezotti, N. O. C. R.; Zucchi, T. M. A. D. Estudo genético da produção de esterigmatocistina em *Aspergillus nidulans*., 1999. 159p. Tese de (doutoramento) em Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo.

CLUTTERBUCK, A. J. Sexual and parasexual genetics of *Aspergillus* species. In Bennett, J. W. & Klick, M. A. (Eds.). *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*. Biotechnology Series. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. v. 23, p. 3-18.

COGONI, C.; MACINO, G. Conservation of transgene induced post transcriptional gene silencing in plants and fungi. *Trend Plants Sci*, v. 2, p. 438-443, 1997.

COGONI, C. IRELAN, J.T., SCHUMAKER, J., SCHMIDHAUSER, T.J., SELKER, E.U., MACINO, G. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cell of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *Embo J.*, v. 15, p. 3153-3163, 1996.

COLOT, V., MALOISIEL, L., ROSSIGNOL, J.L. Interchromosomal transfer of epigenetic states in *Ascolobus*: transfer of methylation is mechanistically related to homologous recombination. *Cell.*, v. 86, p. 854-864, 1996.

COLOT, V., MALOSIEL, L., ROSSIGNOL, J.L. ADN répété et recombinaison homologue: un rôle probable de la méthylation de l'ADN dans la stabilité des genomes des cellules eucaryotes. *J. Soc. Biol.*, v. 193(1), p. 29-34, 1999.

CONNERTON, I.F. Premeiotic disruption of the *Neurospora crassa* malate synthase gene by native and divergente DNAs. *Mol. Gen. Genet.*, v. 223, p. 319-323, 1990.

COVE, D. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. New York: Academic Press, 1977. In Dezotti, N. O. C. R.; Zucchi, T. M. A. D. **Estudo genético da produção de esterigmatocistina em *Aspergillus nidulans***. São Paulo, 1999. 159p. Tese de (doutoramento) em Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo.

CRAIG, N.L. Unity in transposition reaction. *Science.*, v. 270, p. 253-254, 1995.

CRISEO, G.; URZI, C.; PERNICE, I.; MEDICI, M. A. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* link under cycling temperatures. *J. Food Sci.*, v. 1, p. 43-51, 1990.

DAVIES, J. E.; KIRKALDY, D.; ROBERTS, J. C. Studies in micologycal chemistry. Part VII: Sterigmatocustin, a metabolite of *Aspergillus versicolor* (Vuillemin) Tiraboschi. *J. Chem. Soc.*, p. 2169-78, 1960.

DEBUCHY, R., COPPIN-RAYNAL, E., LE COZE, D., BRYGOO, Y. Chromosome walking towards a centromere in the filamentous fungus *Podospora anserina*: cloning of a sequence lethal at a two-copy state. *Curr. Genet.*, v. 13, p. 105-111, 1988.

- DEZOTTI, N.O.C.R. **Estudo genético da produção de esterigmatocistina em *Aspergillus nidulans*.**, 1999. 159p. Tese de (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- DEZOTTI, N.O.C.R.; ZUCCHI, T.M.A.D. Identification of *Aspergillus nidulans* genes essential for the accumulation of sterigmatocystin. *Fungal Genetics Biol*, v. **34**, p. 93-105, 2001.
- DOUGHERTY, W. G.; PARKS, T. D. Transgenes and gene suppression: Telling us something new? **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. **7**, p. 399-405, 1995.
- DREW, S. W.; WALLIS, D. A. Regulation of secondary metabolism and keys to its manipulation. In: Bennett, J. W.; Ciegler, A. eds. **Secondary metabolism and differentiation in fungi**. New York, Marcel Dekker, 1983, 478ps.
- DUMONT, J.; FORTIER, G. Behavior of glucose oxidase immobilized in various electropolymerized thin films. *Biotechnol. Bioeng.*, v. **49**, p. 544-52, 1996.
- DUTTA, S.K., MUKHOPADHYAY, D.K., BHATTACHARYYA, J. RNase-sensitive DNA polymerase activity in cell fractions and mutants of *Neurospora crassa*. *Biochem. Genet.*, v. **18**, p. 743-753, 1980.
- EIDAM, E. Zur Kenntniss der Entwicklung bei den Ascomyceten. III. *Sterigmatocystis nidulans* n. sp. **Beitr. Biol. Pflanzen**, v. **3**, p. 392-411, 1883.
- ENGLISH, J. J.; MUELLER, E.; BAULCOMBE, D. C. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. **Plant Cell**, v. **8**, p. 179-88, 1996.
- FAUGERON, G.; RHOUNIM, L.; ROSSIGNOL, J. How does the cell count the number of ectopic copies of a gene in the premeiotic inactivation process acting in *Ascobolus immersus*? **Genetic**, v. **124**, p. 585-591, 1990.
- FINCHAM, J. R. S. Transformation in fungi. **Microbil. Rev.**, v. **53**, p.149-70, 1989.
- FLAVELL, R.B. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. **91**, p. 3490-3496, 1994.

FREDERICK, K. R.; TUNG, J.; EMERICK, R. S.; MASIARZ, F. R.; CHAMBERLAIN, S. H.; VASAVADA, A.; ROSENBERG, S.; CHAKRABORTY, S.; SCHOPFER, L. M.; MASSEY, V. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. **265**, p. 3793-3802, 1990.

FREE, A. H. Enzymatic determinations of glucose. *Adv. Clin. Chem.*, v. 6, p. 67-96, 1963.

FRISVAD, J. C.; THRANE, U. L. F. Standard high performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenome retention indices and UV Spectra (Diode Array Detection). *J. of Chromatography*. 1987, 195-214.

GAMS, W. Report of the committee for fungi and lichens: new series, 2. **Taxon**, v. 41, p. 99-113, 1992.

GOYON, C. AND FAUGERON, G. Targeted transformation of *A. immersus* and *de novo* methylation of the resulting duplicated DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.*, v. **13**, p. 67-80, 1989.

GRANT, S. R. Dissecting the mechanisms of posttranscriptional gene silencing: Divide and conquer. **Cell**, v. **96**, p. 3003-6, 1999.

GUEBEL, D. V.; DARIAS, N. V. T. Optimization of the citric acid production by *Aspergillus niger* through a metabolic flux balance model. **EJB Electronic Journal of Biotechnology ISSN**. 2001, v. 4, n. 1 Issue of April 15, 2001. Disponível em: <http://www.ejb.org/content/vol4/issue1/full/2/index.html> Acesso em: 24 out 2002.

GUPTA, S. R.; VISWANATHAN, L.; VENKITASUBRAMANIAN, T. A. - A comparative study of toxigenic and non-toxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *J. Gen. Microbiol.*, v. **65**, p. 243-47, 1971.

GUZMÁN-DE-PEÑA, D.; AGUIRRE, J. W.; BHATNAGAR, D.; BAHU, R. Correlation between the regulation of sterigmatocystin biosynthesis and asexual and sexual sporulation in *Emericella nidulans*. **Antonie Leeuwenhoek**, v. **73**, p. 199-205, 1998.

HAJJAR, J. D.; BENNETT, J. W.; BHATNAGAR, D.; BAHU, R. Sterigmatocystin production by laboratory strains of *Aspergillus nidulans*. **Mycol. Res.**, v. **94**, p. 548-51, 1989.

HAMADA, K., KUMAZAKI, T., MUZUNO, K., YOKORO, K. A small nuclear RNA-U5, can transform cells in vitro. *Mol. Cell. Biol.*, v. **9**, p. 4345-4356, 1989.

HERMAN, J., LATIF, F., WENG, Y., LERMAN, M.I., ZBAR, B. LIU, S., SAMID, D., DUAN, D.S.R., GNARRA, J.R., LINEHAN, W.M., BAYLIN, S.B. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. **91**, p. 9700-9704, 1994.

HOLLIDAY, R.; PUGG, J.E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, v. **187**, p. 226-232, 1975.

HOLLIDAY, R. Inheritance of epigenetic defects. *Science.*, v. **338**, p. 163-170, 1987.

HOLZAPFEL, C. W.; PURCHASE, I. F.; STEYN, P. S.; GOUWS, L. The toxicity and chemical assay of sterigmatocystin, a carcinogenic mycotoxin, and its isolation from two new fungal sources. 1966. *In: Dezotti, N.O.C.R. Estudo genético da produção de esterigmatocistina em Aspergillus nidulans.*, 1999. 159p. Tese de (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

HUCK-HUI, N. G.; BIRD, A. Histone deacetylase: silencers or hire. **Current. Opinion Genetics & Development.**, v. **11**, p. 121-125, 2000.

IGUSHI-ARIGA, S.M.M.; SCHAFFNER, W. CpG methylation of the cAMP responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specif factor binding as well as transcriptional activation. *Genes. Dev.*, v. **3**, p. 612-619, 1989.

IRELAN, J. MIAO, V.; SELKER, E. U. Small scale DNA preps for *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics. Newslett.*, v. **40**, p. 24, 1993.

JAENISCH, R., SCHNIEKE, A., HARBERS, K. Treatment of mice with 5-Azacytidine efficiently activates silent retroviral genomes in different tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. **82**, p. 1451-1455, 1985.

JAKLITSCH, W.; KUBICEK, C. P.; SCRUTTON, M. C. The subcellular localisation of itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 137, p. 533-539, 1990.

JAKLITSCH, W.; KUBICEK, C. P.; SCRUTTON, M. C. Intracellular location of enzymes involved in citrate accumulation in *Aspergillus niger*. **Can. J. Microbiol.**, v. 37, p. 823-827, 1991.

JONES, B. D. Methods of aflatoxin analysis. London: Tropical Products Institute, 1972. 58p. (Report G70).

JONES, P.L. Gene activation by 5-Azacytidine. In DNA Methylation: biochemistry and biological significance (ed. Razin *et al.*), pp. 165-187. Springer Verlag, Berlin, 1984.

KÄFER, E. An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. In Dezotti, N. O. C. R.; Zucchi, T. M. A. D. Estudo genético da produção de esterigmatocistina em *Aspergillus nidulans*., 1999. 159p Tese de (doutoramento) em Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo.

KASS, S.U., PRUSS, D., WOLFE, A.P. How does DNA methylation repress transcription? **Trend Genet.**, v. 13, p. 444-449, 1997.

KIM, K. K.; FRAVEL, D. R.; PAPAVIDAS, G. C. Identification of a metabolite produced by *Talaromyces flavus* as glucose oxidase and its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*. **Phytopathol.**, v. 78, p. 488-492, 1988.

KIMURA, G., ITAGAKI, A., SUMMERS, J. Rat cell line 3y1 and its virogenic polyoma and SV40-transformed derivatives. **Int. J. Cancer.**, v. 15, p. 964-706, 1975.

KING, G. AND MURRAY, N.E. Restriction enzymes in cells, not eppendorfs. **Trends in Microbiol.**, v. 2, p. 465-469, 1996.

KRIECHBAUM, M.; HEILMAN, H. J.; WIENTJES, F. D.; HAHN, M.; JANY, K. D.; GASSEN, H. G. Cloning and DNA sequence analysis of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* NRRL-3. **FEBS Letts.**, v. 255, p. 63-66, 1989.

- KRISHNA, S.; SINHA, K. K. Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. *In: DEZOTTI, N.O.C.R. Estudo genético da produção de esterigmatocistina em *Aspergillus nidulans*.*, 1999. 159p. Tese de (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- KUBICEK, C. P.; SCHREFERL-KUNAR, G.; WÖHRER, W.; ROEHR, M. Evidence for a cytoplasmic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Appl. Envir. Microbiol.*, v. **54**, p. 633-637, 1988.
- KUBICEK, C. P.; WITTEVEEN, C. F. B.; VISSER, J. Regulation of Organic Acid Production by Aspergilli. *The Genus Aspergillus From Taxonomy and Genetics to Industrial Application. FEMS Symposium.*, v. **69**, p. 135-45, 1994.
- KUIPIER, M.T.R. AND LAMBOVITZ, A.M. A novel reverse transcriptase activity associated with mitochondrial plasmids of *Neurospora*. *Cell.*, v. **55**, p. 693-704, 1988.
- KURASHIGE, S. AND MITSUHASYI, S. The possible presence of ribonucleic acid dependent deoxyribonucleic acid polymerase in the immune responde. *Japan. J. Microbiol.*, v. **17**, p. 105-109, 1973.
- LEE, K. Y.; POOLE, C. F.; ZLTKIS, A. Simultaneous multi-mycotoxin determination by high performance thin-layer chromatography. *Anal. Chem.*, v. **52**, p. 837, 1980.
- LEWIN, B. The mystique of epigenetics. *Cell.*, v. **93**, p. 301-303, 1998.
- LHOAS, P. Mitotic haploidization by treatment of *A. niger* diploids with p-fluorophenylalanina. *Nature, London.*, v. **190**, p. 744, 1961.
- LOURENÇO, A. **Cinética de crescimento de cepas toxigências de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxina B1.** São Paulo, 1996. 87p. Dissertação de (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- LONGO, A. B. Construção de Vetores para a Produção de Insulina Humana em *Saccharomyces cerevisiae*. São Paulo, 1997. 92p. Dissertação de (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

LUFF, B.; PAWLOWSKI, L.; BENDER, J. An inverted repeat triggers cytosine methylation of identical sequences in *Arabidopsis*. *Mol. Cell.*, v. 3, p. 5005-5011, 1999.

MAGGON, K. K.; GUPTA, S. K.; VENKITASUBRAMANIAN, T. A. Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriol. Rev.* 1977, 41: 822-55. *In: Lourenço, A. Cinética de crescimento de cepas toxigências de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxina B1. São Paulo, 1996. 87p. Dissertação de (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.*

MAHMOUD, A. L. E. Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 19, p. 110-113, 1994.

MALLETTE, M. F. Evaluation of growth by physical and chemical means. *In: LOURENÇO, A. Cinética de crescimento de cepas toxigências de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxina B1. São Paulo, 1996. 87p. Dissertação de (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.*

MANDELS, G. R. Kinetics of fungal growth. *In: LOURENÇO, A. Cinética de crescimento de cepas toxigências de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxina B1. São Paulo, 1996. 87p. Dissertação de (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.*

MARTIN, D. I. K. Transcriptional enhancers – on/off gene regulation as an adaptation to silencing in higher eukaryotic nuclei. *Trends in Genetics*, , v. 17 n.8, p. 444-448, 2001.

MARTIN, J. F.; DEMAIN, A. L. Fungal development and metabolite formation. *In: Lourenço, A. Cinética de crescimento de cepas toxigências de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxina B1. São Paulo, 1996. 87p. Dissertação de (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.*

MASSINI, K. C. Alterações Epigenéticas Promovidas o Genoma de *Aspergillus nidulans* pelo Tratamento com Hemolinfa de Insetos. São Paulo, 2001. 99p. Dissertação de (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MATZKE, A.A.J.M., NEUHUBER, F., PARK, Y.D., AMBROS, P.F., MATZKE, M.A. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes [published erratum appears in Mol. Gen. Genet. 1995, 20(247): 264]. Mol. Gen. Genet., v. 244, p. 219-229, 1994.

MATZKE, M.A. AND MATZKE, A.A.J.M. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: what does it really tell us? Plant. Physiol., v. 107, p. 679-685, 1995a.

MATZKE, M.A. AND MATZKE, A.A.J.M. How and why do plants inactivate homologous (trans) genes? Plant. Physiol., v. 107, p. 679-685, 1995b.

MAYORKA, M. E.; TIMBERLAKE, W. E. Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* wA gene. Genetics., v. 126, p. 73-79, 1990.

MAYORKA, M. E.; TIMBERLAKE, W. E. The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* wA gene encodes a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthase. Mol. Gen. Genet., v. 235, p. 205-12, 1992.

MEILUS, M. AND CASTRO-PRADO, M.A.A Gene Inactivation in the parasexual cycle of duplication strains of *Aspergillus nidulans*. Cytologia., v. 63, p. 395-403, 1998a.

MEILUS, M. AND CASTRO-PRADO, M.A.A. GIS (Gene Inactivation System) extension into a unique sequence outside of the II-I insertional duplication in *Aspergillus nidulans*. Canadian J. Microbiol., v. 44, p. 1037-1044, 1998b.

MERT, H. H.; EKMEKCI, S. The effect of salinity and osmotic pressure of the medium on the growth, sporulation and changes in the total organic acid content of *Aspergillus flavus* and *Penicillium chrysogenum*. Mycopathologia: v. 100, p. 85-89, 1988.

MEYER, P., HEIDMANN, J., NIEDENHOF, I. Differences in DNA-methylation are correlated with a paramutation phenomenon in transgenic petunia. Plant J., v. 4, p. 89-100, 1993.

MISHRA, N.C., NIU, M.C., TATUM, E.L. Induction by RNA of RNA independence in *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v. 72, p. 642-645, 1975.

- MORPURGO, C. Somatic segregation induced by pFA *Aspergillus* Newsletter, v. 2, p. 10, 1961.
- MOSS, M. O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. *In*: Smith, J. E.; Henderson, R. S. (Eds). *Mycotoxin and Animal Foods*. Boca Raton: CRC Press, v. 84, p. 4445-4449, 1991.
- NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **Plant Cell**, v. 2, p 279-289, 1990.
- NAN, X.N.G., JONHSON, C.A., LAHERTY, C.D., TURNER, B.M., EISENMAN, R.N., BIRD, A. Transcription repression by the methyl-CpG binding protein MeCP2 involve a histone deacetylase complex. *Nature*, v. 393, p. 386-389, 1998.
- NIU, M.C., XUE, G.X., NIU, L.C., HUANG, H.Z. Transfer of information from mRNA to chromosomes by reverse transcription in early development of goldfish eggs. *Cell. Mol. Biol.*, v. 35, p. 333-345, 1989.
- OSMANI, S. A.; SCRUTTON, M. C. The subcellular location of pyruvate carboxylase and some other enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Eur. J. Biochem.*, v. 133, p. 551-560, 1983.
- PALAUQUI, J. C.; BALZERGUE, S. Activation of systemic acquired silencing by localised introduction of DNA. *Curr Biol.*, v. 9, p. 59-66, 1999.
- PANG, S. Z.; JAN, F. J.; GONSALVES, D. Nontarget DNA sequences reduce the transgene length necessary for RNA-mediated tospovirus resistance in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 94, p. 8261-8266, 1997.
- PASSOS JR., G.A.S. AND DE LUCCA, F.L. In vitro induction of immunological memory to human tumor extract with poly(A)-containing immune RNA. *Cell. Mol. Biol.*, v. 34, p. 157-164, 1988.
- PAZUR, J. H. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. 1966. *In*: Kubicek, C. P.; Witteveen, C. F. B.; Visser, J. *Regulation of Organic Acid Production by Aspergilli*. The Genus

*Aspergillus* From Taxonomy and Genetics to Industrial Application. FEMS Symposium., v. 69, p. 135-45, 1994.

PEIT, N.N. AND RUSSO, V.E.A. Reversible inactivation of a foreign gene, *hph*, during the asexual cycle in *Neurospora crassa* transformants. Mol. Gen. Genet., v. 234, p. 412-422, 1992.

PELEG, Y.; STIEGLITZ, B.; GOLDBERG, I. Malic acid accumulation in *Aspergillus flavus*. I. Biochemical aspects of acid biosynthesis. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 28, p. 69-75, 1988.

PELISSIER, T.; THALMEIR, S.; KEMPE, D.; SANGER, H. L.; WASSENEGGER, M. Heavy de novo methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. Nucl. Acids Res., v. 27, p. 1625-1634, 1999.

PFEIFER, G.P., STEIGERWALD, S.D., HANSEN, R.S., GARTLER, S.M., RIGGS, A.D. Polymerase chain reaction-aided genomic sequencing of an X chromosome-linked CpG island: methylation patterns suggest clonal inheritance, CpG site autonomy, and an explanation of activity state stability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v. 87, p. 8252-8256, 1990.

PIRES, L.T.A.; ZUCCHI, T.M.A.D. Ribonucleic acid treatment alters gene expression in diploid strains of *Aspergillus nidulans*. Cell. Mol. Biol., v. 44, p. 303-313, 1998.

REINISCH, K.M., CHEN, L., VERDINE, G.L., LIPSCOMB, W.M. The crystal structure of Hae III methyltransferase covalently complexed to DNA: an extrahelical cytosine and rearranged base pairing. Cell., v. 82, p. 143-153, 1995.

REUSS, M.; FRÖHLICH, S.; KRAMER, B.; MESSERSCHMIDT, K.; POMMERENING, G. Coupling of microbial kinetics and oxygen transfer for analysis and optimisation of gluconic acid production by *Aspergillus niger*. Bioproc. Eng., v. 1, p. 79-91, 1986.

RIGGS, A.D. AND PORTER, T.N. X-Chromosome inactivation and epigenetic mechanisms. In: Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 231-248, 1996.

RIGGS, A.D. X-inactivation, differentiation and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.*, v. **14**, p. 9-11, 1975.

RODAS, A. C. D. Utilização da radiação ionizante na obtenção de suportes poliméricos para a mobilização de enzimas com potencial de uso clínico. 1997. 109p. Tese de (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Área: Tecnologia Nuclear, São Paulo.

ROEHR, M.; KUBICEK, C. P.; KOMINEK, J. Gluconic acid. (1983) *In*: Kubicek, C. P.; Witteveen, C. F. B.; Visser, J. Regulation of Organic Acid Production by Aspergilli. **The Genus Aspergillus From Taxonomy and Genetics to Industrial Application. FEMS Symposium.**, v. **69**, p. 135-45, 1994.

ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: Transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Mol. Microbil.**, v. **6**, p. 3343-53, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSC, E. F.; MANIATS, T. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup>., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCOTT, P. M. *Penicillium* and *Aspergillus* toxins. *In*: Miller, J. D.; Trenholm, H. L. (Eds). **Mycotoxins in Grains – Compound Other than Aflatoxin**. St. Paul, USA: Eagan Press., p. 261-85, 1994.

SELKER, E.U. Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. *Annu. Rev. Genet.*, v. **24**, p. 579-613, 1990.

SELKER, E.U. Epigenetic phenomena in filamentous fungi: useful paradigms or repeat-induced confusion? *Trends in Genetics.*, v. **13**, p. 296-301, 1997.

SELKER, E.U.; GARRET, P. W. DNA Sequence duplications trigger gene inactivation in *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. **85**, p. 6870-6874, 1998.

SELKER, E.U., CAMBARERI, E.B., JENSENS, B.C., HOOCK, K.H. Rerangements of duplicated DNA in specialized cells of *Neurospora*. *Cell.*, v. **57**, p. 741-752, 1987.

SHARMA, A.; BEHERE, A. G.; PADWAL-DESAI, S. R.; NADKARNI, G. B. Influence of inoculum size of *Aspergillus parasiticus* spores on alatoxin production. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 40, p. 989-993, 1980.

SIJEN, T.; KOOTER, J. M. Post-transcriptinal gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? *BioEssays*, , Wiley & Sons, Inc. v. 22, p. 520-31, 2000.

SOAREZ; RODRIGUEZ-AMAYA, J. *Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 72(1), p. 22-26, 1989.

SMITH, J. E.; MOSS, M. O. *Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance*. Great Britain: John Wiley & Sons, 1985, 148p. *In: Dezotti, N. O. C. R.; Zucchi, T. M. A. D. Estudo genético da produção de esterigmatocistina em Aspergillus nidulans*. São Paulo, 1999. 159p. Tese de (doutoramento) em Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo.

SPENCER, P. S.; NASCIMENTO, N.; TEMPONE, A. G.; LOURENÇO, C. O.; ANDRADE JUNIOR, H. F.; ROGERO, J. R. A fast screening procedures for L-amino acid oxidase activity. *In: Reunião Annual XXVII<sup>a</sup> Sociedade Brasileira de bioquímica e biologia molecular (SBBq)*. Resumo: número K-104. 1998. Caxambu – MG, p. 110.

STACK, M.; RODRICKS, J. V. Method for analysis and chemical confirmation of sterigmatocystin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 54, p. 86-90, 1971.

STAM, M.; DE BRUIN, R.; KENTER, S.; VAN DER HOOM, R. A. L.; VAN BLOKLAND, R.; MOL, J. N. M.; KOOTER, J. M. Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. *Plant J.*, v. 12, p. 63-82, 1997.

STANIER, R. Y.; DOUDOROF, M.; ADELBERG, E. A. O mundo dos micróbios. São Paulo, Edgard Blucher, 1969, *In: LOURENÇO, A. Cinética de crescimento de cepas toxigências de Aspergillus flavus e produção de aflatoxina B1*. São Paulo, 1996. 87p. Dissertação de (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

SUZUKI, D.T; GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. *Introdução à Genética*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., p. 76-120, 1992.

SZYF, M. L'enzyme Qui contrôle le silence des gènes. *La recherche.*, v. 324, p. 56-63, 1999.

TEMIN, H. Malignant transformation of cells by viruses. *Perspect. Biol. Med.*, v. 14(1), p. 11-26, 1970.

TEMIN, H.M. Reverse transcription in the eukaryotic genome: retroviruses, pararetroviruses, retrotransposons and retrotranscripts. *Mol. Biol. Evol.*, v. 2, p. 455-468, 1985.

TILBURN, J.; ROUSSEL, F.; SCAZZOCCHIO, C. Insertional and cloning of the *wA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Genetics.*, v. 126, p. 81-90, 1990

TILGHMAN, S.M. The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell.*, v. 96, p. 185-193, 1999.

TIMBERLAKE, W.; MARSHALL, M. A. Genetics engineering of filamentous fungi. *Science.*, v. 244, p. 1313-1317, 1988.

UPDIKE, S. J.; SHULTS, M. C.; BUSBY, M. Continuous glucose monitor based on an Immobilized enzyme electrode detector. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 93, n4, p. 519-27, 1979.

VAN DER KROL, A. R.; MUR, L. A.; BELD, M.; MOL, J. N. M.; STUITJE, A. R. Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell.*, v. 2, p. 291-299, 1990.

VAN DE VATE, C. AND JANSEN, G.J.O. Meiotic recombination in a duplication strain of *Aspergillus nidullans*. *Genet. Res.*, v. 31, p. 29-52, 1978.

VAN EGMOND, H. D.; PAULSCH, W. E.; DEIJLL, E.; SCHULLER, P. L. Thin layer chromatographic method for analysis and chemical confirmation of sterigmatocystin in cheese. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 63, p.110-114, 1980.

VINING, L. C. Function of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 44, p. 395-427, 1990.

VISSER, S. A. Studies on *Aspergillus flavus* Link and its metabolites. *J. Biol. Appl. Chem.*, v. 10, p. 11-18, 1967.

VOINNET, O.; VAIN, P.; ANGELL, S.; BAULCOMBE, D. C. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. **Cell**, v. **95**, p. 177-187, 1998.

VON STORP, G. N. L. H; GUILBAULT, G. G. Enzyme electrode for glucose based on an Iodide membrane sensor. **Anal. Chim. Acta.**, v. **66**, p. 443-455, 1973.

VUILLEMIN, P. Sartorya, nouveau genre de Plectascinéés angiocarpes. **Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.**, **184**: 136-7, 1927.

WADDINGTON, C. H. Epigenetics and evolution. **Symp. Soc. Exp. Bil.**, **7**: 186-99, 1953.  
*In*: MASSINI, K. C. Alterações Epigenéticas Promovidas o Genoma de *Aspergillus nidulans* pelo Tratamento com Hemolinfa de Insetos. São Paulo, 2001. 99p. Dissertação de (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

WALSH, C.P., CHAILET, J.R., BESTOR, T.H. Transcription of IAP endogenous retrovirus is constrained by cytosine methylation. **Nat. Genet.**, v. **20**, p. 116-117, 1998.

WASSENEGER, M. AND PELISSIER, T. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. **Plant Molecular Biology.**, v. **37**, p. 349-362, 1998.

WHITTINGTON, H.; KERRY-WILLIAMS, S.; BIDGOOD, K.; DODSWORTH, N.; PEBERDY, J. F.; DOBSON, M.; HINCHLIFFE, E.; BALLANCE, D. J. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *A. niger*, *A. nidulans* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. **18**, p. 531-536, 1990.

WICKLOW, D. T.; SHOTWELL, O. L. Intrafungal distribution of aflatoxins among conidia and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Can. J. Microbiol.**, v. **29**, p. 1-5, 1983.

WINTER, G. Die Pilze Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. **Rabenhorst's Kryptogamen-Flora**, 2. Ed., v. **1**, p. 62, 1884.

WITTEVEEN, C. F. B.; VEENHUIS, M.; VISSER, J. Location of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. **Appl. Envir. Microbiol.**, v. **58**, p. 1190-1194, 1992.

WITTEVEEN, C. F. B.; VAN DEN VONDERVOORT, P. J. I.; VAN DEN BROECK, H. C.; VAN ENGELENBURG, F. A. C.; DE GRAAFF, L. H.; HILLEBRAND, M. H. B. C.; SCHAAP, P. J.; VISSER, J. The induction of glucose oxidase, catalase and lactonase in *Aspergillus niger*. 1993. In: Kubicek, C. P.; Witteveen, C. F. B.; Visser, J. Regulation of Organic Acid Production by Aspergilli. **The Genus Aspergillus From Taxonomy and Genetics to Industrial Application. FEMS Symposium.**, v. 69, p. 135-145, 1994.

YISRAELI, J. AND SZYF, M. In: DNA methylation: biochemistry and biological significance (Razin, A., Cedar, H., Riggs, A.D., eds.), pp. 353-378. Springer Verlag, 1984.

ZÄHNER, H.; ANKE, H.; ANKE, T. Evolution and secondary pathways. In: Bennett, J. W.; Ciegler, A. (Eds). Secondary Metabolism and Differentiation in fungi. New York: Marcel Dekker., p. 153-71, 1983.

ZUCCHI, T.M.A.D. Instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 1975, 96p. (Tese de Doutorado).

ZUCCHI, T.M.A.D. Estudo de fatores genéticos que alteram as frequências de recombinação em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Ribeirão Preto, 1986. V.1. 244p. Tese de Livre-Docência – Faculdade de odontologia de Ribeirão preto da Universidade de São Paulo.

ZUCCHI, T.M.A.D., PASSOS JR., G.A.S., DE LUCCA, F.L. RNA-mediated genetic transformation in *Aspergillus nidulans*. Cell. Mol. Biol., v. 35, p. 573-580, 1989.

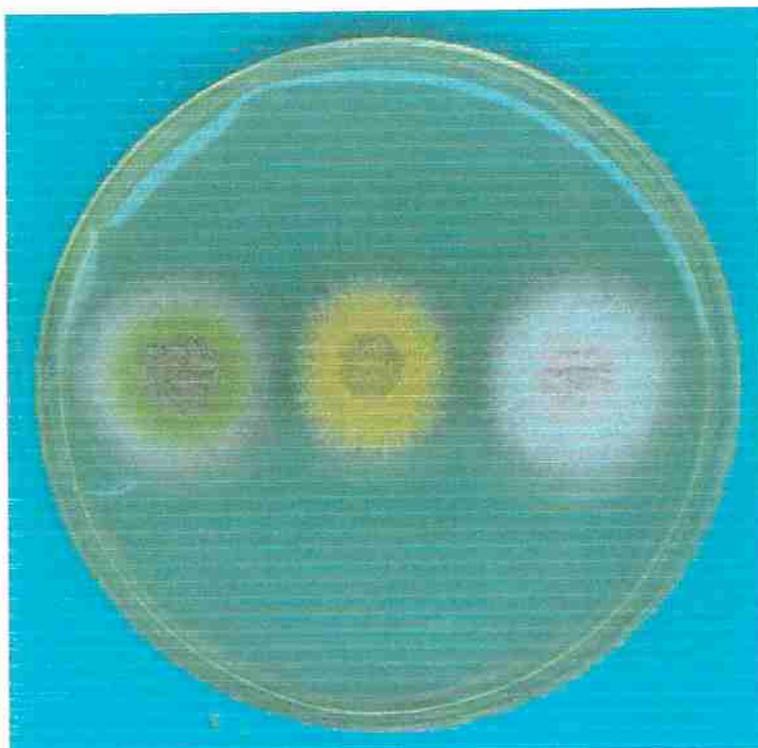
ZUCCHI, T.M.A.D. Isolation of putative recombination mutants of *Aspergillus nidulans*. Braz. J. Genet., v. 13, p. 409-443, 1990.

ZUCCHI, T.M.A.D. RNA-Mediated transformation in *Aspergillus nidulans* recovers gene functions lost by deletion or by point mutations. Cell. Mol. Biol., v. 42(6), p. 889-904, 1996.

ZUCCHI, T.M.A.D., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A., FERREIRA, S.H., DE LUCCA, F.L. Transformation of *Aspergillus nidulans* by RNA from rat macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Cell. Mol. Biol., v. 42(2), p. 235-240, 1996.

**ANEXO 1: Linhagens Controle**

**Figura 1: Linhagens Master: UT184 – Chartreuse, UT196 – Amarela e UT448 - Branca**



**Anexo 2: Linhagens tratadas**

Figura 2: Linhagens tratadas

Fig. 2.1- Rtin1<sup>4</sup>; Fig. 2.2- Rtin2<sup>1</sup>; Fig. 2.3- Rtin2<sup>6</sup>; Fig. 2.4- RtinS1<sup>3</sup>; Fig. 2.5-RtinS1<sup>10</sup>; Fig. 2.6- RtinS1.2<sup>6</sup>



Fig. 2.1.



Fig. 2.2.



Fig. 2.3.

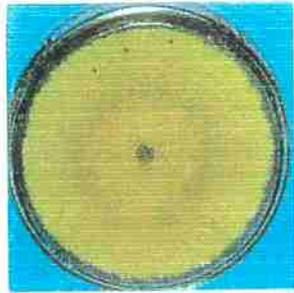


Fig. 2.4.

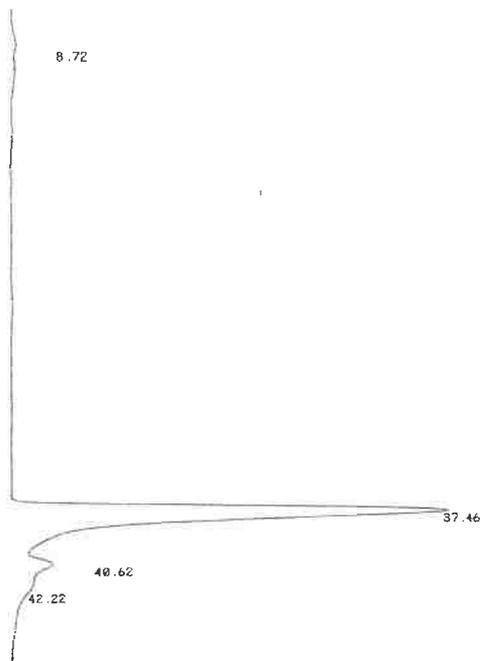


Fig. 2.5.

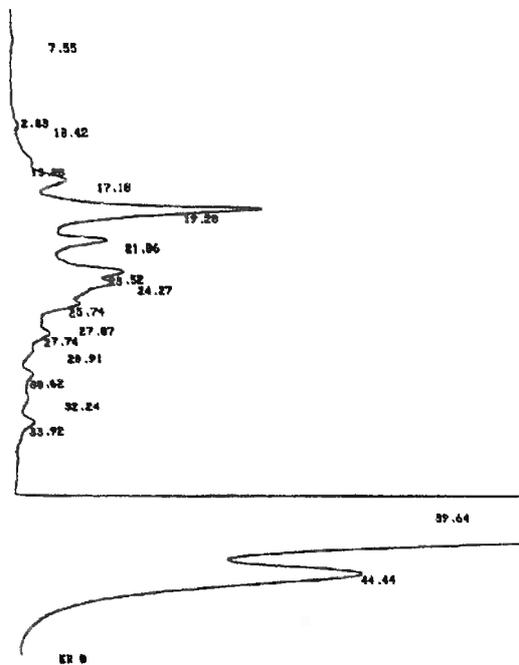


Fig. 2.6.

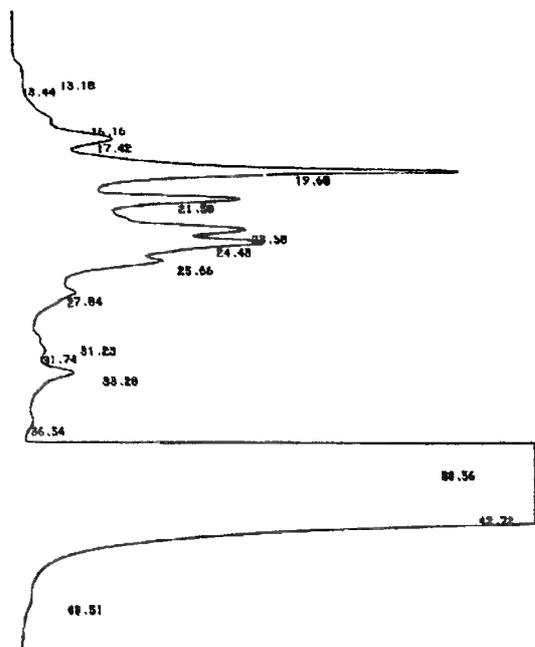
**Anexo 3: Análise Proteica em HPLC**



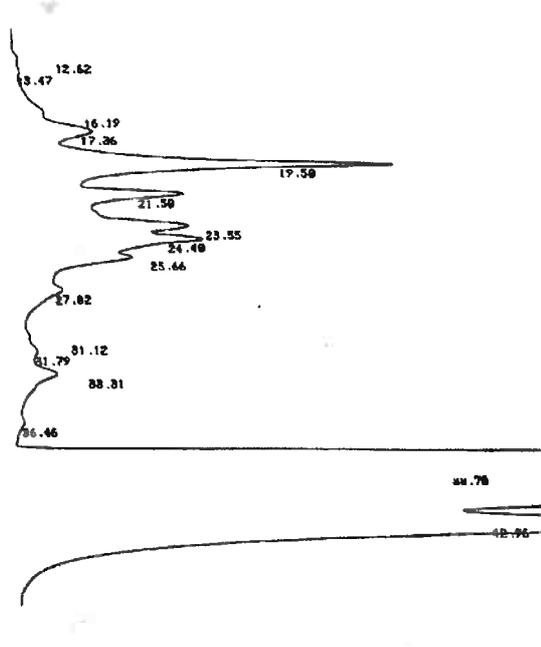
Cromatograma 1: Padrão de Insulina



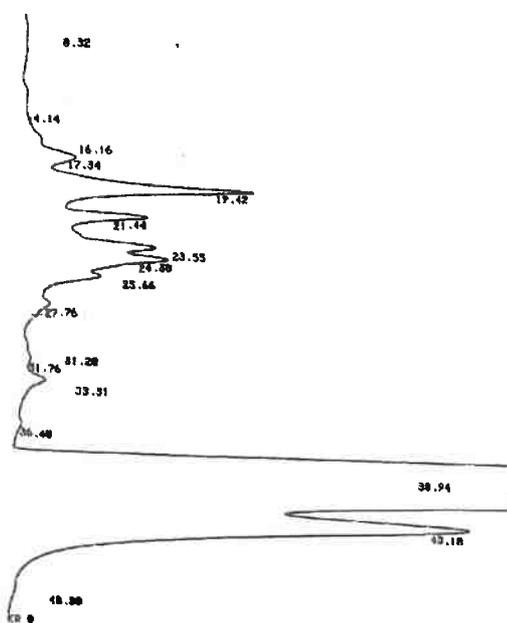
Cromatograma 2: Linhagem Controle UT448



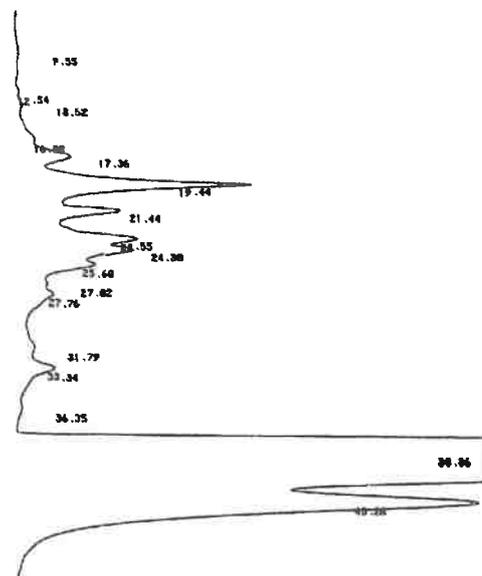
Cromatograma 3: Linhagem RT1<sup>4</sup>



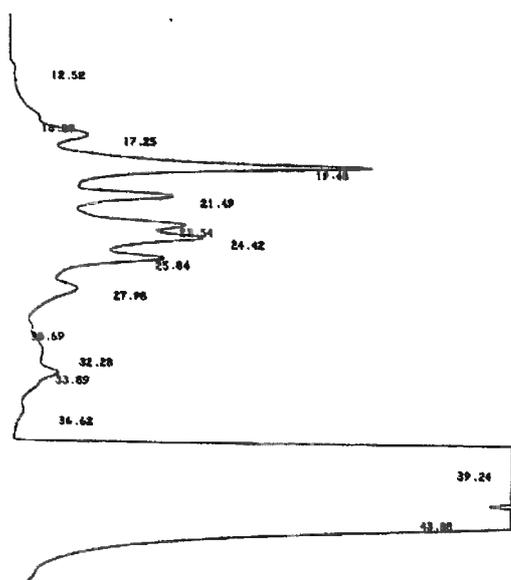
Cromatograma 4: Linhagem RT2<sup>1</sup>



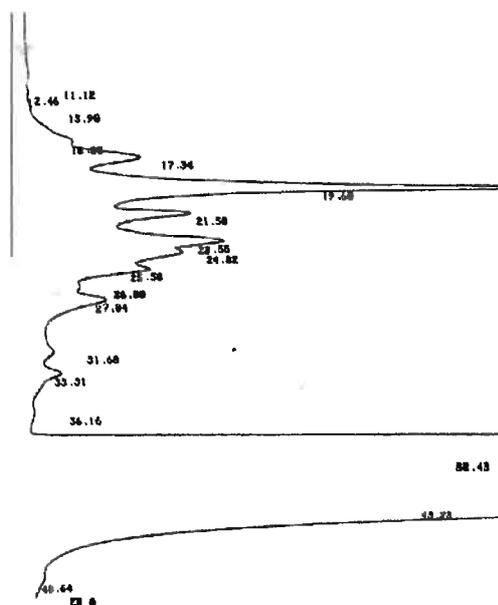
Cromatograma 5: Linhagem RT2<sup>6</sup>



Cromatograma 6: Linhagem RTS1<sup>3</sup>

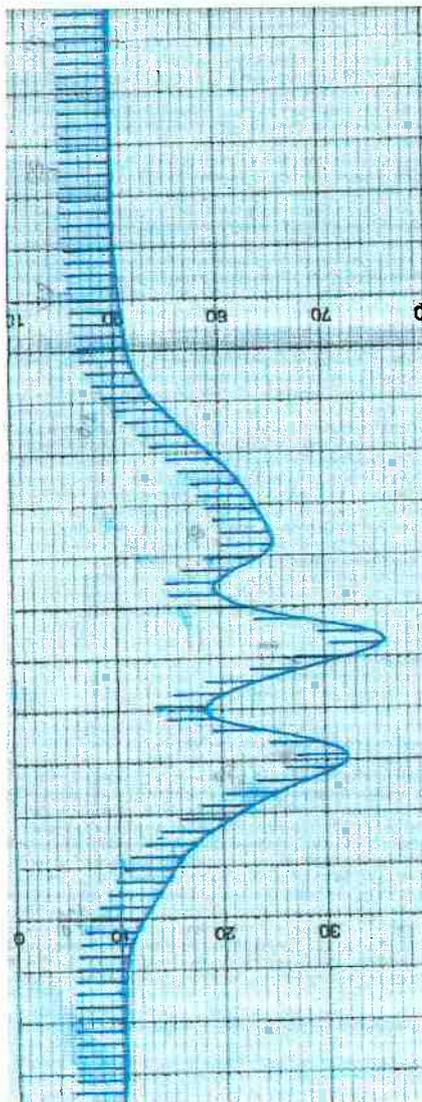


Cromatograma 7: Linhagem RTS1<sup>10</sup>

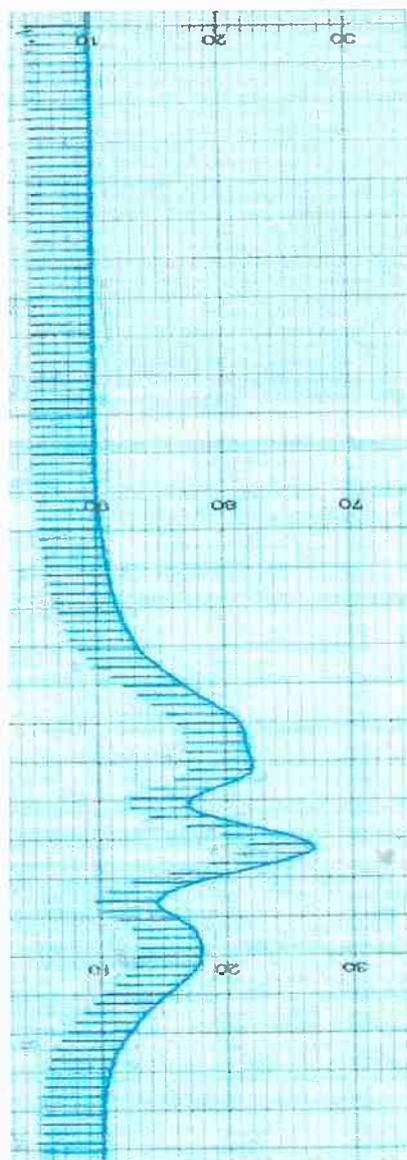


Cromatograma 8: Linhagem RTS1.2<sup>6</sup>

**Anexo 4: Fracionamento por Gel filtração - FPLC**

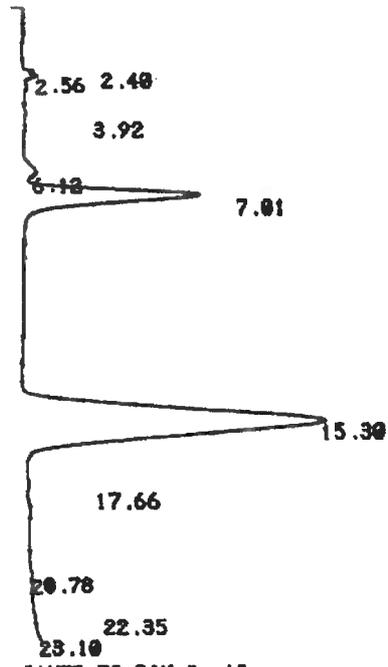


Cromatograma 9: Linhagem UT448

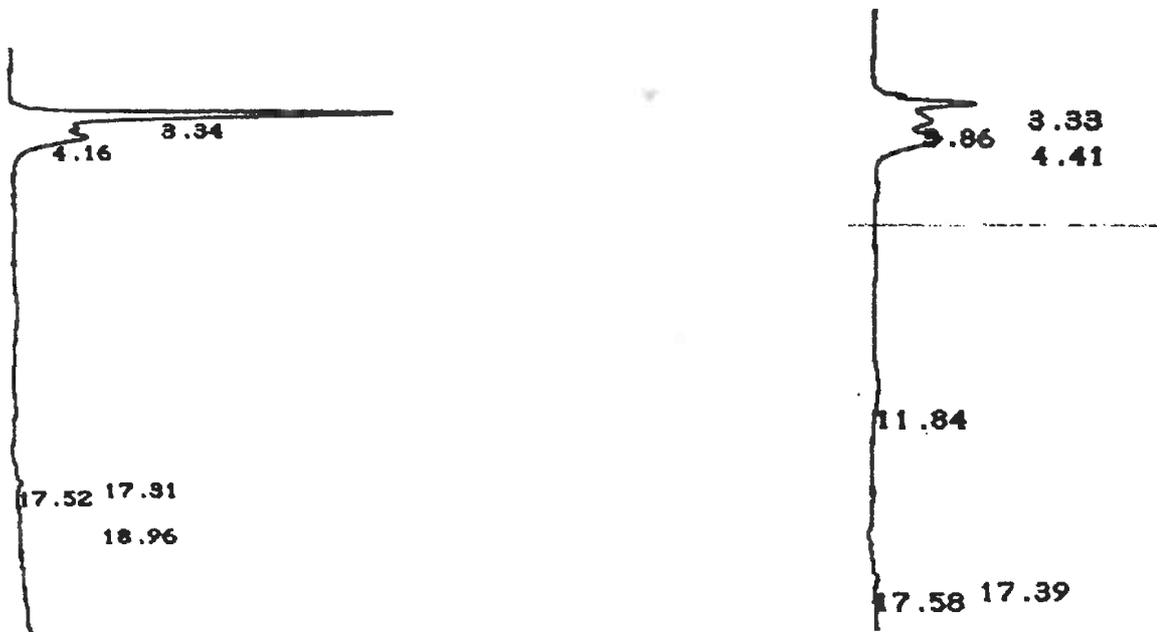


Cromatograma 10: Linhagem RtinS1.2<sup>6</sup>

**Anexo 5: Cromatografia de fase reversa após gel filtração**



Cromatograma 11: Padrão de Insulina – HPLC fase reversa



Cromatograma 12: Linhagem UT448

Cromatograma 13: Linhagem RtinS1.2<sup>6</sup>

**Anexo 6: Detecção rápida de aflatoxina e esterigmatocistina**

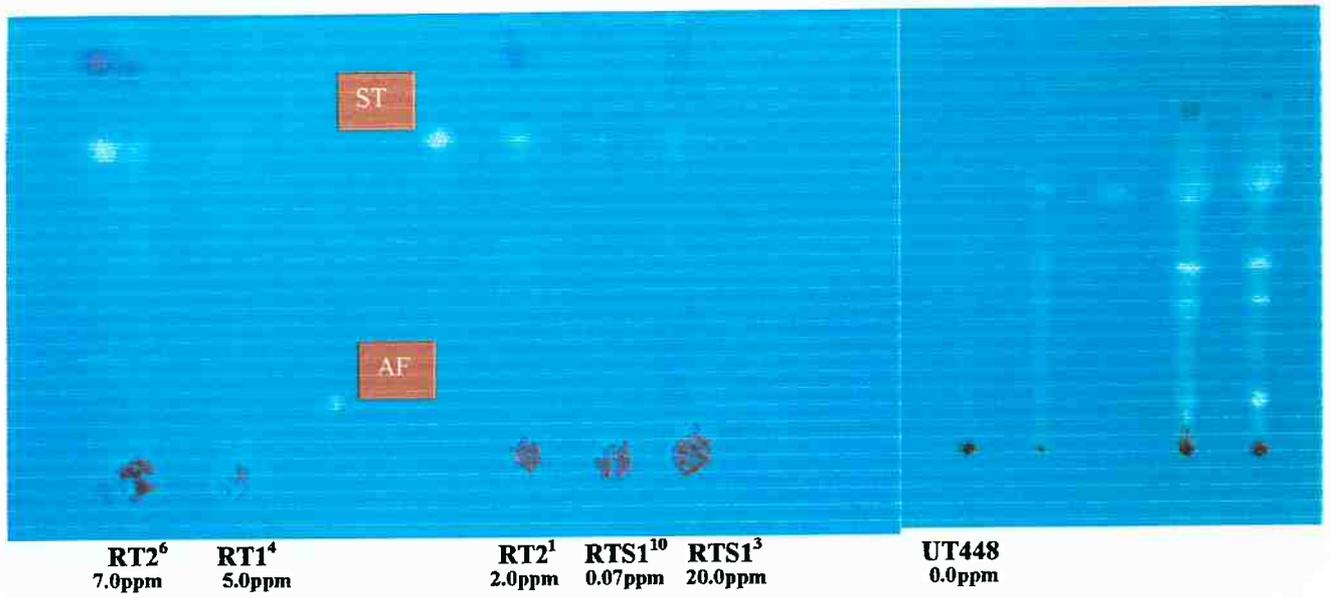
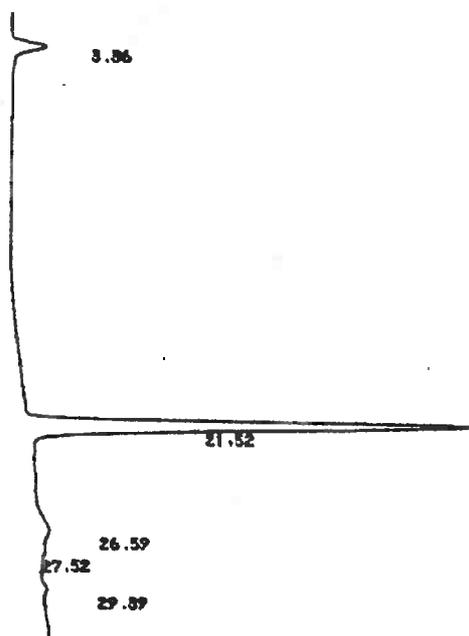
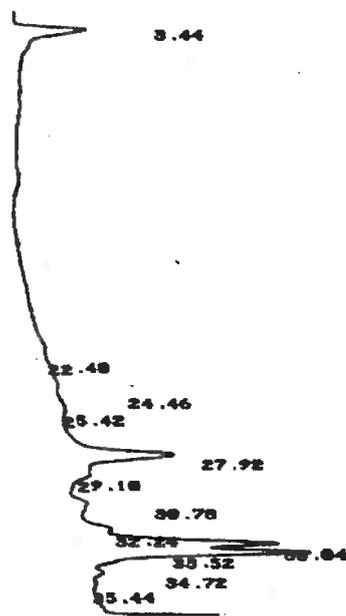


Figura 5: Cromatografia em camada delgada esterigmatocistina (Dezotti and Zucchi, 2001)

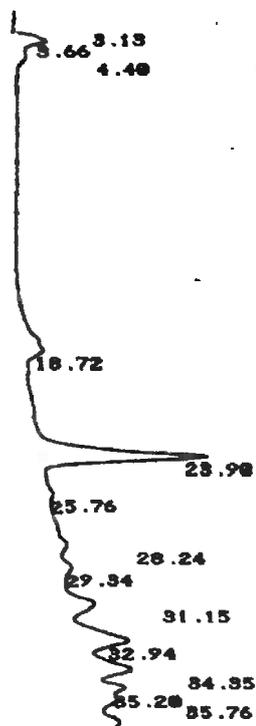
Anexo 7: Dosagem de Esterigmatocistina em HPLC fase reversa



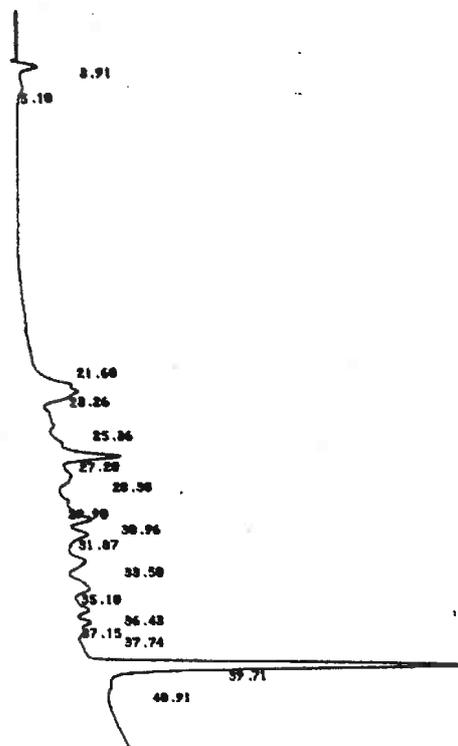
Cromatograma 14: Padrão de Esterigmatocistina (10µg/ml)



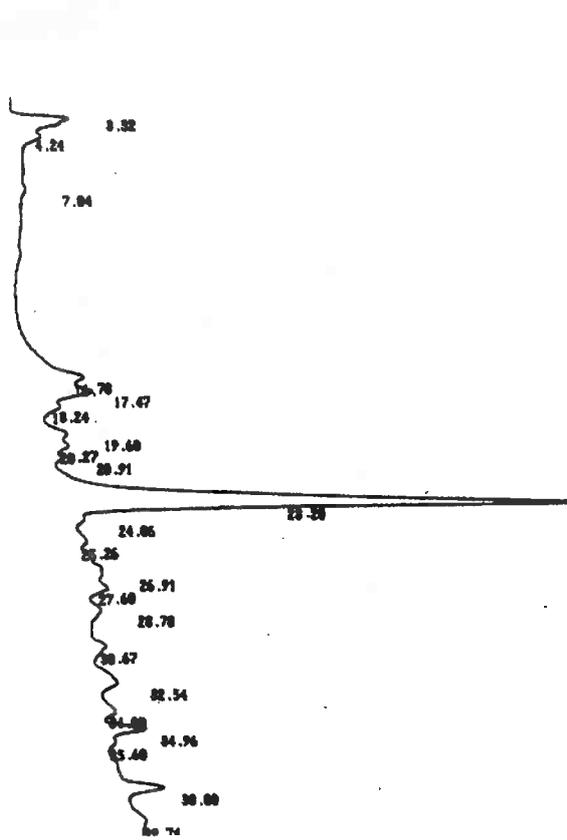
Cromatograma 15: Linhagem Controle UT448



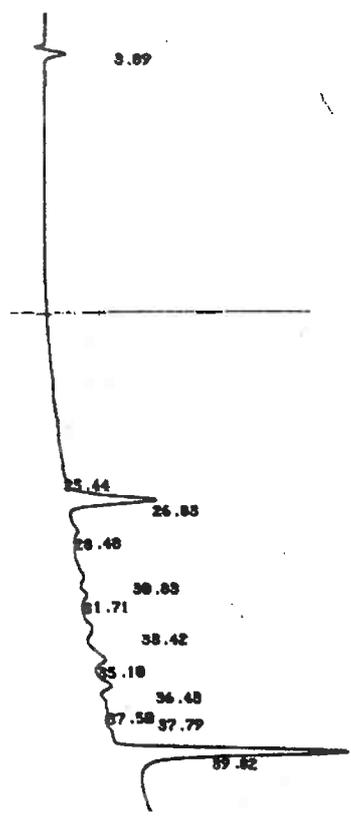
Cromatograma 16: Linhagem Rtin1<sup>4</sup>



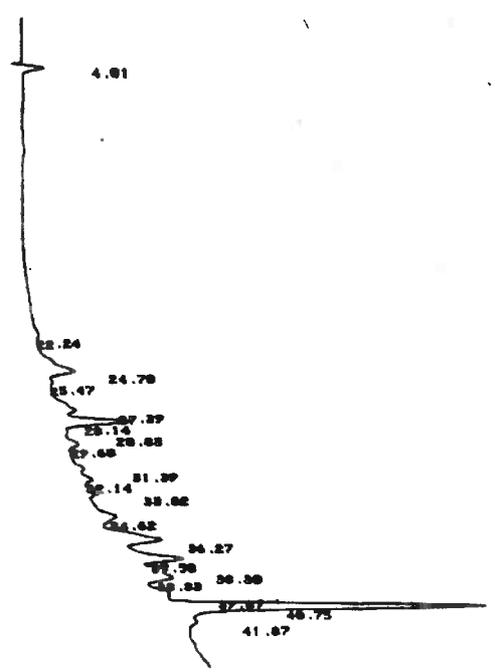
Cromatograma 17: Linhagem Rtin2<sup>1</sup>



Cromatograma 18: Linhagem Rtin2<sup>6</sup>



Cromatograma 19: Linhagem RtinS1<sup>3</sup>



Cromatograma 20: Linhagem RtinS1<sup>10</sup>

**Anexo 8: Gráficos**

Gráfico 1: Análise de macros e micros setores espontâneos obtidos em 20 colônias das linhagens tratadas em MC

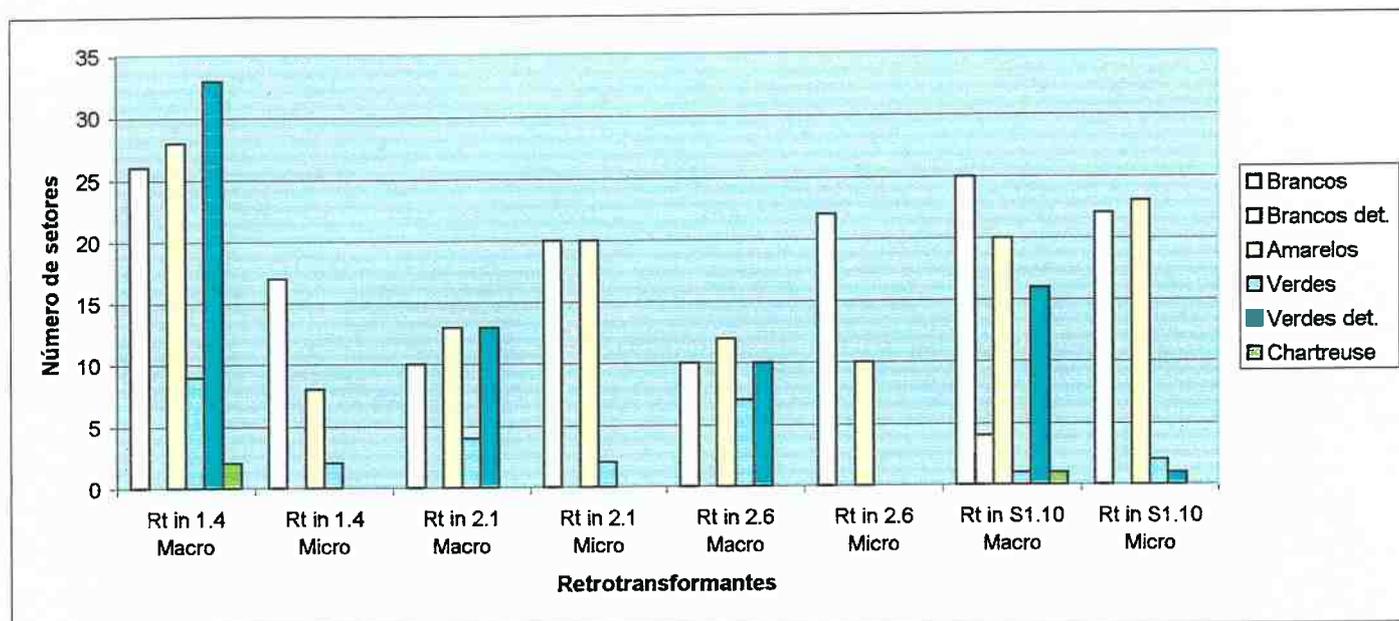


Gráfico 2: Comparação da instabilidade mitótica das linhagens tratadas, com linhagens portadoras de duplicações gênicas: (I-II)\* linhagem A - Dados de Azevedo (1971), e (III-VIII)\*\* linhagens C e D - Dados de Zucchi (1975)

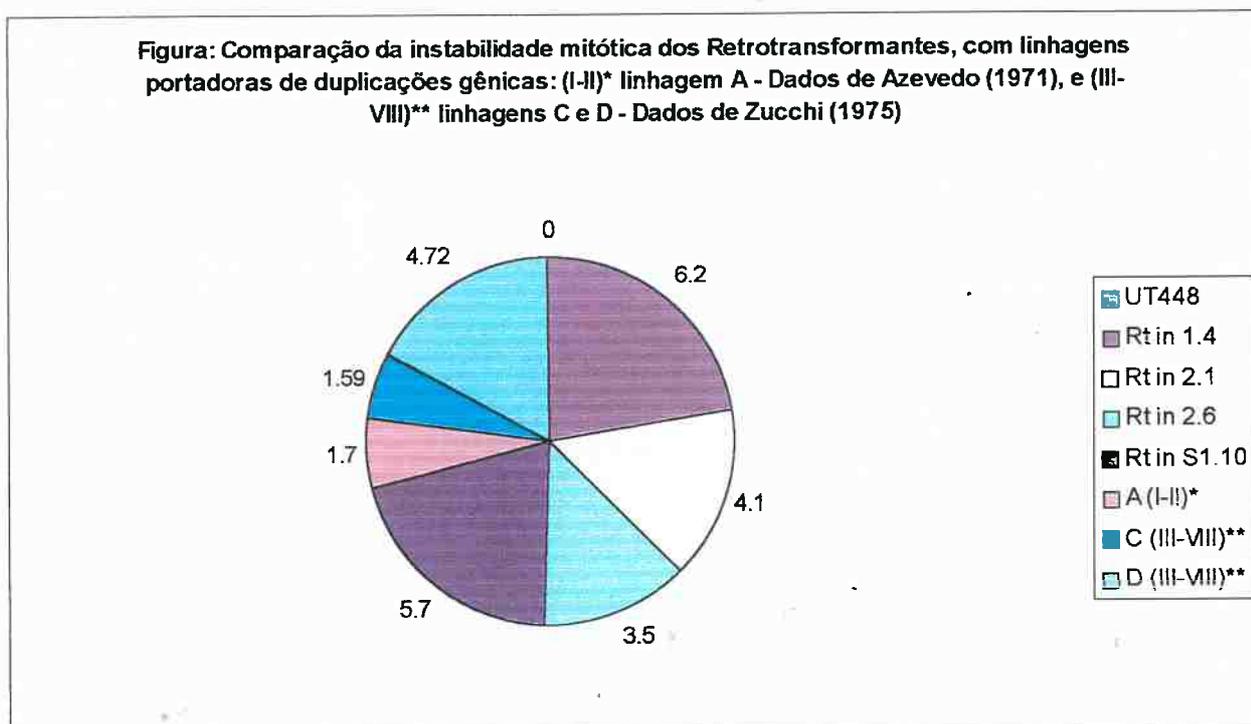


Gráfico 3: Consumo de glicose em meio completo líquido a 37°C

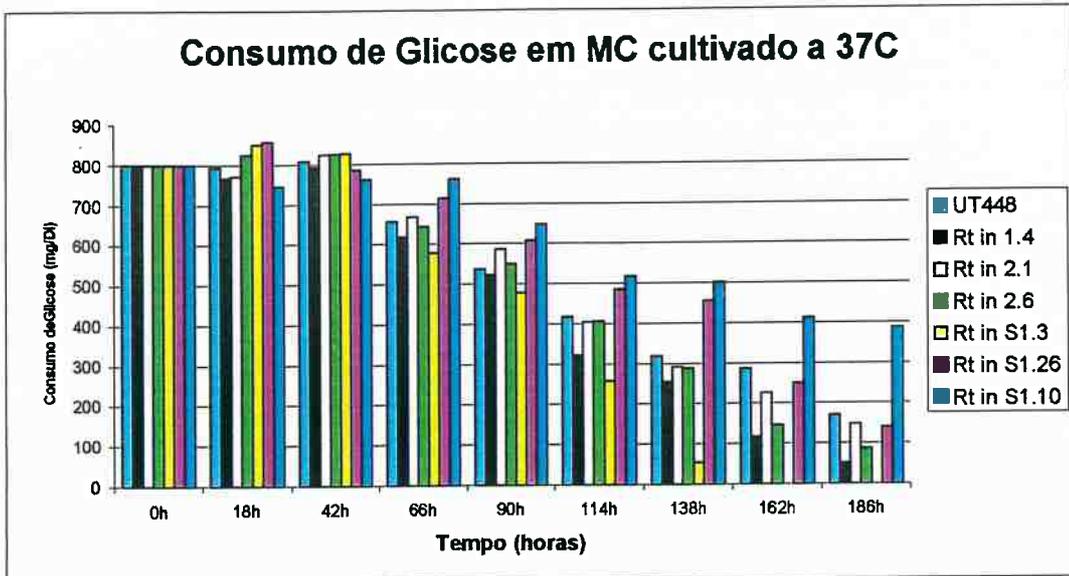


Gráfico 4: Consumo de glicose em meio completo líquido a 28°C

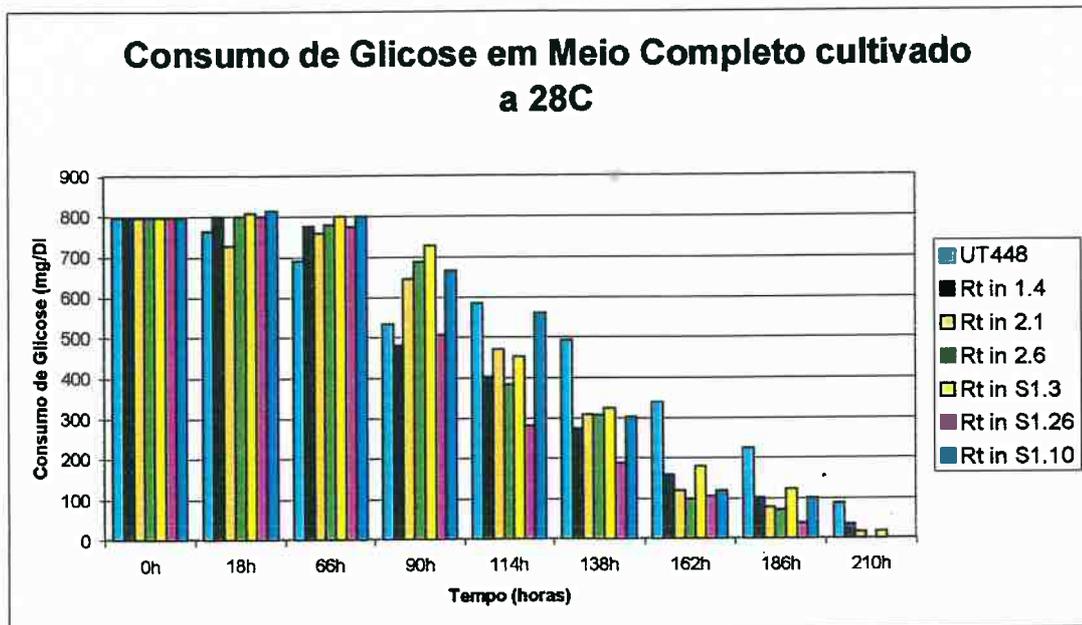


Gráfico 5: Consumo de glicose em meio completo líquido a 37°C com sobrenadante filtrado (sem células)

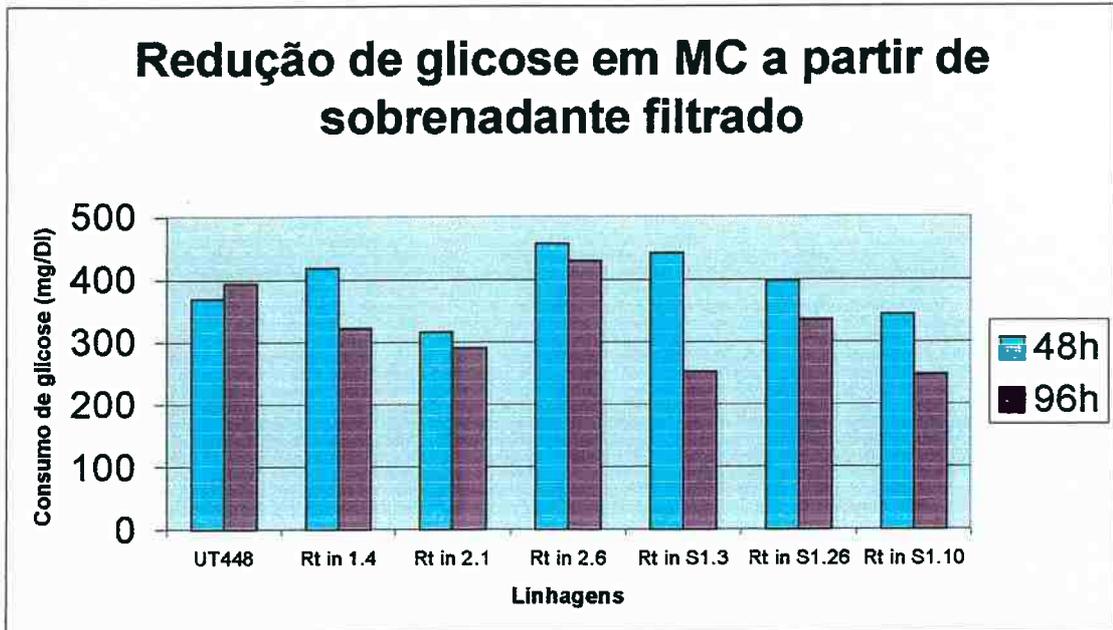
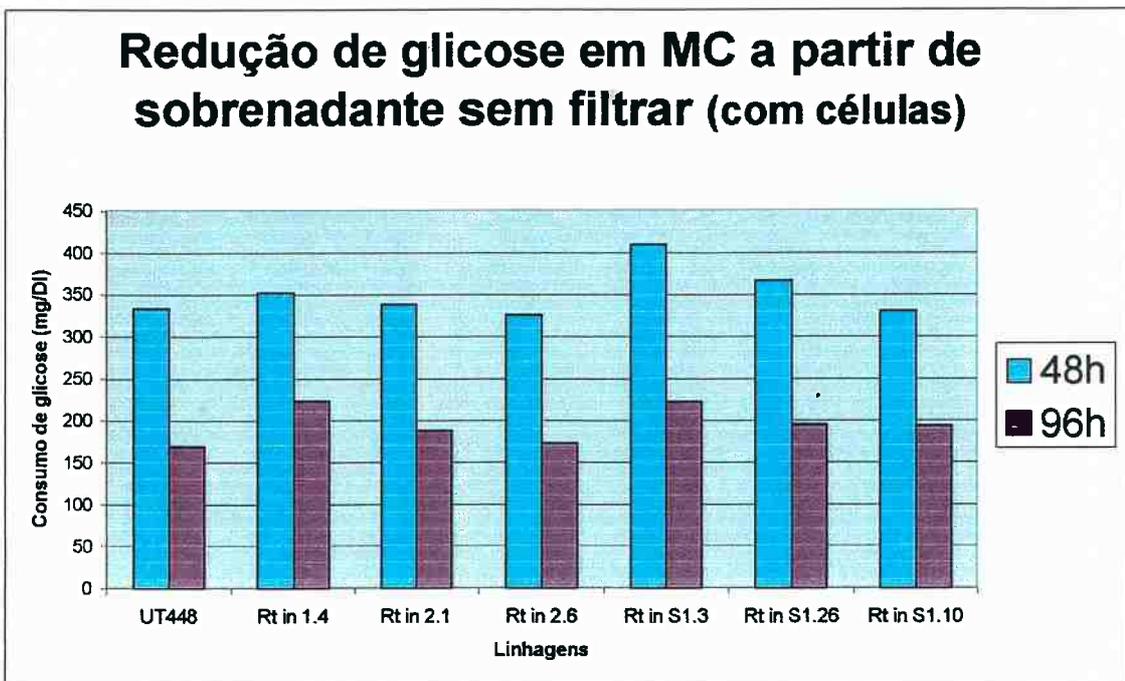
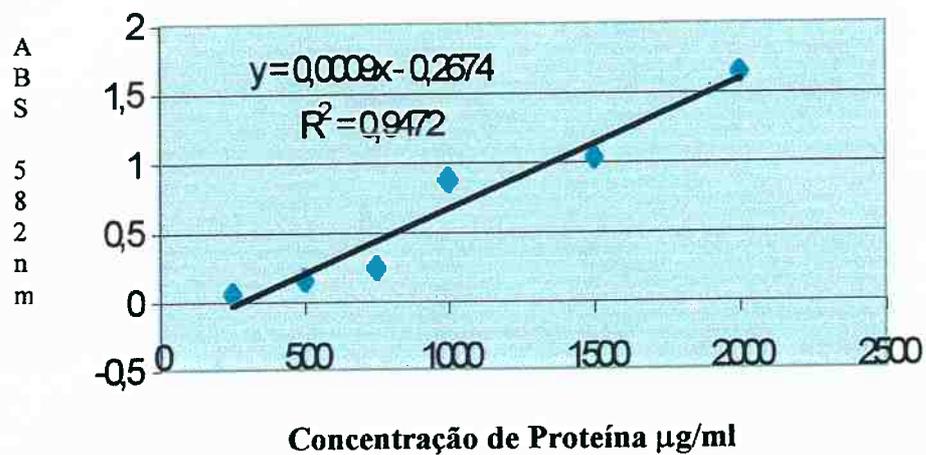


Gráfico 6: Consumo de glicose em meio completo líquido a 37°C com sobrenadante puro sem filtrar (com células)



**Gráfico 7: Curva padrão de “Bovine Serum Albumin”**



**Gráfico 8: Dosagem de proteínas totais (BSA) em linhagens tratadas com RNA**

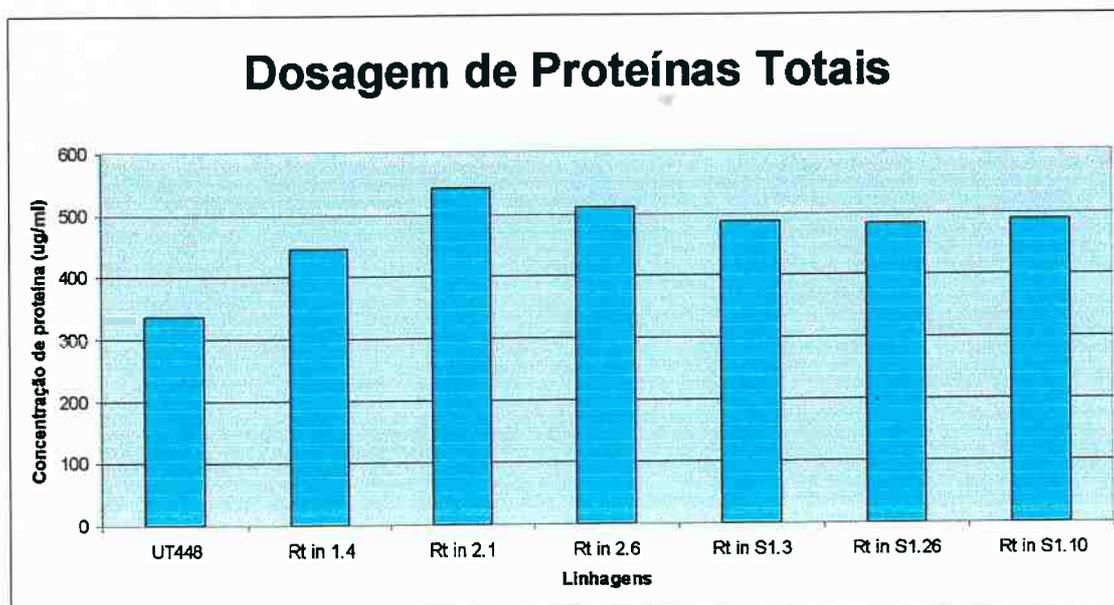


Gráfico 9: Atividade da glicose oxidase no tempo

