

YOKO BOMURA ROSATO

ANÁLISE GENÉTICA E RESPIROMETRIA EM MUTANTES  
COMPACTOS DE *Aspergillus nidulans*

Orientador : PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura  
"Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do título de Doutor em Genética e  
Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A  
Estado de São Paulo - Brasil  
Novembro, 1977

Às minhas filhas,

*Andréa*

*Patrícia*

*Mayume*

*Cassinha*

## AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação, confiança e estímulo demonstrados no decorrer deste trabalho;
- Ao Dr. Ernesto Paterniani, pelas facilidades e recursos concedidos como Diretor do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz";
- Ao Prof. Cláudio Luiz Messias e Dr. Jorge Horii pelo incentivo e sugestões apresentadas para o uso do respirômetro;
- Ao Dr. Flávio Cesar Almeida Tavares pela revisão cuidadosa do manuscrito;
- Aos funcionários do Setor de Genética de Microrganismos, Sr. Antônio José Rocha Campos, Luiz Próspero, Rodolpho Furini e Salvador Pexe pelos serviços técnicos prestados;
- À Sra. Nilza Maria Nalle Bértoli e Sr. Luiz Carlos Veríssimo pela colaboração na aquisição da bibliografia;
- Aos amigos, pela convivência sadia e frutífera durante o desenvolver deste trabalho no Setor de Genética de Microrganismos.
  
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida no Curso de Pós-Graduação da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

## I N D I C E

|   | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| 1. INTRODUÇÃO . . . . .   | 01            |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA. . . . .   | 03            |
| 2.1. Fatores de origem cromossômica determinando alterações morfológicas. . . . .       | 03            |
| 2.2. Fatores de origem extracromossômica determinando alterações morfológicas . . . . . | 07            |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .   | 11            |
| 3.1. Símbolo, fenótipo e localização dos mutantes. . . . .                              | 11            |
| 3.2. Linhagens utilizadas. . . . .  | 12            |
| 3.3. Meios de cultura. . . . .  | 14            |
| 3.3.1. Meio mínimo. . . . .   | 14            |
| 3.3.2. Meio completo. . . . .   | 14            |
| 3.3.3. Meio de galactose. . . . .   | 15            |
| 3.3.4. Meio de acetato de amônia. . . . .   | 15            |
| 3.3.5. Meio mínimo líquido + 2% de meio completo. . . . .                               | 15            |
| 3.4. Soluções e reagentes. . . . .  | 16            |
| 3.4.1. Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras. . . . .                              | 16            |
| 3.4.2. Solução de cloroneb. . . . .   | 16            |
| 3.4.3. Solução salina. . . . .  | 16            |
| 3.4.4. Solução de tween . . . . .   | 17            |
| 3.4.5. Solução de vitaminas . . . . .   | 17            |
| 3.4.6. Suplementos adicionados ao meio mínimo . . . . .                                 | 17            |
| 3.4.7. Solução ácida de antrona . . . . .   | 18            |
| 3.4.8. Solução de cloreto de potássio (KCl 0,154 M) . . . . .                           | 18            |
| 3.4.9. Solução de glicose . . . . .   | 18            |
| 3.4.10. Solução de hidróxido de potássio (KOH + 18%) . . . . .                          | 18            |
| 3.4.11. Solução de tampão fosfato (pH = 6,8) . . . . .                                  | 19            |
| 3.4.12. Solução de tris-ácido maleico . . . . .   | 19            |
| 3.5. Semeadura e incubação . . . . .  | 19            |
| 3.6. Tratamento com mutagênicos. . . . .  | 20            |

|   |    |
|---|----|
| 3.6.1. Tratamento com luz ultra-violeta. . . . .                  | 20 |
| 3.6.2. Tratamento com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina..       | 21 |
| 3.7. Identificação e isolamento dos derivados compactos . . . . . | 21 |
| 3.8. Crescimento dos derivados compactos . . . . .                | 22 |
| 3.9. Produção de setores . . . . .                                | 22 |
| 3.10. Análise genética . . . . .                                  | 22 |
| 3.10.1. Heterocários . . . . .                                    | 22 |
| 3.10.2. Isolamento de diplóides . . . . .                         | 23 |
| 3.10.3. Análise mitótica via ciclo parasexual . . . . .           | 23 |
| 3.10.4. Análise meiótica . . . . .                                | 24 |
| 3.10.5. Teste do heterocário . . . . .                            | 25 |
| 3.11. Respirimetria . . . . .                                     | 26 |
| 3.11.1. Preparação da suspensão micelial . . . . .                | 26 |
| 3.11.2. Determinações manométricas. . . . .                       | 27 |
| 3.11.3. Preparação do aparelho de Warburg . . . . .               | 27 |
| 3.11.4. Consumo de glicose . . . . .                              | 29 |
| 3.11.4.1. Reta padrão de glicose. . . . .                         | 29 |
| 3.11.4.2. Dosagem da glicose residual . . . . .                   | 29 |
| 3.11.5. Assimilação oxidativa . . . . .                           | 30 |
| 4. RESULTADOS . . . . .   | 31 |
| 4.1. Tratamento com mutagênicos. . . . .                          | 31 |
| 4.1.1. Tratamento com luz ultra-violeta . . . . .                 | 31 |
| 4.1.2. Tratamento com nitrosoguanidina. . . . .                   | 32 |
| 4.2. Identificação e isolamento dos derivados compactos. . . . .  | 33 |
| 4.3. Crescimento dos derivados compactos. . . . .                 | 36 |
| 4.4. Classificação dos derivados compactos . . . . .              | 36 |
| 4.5. Produção de setores . . . . .                                | 37 |
| 4.6. Análise genética dos derivados compactos. . . . .            | 41 |
| 4.6.1. Análise mitótica . . . . .                                 | 41 |
| 4.6.2. Análise meiótica . . . . .                                 | 63 |
| 4.6.2.1. Segregação meiótica . . . . .                            | 63 |
| 4.6.2.2. Ligação meiótica. . . . .                                | 66 |

|   | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| 4.7. Análise genética dos setores de derivados instáveis. . . . .         | 69            |
| 4.7.1. Análise mitótica . . . . .   | 70            |
| 4.7.2. Análise meiótica . . . . .   | 75            |
| 4.7.2.1. Segregação meiótica . . . . .                                    | 75            |
| 4.7.2.2. Ligação meiótica. . . . .  | 76            |
| 4.8. Respirometria . . . . .  | 80            |
| 4.8.1. Calibração. . . . .  | 80            |
| 4.8.2. Constantes de O <sub>2</sub> . . . . .                             | 81            |
| 4.8.3. Cálculo do consumo de O <sub>2</sub> . . . . .                     | 81            |
| 4.8.4. Valores de QO <sub>2</sub> . . . . .                               | 84            |
| 4.8.5. Correlação entre crescimento e consumo de O <sub>2</sub> . . . . . | 86            |
| 4.8.6. Glicose residual . . . . .   | 87            |
| 4.8.6.1. Construção da reta padrão de glicose. . . . .                    | 87            |
| 4.8.6.2. Consumo de glicose. . . . .                                      | 95            |
| 4.8.7. Assimilação oxidativa . . . . .                                    | 95            |
| 5. DISCUSSÃO . . . . .  | 97            |
| 5.1. Isolamento e caracterização dos mutantes compactos. . . . .          | 97            |
| 5.2. Análise genética dos mutantes compactos . . . . .                    | 98            |
| 5.2.1. Mutantes que apresentaram modelo de segregação 1:1..               | 98            |
| 5.2.2. Mutantes que apresentaram modelo de segregação 2:1..               | 100           |
| 5.2.3. Mutante citoplasmático . . . . .                                   | 102           |
| 5.3. Instabilidade mitótica . . . . .                                     | 103           |
| 5.3.1. Instabilidade do mutante 7. . . . .                                | 104           |
| 5.3.2. Instabilidade do mutante 13. . . . .                               | 107           |
| 5.3.3. Considerações gerais sobre a instabilidade mitótica.               | 109           |
| 5.4. Considerações gerais sobre o consumo de O <sub>2</sub> . . . . .     | 110           |
| 5.5. Respiração endôgena . . . . .  | 112           |
| 5.6. Consumo de glicose. . . . .  | 114           |
| 6. RESUMO E CONCLUSÕES. . . . .   | 116           |
| 7. SUMMARY AND CONCLUSIONS . . . . .                                      | 118           |
| 8. BIBLIOGRAFIA CITADA . . . . .  | 120           |
| 9. APÊNDICE . . . . .   | 129           |

## LISTA DE TABELAS

| <u>Tabela</u>   | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| 01 - Tratamento com luz UV: porcentagem de sobreviventes e de derivados compactos da linhagem <i>bi A<sub>1</sub></i> ; <i>meth G<sub>1</sub></i> . . . . .                           | 32            |
| 02 - Tratamento com luz UV: porcentagem de sobreviventes e de derivados compactos da linhagem <i>pro A<sub>1</sub></i> ; <i>paba A<sub>6</sub></i> ; <i>y A<sub>1</sub></i> . . . . . | 32            |
| 03 - Tratamento com NTG: porcentagem de sobreviventes e de derivados compactos da linhagem <i>bi A<sub>1</sub></i> ; <i>methG<sub>1</sub></i> . . . . .                               | 33            |
| 04 - Tratamento com NTG: porcentagem de sobreviventes e de derivados compactos da linhagem <i>pro A<sub>1</sub></i> ; <i>paba A<sub>6</sub></i> ; <i>y A<sub>1</sub></i> . . . . .    | 33            |
| 05 - Análise estatística do diâmetro da colônia da linhagem <i>bi A<sub>1</sub></i> ; <i>meth G<sub>1</sub></i> e dos derivados compactos . . . . .                                   | 36            |
| 06 - Características morfológicas e de crescimento dos derivados compactos . . . . .  | 38            |
| 07 - Produção de setores em isolados instáveis. . . . .   | 40            |
| 08 - Análise mitótica do diplóide 1// MSE . . . . .   | 42            |
| 09 - Análise mitótica do diplóide 2// MSE. . . . .  | 43            |
| 10 - Análise mitótica do diplóide 3// MSE. . . . .  | 44            |
| 11 - Análise mitótica do diplóide 4// MSE. . . . .  | 45            |
| 12 - Análise mitótica do diplóide 5// MSE. . . . .  | 46            |
| 13 - Análise mitótica do diplóide 6// MSE. . . . .  | 47            |
| 14 - Análise mitótica do diplóide 7// MSE. . . . .  | 48            |
| 15 - Análise mitótica do diplóide 8// MSE. . . . .  | 49            |
| 16 - Análise mitótica do diplóide 9// MSE. . . . .  | 50            |
| 17 - Análise mitótica do diplóide 10// MSE . . . . .  | 51            |

| <u>Tabela</u>  | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| 18 - Análise mitótica do diplóide 11// MSE . . . . .   | 52            |
| 19 - Análise mitótica do diplóide 12// MSE . . . . .   | 53            |
| 20 - Análise mitótica do diplóide 13// MSE . . . . .   | 54            |
| 21 - Análise mitótica do diplóide 14// MSE . . . . .   | 55            |
| 22 - Análise mitótica do diplóide 15// MSE . . . . .   | 56            |
| 23 - Análise mitótica do diplóide 16// MSE . . . . .   | 57            |
| 24 - Análise mitótica do diplóide 17// MSE . . . . .   | 58            |
| 25 - Análise mitótica do diplóide 18// MSE . . . . .   | 59            |
| 26 - Análise mitótica do diplóide 19// MSE . . . . .   | 60            |
| 27 - Análise mitótica do diplóide 20// MSE . . . . .   | 61            |
| 28 - Localização do determinante compacto de cada isolado, obtida<br>através da análise mitótica . . . . .   | 62            |
| 29 - Segregação meiótica dos cruzamentos de derivados compactos<br>com a linhagem MSE . . . . .              | 64            |
| 30 - Segregação meiótica de derivados compactos com a linhagem<br>MSE. Casos anômalos. . . . .               | 65            |
| 31 - Resultados de ligação genética dos cruzamentos dos derivados<br>compactos com a linhagem MSE . . . . .  | 68            |
| 32 - Análise mitótica do diplóide 5a// MSE . . . . .   | 70            |
| 33 - Análise mitótica do diplóide 5b// MSE . . . . .   | 71            |
| 34 - Análise mitótica do diplóide 7a// MSE . . . . .   | 72            |
| 35 - Análise mitótica do diplóide 7b// MSE . . . . .   | 73            |
| 36 - Análise mitótica do diplóide 7c// MSE . . . . .   | 74            |
| 37 - Segregação meiótica dos setores de derivados instáveis em cru-<br>zamentos com a linhagem MSE . . . . . | 75            |



TabelaPágina

|   |    |
|---|----|
| 38 - Resultados de ligação genética dos cruzamentos dos setores<br>7a e 7c com a linhagem MSE . . . . .   | 77 |
| 39 - Ligação meiótica do cruzamento 13a X MSE . . . . .   | 77 |
| 40 - Ligação meiótica do cruzamento 13b X MSE . . . . .   | 78 |
| 41 - Volume do conjunto manômetro + frasco . . . . .  | 80 |
| 42 - Constantes de $O_2$ ( $kO_2$ ) . . . . .   | 81 |
| 43 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de<br>$O_2$ . . . . .  | 82 |
| 44 - Consumo de $O_2$ total dos derivados compactos e da linhagem<br><i>bi A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub></i> . . . . .  | 83 |
| 45 - Análise estatística do consumo de $O_2$ de derivados compactos<br>e da linhagem <i>bi A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub></i> após 420 minutos no respirôme-<br>tro de Warburg . . . . . | 84 |
| 46 - Valores de $QO_2$ dos isolados compactos e da linhagem <i>bi A<sub>1</sub>;</i><br><i>meth G<sub>1</sub></i> . . . . .   | 85 |
| 47 - Densidade óptica de diferentes concentrações de glicose. . .   | 93 |
| 48 - Assimilação oxidativa dos derivados compactos e da linhagem<br><i>bi A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub></i> , após 420 minutos no respirômetro de Warburg.                              | 96 |

## LISTA DE FIGURAS

| <u>Figura</u>   | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| 01 - Mapa genético de <i>Aspergillus nidulans</i> . . . . .   | 13            |
| 02 - Porcentagem de sobreviventes das linhagens <i>bi A<sub>1</sub></i> ; <i>meth G<sub>1</sub></i> e <i>pro A<sub>1</sub></i> ; <i>paba A<sub>6</sub></i> ; <i>y A<sub>1</sub></i> após tratamento com luz ultra-violeta | 34            |
| 03 - Porcentagem de sobreviventes das linhagens <i>bi A<sub>1</sub></i> ; <i>meth G<sub>1</sub></i> e <i>pro A<sub>1</sub></i> ; <i>paba A<sub>6</sub></i> ; <i>y A<sub>1</sub></i> após tratamento com nitrosoguanidina  | 35            |
| 04 - Morfologia de três isolados compactos e da linhagem normal..   | 39            |
| 05 - Segregação meiótica de compacto X normal . . . . .   | 39            |
| 06 - Produção de setores apresentada pelo isolado 5. . . . .  | 40a.          |
| 07 - Produção de setores apresentada pelo isolado 7 . . . . .   | 40a.          |
| 08 - Consumo de O <sub>2</sub> da linhagem <i>bi A<sub>1</sub></i> ; <i>meth G<sub>1</sub></i> e dos derivados compactos 1 e 2 . . . . .  | 88            |
| 09 - Consumo de O <sub>2</sub> da linhagem <i>bi A<sub>1</sub></i> ; <i>meth G<sub>1</sub></i> e dos derivados compactos 3 e 4 . . . . .  | 88            |
| 10 - Consumo de O <sub>2</sub> da linhagem <i>bi A<sub>1</sub></i> ; <i>meth G<sub>1</sub></i> e dos derivados compactos 5 e 6 . . . . .  | 89            |
| 11 - Consumo de O <sub>2</sub> da linhagem <i>bi A<sub>1</sub></i> ; <i>meth G<sub>1</sub></i> e dos derivados compactos 7 e 8 . . . . .  | 89            |
| 12 - Consumo de O <sub>2</sub> da linhagem <i>bi A<sub>1</sub></i> ; <i>meth G<sub>1</sub></i> e dos derivados compactos 9 e 10 . . . . .   | 90            |
| 13 - Consumo de O <sub>2</sub> da linhagem <i>bi A<sub>1</sub></i> ; <i>meth G<sub>1</sub></i> e dos derivados compactos 11 e 12 . . . . .  | 90            |
| 14 - Consumo de O <sub>2</sub> da linhagem <i>bi A<sub>1</sub></i> ; <i>meth G<sub>1</sub></i> e dos isolados 13 e 14 . . . . .   | 91            |
| 15 - Consumo de O <sub>2</sub> da linhagem <i>bi A<sub>1</sub></i> ; <i>meth G<sub>1</sub></i> e dos isolados 15 e 16 . . . . .   | 91            |

| <u>Figura</u>   | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| 16 - Consumo de O <sub>2</sub> da linhagem <i>bí A<sub>1</sub></i> ; <i>meth G<sub>1</sub></i> e dos isolados 17 e 18 . . . . . | 92            |
| 17 - Consumo de O <sub>2</sub> da linhagem <i>bí A<sub>1</sub></i> ; <i>meth G<sub>1</sub></i> e dos isolados 19 e 20 . . . . . | 92            |
| 18 - Reta padrão de glicose . . . . .   | 94            |
| 19 - Modelo apresentado para explicar a segregação 2:1 através de uma translocação não recíproca no mutante compacto . . . . .  | 101           |
| 20 - Modelo apresentado para explicar a instabilidade do mutante 7  | 105           |
| 21 - Modelo apresentado para explicar a instabilidade do mutante 13 . . . . .   | 108           |

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de todo ser vivo ocorre através de uma série de reações bioquímicas geneticamente controladas. O esclarecimento dessas reações tem se constituído num campo de pesquisa amplo, tanto do ponto de vista genético como bioquímico. O *Aspergillus nidulans*, um fungo filamentoso, tem sido muito utilizado em pesquisas desde o trabalho pioneiro de PONTECORVO e col. (1953). Atualmente os estudos genéticos com este fungo estão bastante facilitados devido às vantagens típicas do sistema, à existência de técnicas padronizadas e o acesso a diversos tipos de marcadores genéticos. Entretanto, os aspectos genéticos da morfogênese em *Aspergillus nidulans* tem sido pouco analisados, apesar da grande variabilidade morfológica apresentada por este microrganismo.

Em vista destes fatos, o presente trabalho se propôs ao estudo básico e inicial de um tipo particular de mutante morfológico, o compacto, que é caracterizado por apresentar crescimento reduzido em relação ao tipo selvagem. Duas linhagens de crescimento normal foram tratadas com mutagênicos e derivados compactos foram obtidos, isolados e analisados geneticamente

procurando se determinar as alterações genéticas e a sua distribuição pelos oito grupos de ligação do *Aspergillus nidulans*.

Por outro lado, alguns mutantes morfológicos apresentam alterações no metabolismo, principalmente quanto a sua capacidade oxidativa (VERBINA, 1960). Alterações dessa natureza foram também detectados em mutantes de crescimento restrito em microrganismos relacionados como a *Neurospora crassa* e *Saccharomyces cerevisiae*. Dessa forma, os mutantes compactos de *Aspergillus nidulans* obtidos no presente trabalho foram também analisados quanto ao consumo de oxigênio procurando-se verificar o comportamento desses mutantes em relação ao tipo normal.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A presente revisão pretende apresentar uma retrospectiva do que se tem registrado na literatura sobre o mutante compacto de *Aspergillus nidulans* e microrganismos relacionados. Como a característica crescimento pode ser alterada por fatores genéticos cromossômicos e extra-cromossômicos, a revisão será sub-dividida abordando esses dois aspectos.

### 2.1. Fatores de origem cromossômica determinando alterações morfológicas

É bem conhecido que fatores genéticos regulam o crescimento normal das colônias e na maioria das vezes esse efeito é associado a outras características morfológicas. Em *Aspergillus nidulans*, o primeiro mutante compacto foi descrito por PONTECORVO (1953); posteriormente, KÄFER(1958) relacionou os mutantes "small" (*sm A*) e compacto (*co A*) aos grupos de ligação III e VIII, respectivamente.

BAINBRIDGE (1963) analisou alguns mutantes morfológicos entre

os quais se encontra o mutante *mo* 96 de característica compacta e enrugada, obtido com o uso de  $\beta$ -propiolactona e mapeado no grupo de ligação IV, a 4,6 unidades marcador  $\delta$  12. Foram também analisados outros mutantes com taxa de crescimento reduzida e o autor verificou que possivelmente a alteração morfológica devia ser causada por uma translocação não recíproca.

BALL e ROPER (1966) trataram conídios de *Aspergillus nidulans* com acridinas e dos variantes morfológicos obtidos destacou-se um compacto "fluffy" resultante de alterações em dois loci no grupo de ligação II.

CUNHA (1970) registrou o isolamento de 15 colônias de crescimento lento após tratamento de conídios com luz ultra-violeta. Destes, 5 foram submetidos à análise meiótica e 4 deles mostraram uma grande variabilidade em cruzamentos, possivelmente devido à ocorrência de translocações. Apenas um mutante "small" mostrou uma herança mendeliana regular e a mutação " $\delta m$ " foi localizada no grupo de ligação VI.

O efeito de alterações cromossômicas na morfologia e no crescimento foi também observado por BAINBRIDGE e ROPER (1966). A análise de colônias "crinckled", que possuíam uma reduzida taxa de crescimento, mostrou que a alteração morfológica era devido à duplicação de um segmento cromossômico. Estas colônias "crinckled" apresentaram instabilidade mitótica produzindo setores, que em vários graus se aproximavam ao do tipo normal.

HOUGHTON (1970) analisou 24 mutantes de crescimento lento (*sgp*) que apresentaram incapacidade de utilizar os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. Através de testes complementação eles foram divididos em cinco grupos, cada grupo representando um diferente cistron. Cada cistron foi relacionado com o seu grupo de ligação por análise mitótica e três mutantes foram mapeados. O sistema de citocromos, estrutura mitocondrial e resistência a inibidores respiratórios dos mutantes se mostrou aparentemente normal embora apresentassem características interessantes tais como pro-

dução de pigmento reduzida e aumento da sensibilidade aos efeitos da irradiação com luz ultra-violeta.

LACAVAL (1973) analisou quinze mutantes morfológicos de *Aspergillus nidulans*, resultantes da irradiação de conídios de linhagem normal com raios gama. Todos apresentavam crescimento lento e baixa conidiação. A análise genética desses mutantes revelou que o comportamento era de um gene simples na maioria dos casos; sugeriu também a ocorrência de translocações em dois desses mutantes.

Apesar dos poucos casos descritos sobre os mutantes de crescimento lento ou compactos em *Aspergillus nidulans*, os estudos feitos em um microrganismo relacionado, a *Neurospora crassa*, tanto ao nível bioquímico como genético foram de grande valor para melhor compreensão do fenômeno.

Em *Neurospora* o primeiro mutante morfológico, chamado "button" foi descrito por LINDEGREN e LINDEGREN (1941) sendo caracterizado pelo seu crescimento restrito. Desde então um grande número de mutantes foram descritos e mais de uma centena de loci foram mapeados. GARNJOBST e TATUM (1967) classificaram os diferentes mutantes morfológicos em seis grupos de acordo com o tipo de crescimento apresentado.

O estudo dos mutantes morfológicos em *Neurospora* levaram à conclusão de que a morfologia neste organismo era influenciada principalmente pela composição química da parede celular. Os estudos iniciais, sob este aspecto, foram efetuados por TERRA e TATUM (1961; 1963). Os autores verificaram que a proporção glucosamina/glicose era alterada nos mutantes coloniais, sendo que estes apresentavam uma maior quantidade de glucosamina. A quantidade total era a mesma e, portanto, deveria ocorrer alterações ao nível de estrutura e função da parede celular. Posteriormente, MAHADEVAN e TATUM (1965) definiram os componentes da parede celular e comprovaram os níveis das diferentes frações do tipo selvagem com aquela dos mutantes. Foi



observado que a alteração morfológica estava associada à variação no nível das diferentes frações. Entretanto, o nível de quitina, que constitui o maior componente da parede celular, não sofreu alteração indicando a sua não participação na determinação da morfologia em *Neurospora*. A importância do papel da quitina, todavia, não pode ser completamente nula desde que RUSSEL e SRB (1974) encontraram altos níveis de uma enzima relacionada com a biossíntese da quitina em alguns mutantes morfológicos.

Os estudos da morfogênese em *Neurospora* foram também efetuados em fenocópias, obtidas por adição de sorbose ao meio de cultura (TATUM e col., 1949). Foi verificado por CROCKEN e TATUM (1968) que na presença de sorbose o fungo utilizava glicose com menor eficiência; uma pequena porcentagem era incorporada como material celular e uma maior porcentagem era perdida como CO<sub>2</sub>. Conseqüentemente, havia uma redução no peso seco em cerca de 60%. Constataram também que havia variação na composição da parede e atribuíram a alteração morfológica a um enfraquecimento da parede celular e principalmente à taxa de reações envolvidas na síntese dos seus compostos.

O mecanismo de indução de crescimento colonial em *Neurospora*, com o uso de sorbose, foi posteriormente esclarecido por MISHRA e TATUM (1972). Foi verificado "in vivo" e "in vitro" que sintetases de polissacarídeos eram inibidas por sorbose enquanto que a atividade destas enzimas não eram afetadas em mutantes resistentes a sorbose.

Além dos estudos relacionando alterações morfológicas com parede celular foram realizadas análises mais detalhadas caracterizando mutantes defectivos para certas enzimas da biossíntese da parede e membrana celular. Assim, BRODY e TATUM (1966) analisaram um mutante colonial (*col-2*) e verificaram que a mutação causava um decréscimo na afinidade da desidrogenase glucose-6-fosfato para glucose-6-fosfato (G6P). Este decréscimo de afinidade foi fortemente correlacionado com um aumento do nível de G6P na linha-

gem colonial. A enzima alterada e o alto nível de G6P segregaram com o marcador *col-2* e ambos retornavam ao normal com a reversão de *col-2*. As evidências indicaram que o locus *col-2* correspondia ao gene estrutural para desidrogenase glucose-6-fosfato e que o efeito primário da mutação foi mudar a estrutura desta enzima, produzindo efeitos pleiotrópicos que conduziram a uma alteração na morfologia. Posteriormente, SCOTT e TATUM (1970) analisaram os mutantes "balloon" e "frost" e chegaram a resultados semelhantes, detectando mais dois genes estruturais para a desidrogenase glucose-6-fosfato.

Na investigação de outros mutantes para o metabolismo de carboidratos, BRODY e TATUM (1967) analisaram os mutantes "ragged" (*rg*) de *Neurospora crassa* e verificaram uma severa diminuição na atividade da enzima fosfoglucomutase. Em *Neurospora sitophila*, dois loci não alélicos, *rg-1* e *rg-2*, afetam a atividade de PGM-I e PGM-II, respectivamente, as duas isozimas da fosfoglucomutase (MISHRA e TATUM, 1970).

Durante o estudo de dois outros mutantes, *col-10* e *col-3*, SCOTT e ABRAMSKY (1973) verificaram a presença de desidrogenase-6-fosfogluconato - com parâmetros de cinética e termoestabilidade diferentes em relação ao tipo normal.

Além dos mutantes já citados, foram analisados outros mutantes morfológicos em *Neurospora*, procurando-se estabelecer a relação gene-enzima (SCOTT, 1976; MISHRA, 1977).

## 2.2. Fatores de origem extra-cromossômica determinando alterações morfológicas

Além de fatores genéticos nucleares afetando a morfologia e taxa de crescimento, alguns autores observaram que fatores citoplasmáticos

também podiam produzir o mesmo efeito. Assim, ARLETT e col. (1962) analisaram o resultante "red" de *Aspergillus nidulans*, caracterizado por apresentar crescimento lento e excreção de um pigmento vermelho no meio de cultura. Os esporos haplóides produziam colônias em mosaico com setores normais e "red". Os autores sugeriram que o caráter era resultante de uma interação entre componentes citoplasmáticos normal e mutante ou seja, que a variante "red" era um "heteroplasmon". O teste do heterocário também evidenciou uma herança citoplasmática, mas alguns resultados deram indícios de uma interação com fatores nucleares. Esta interação pois posteriormente verificada por GRINDLE (1964), que introduziu o determinante "red" em diferentes linhagens através da heterocariose. Foi observado que os diferentes marcadores genéticos favoreciam o aparecimento do caráter "red" ou do tipo normal.

Um estudo semelhante foi conduzido por FAULKNER e ARLETT (1964) com a variante "minute" de *Aspergillus nidulans*, obtida por ARLETT (1957). As colônias "minute" apresentavam setores com características do tipo normal, diferindo portanto, da segregação observada para a variante "red". Apesar disso, a similaridade de comportamento apresentada sob diversos aspectos, sugere que o modo de herança deve ser o mesmo.

A análise das variantes "red" e "minute" levaram os autores a conclusão de que o citoplasma deve possuir um componente hereditário desempenhando um papel crítico na diferenciação e desenvolvimento de *Aspergillus nidulans*.

Em *Neurospora crassa* e *Saccharomyces cerevisiae*, alguns mutantes citoplasmáticos foram analisados em maiores detalhes. Em *Neurospora crassa* os estudos sobre herança citoplasmática iniciaram com a descoberta do "poky", um mutante de crescimento lento (MITCHELL e MITCHELL, 1952). O fenótipo "poky" apresentava herança do tipo maternal e a propriedade de crescimento lento foi associada à ausência de citocromos a e b. Mais tarde, foram

analisadas outras três linhagens de crescimento lento e uma delas, *mi-3*, mostrou um comportamento semelhante ao "poky", e foi caracterizado como mutante citoplasmático (MITCHELL e col., 1953). O mutante *mi-3* apresentou um excesso de citocromo c e ausência de citocromos a. Em estudos de ribossomos mitocondriais, RIFKIN e LUCK (1971) encontraram uma deficiência na síntese (ou agregação) das pequenas unidades ribossômicas da mitocôndria. A falta destas pequenas sub-unidades era mais relativa do que absoluta, pois durante a fase estacionária de crescimento esta quantidade aumentava. Os autores sugeriram que a anormalidade no padrão de citocromos era uma consequência direta da deficiência de ribossomos.

Em *Saccharomyces cerevisiae* a primeira demonstração de herança citoplasmática foi proveniente do trabalho de EPHRUSSI e col. (1949). Descreveram os mutantes "petite", que são deficientes respiratórios e portanto, de metabolismo anaeróbico. Os mutantes "petite" compreendem uma série de linhagens nas quais foram detectadas alterações em diferentes graus no DNA mitocondrial. Entretanto, ao nível de atividade respiratória não foram observadas diferenças. A ausência de atividade respiratória foi mostrado ser resultante da falta de citocromos a e b; o c aparece em maior quantidade (MITCHELL e col., 1953). YOTSUNAYAGI (1962) observou mudanças no tamanho e distribuição de mitocôndrias em diferentes estágios de cultura. Durante a fase de crescimento exponencial as diferenças são pequenas, mas quando o crescimento cessa as diferenças aumentam. As células normais apresentam mitocôndrias com cristas regularmente dispostas, de tamanho e forma semelhantes, enquanto que os "petite" desenvolvem uma série altamente polimórfica de mitocôndrias.

Além desses "petite" chamados de neutrais EPHRUSSI e col. (1955) registraram um segundo grupo de "petites" chamado supressivo. No cruzamento neutral X selvagem o diplóide e os segregantes  $F_1$  apresentam respiração normal. No cruzamento supressivo X selvagem os resultados dependem do

tempo de esporulação. Se os diplóides esporulam logo após o cruzamento todos os segregantes são "petite"; se a esporulação for retardada todos os  $F_1$  serão selvagens. Neste caso, as células normais multiplicam-se muito mais rapidamente que os "petite" e estes são gradualmente reduzidos em frequência. A esporulação requer metabolismo respiratório que é ausente em mutantes "petite", seja do tipo neutral ou supressivo. Mas, se o diplóide esporula imediatamente, os petite podem esporular devido às enzimas respiratórias da linhagem normal ainda presentes no citoplasma do zigoto. A supressividade tem sido considerada como a replicação preferencial do DNA mitocondrial mutante. Entretanto, o mecanismo pelo qual isto ocorre não está bem estabelecido; uma série de informações podem ser obtidas em SAGER (1972).

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1. Símbolo, fenótipo e localização dos mutantes

| <u>Símbolo</u>      | <u>F e n ó t i p o</u>               | <u>Localização</u> |
|---------------------|--------------------------------------|--------------------|
| <i>Morfológicos</i> |                                      |                    |
| w A <sub>3</sub>    | conídios brancos                     | II L               |
| y A <sub>1</sub>    | conídios amarelos                    | I R                |
| <i>Nutricionais</i> |                                      |                    |
| ad E <sub>20</sub>  | requisito para adenina               | I R                |
| bi A <sub>1</sub>   | requisito para biotina               | I R                |
| meth G <sub>1</sub> | requisito para metionina             | IV L               |
| nic B <sub>8</sub>  | requisito para ácido nicotínico      | VII                |
| paba A <sub>1</sub> | requisito para ácido p-aminobenzóico | I R                |
| pro A <sub>1</sub>  | requisito para prolina               | I R                |
| pyro A <sub>4</sub> | requisito para piridoxina            | IV R               |
| ribo B <sub>5</sub> | requisito para riboflavina           | VIII R             |
| s B <sub>3</sub>    | requisito para tiosulfato            | VI                 |

| <u>Símbolo</u>                            | <u>F e n ó t i p o</u>                                     | <u>Localização</u> |
|---|--|--------------------|
| <i>Fontes de carbono</i>                  |  |                    |
| <i>fac A<sub>303</sub></i>                | não crescimento com meio de acetato como fonte de carbono  | V                  |
| <i>gal A<sub>1</sub></i>                  | não crescimento em meio de galactose como fonte de carbono | III L              |
| <i>Supressor</i>                          |  |                    |
| <i>su A<sub>1</sub> ad E<sub>20</sub></i> | supressor do mutante <i>ad E<sub>20</sub></i>              | I L                |

A origem e descrição dos mutantes podem ser encontrados em CLUTTERBUCK (1974). A localização dos marcadores genéticos está representada na Figura 1.

### 3.2. Linhagens utilizadas

- a. Linhagem MSE ("Master Strain E"): possui um marcador genético em cada um dos oito grupos de ligação (Mc CULLY e FORBES, 1965).
- b. Linhagem *bi A<sub>1</sub>*; *meth G<sub>1</sub>*: possui o marcador genético *bi A<sub>1</sub>* no grupo de ligação I e *meth G<sub>1</sub>* no grupo de ligação IV.
- c. Linhagem *pro A<sub>1</sub>*; *paba A<sub>6</sub>*; *y A<sub>1</sub>*: possui os marcadores genéticos, *pro A<sub>1</sub>*, *paba A<sub>6</sub>* e *y A<sub>1</sub>* no grupo de ligação I.

As linhagens utilizadas foram obtidas da coleção existente no Setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Foram mantidas em tubos com meio com

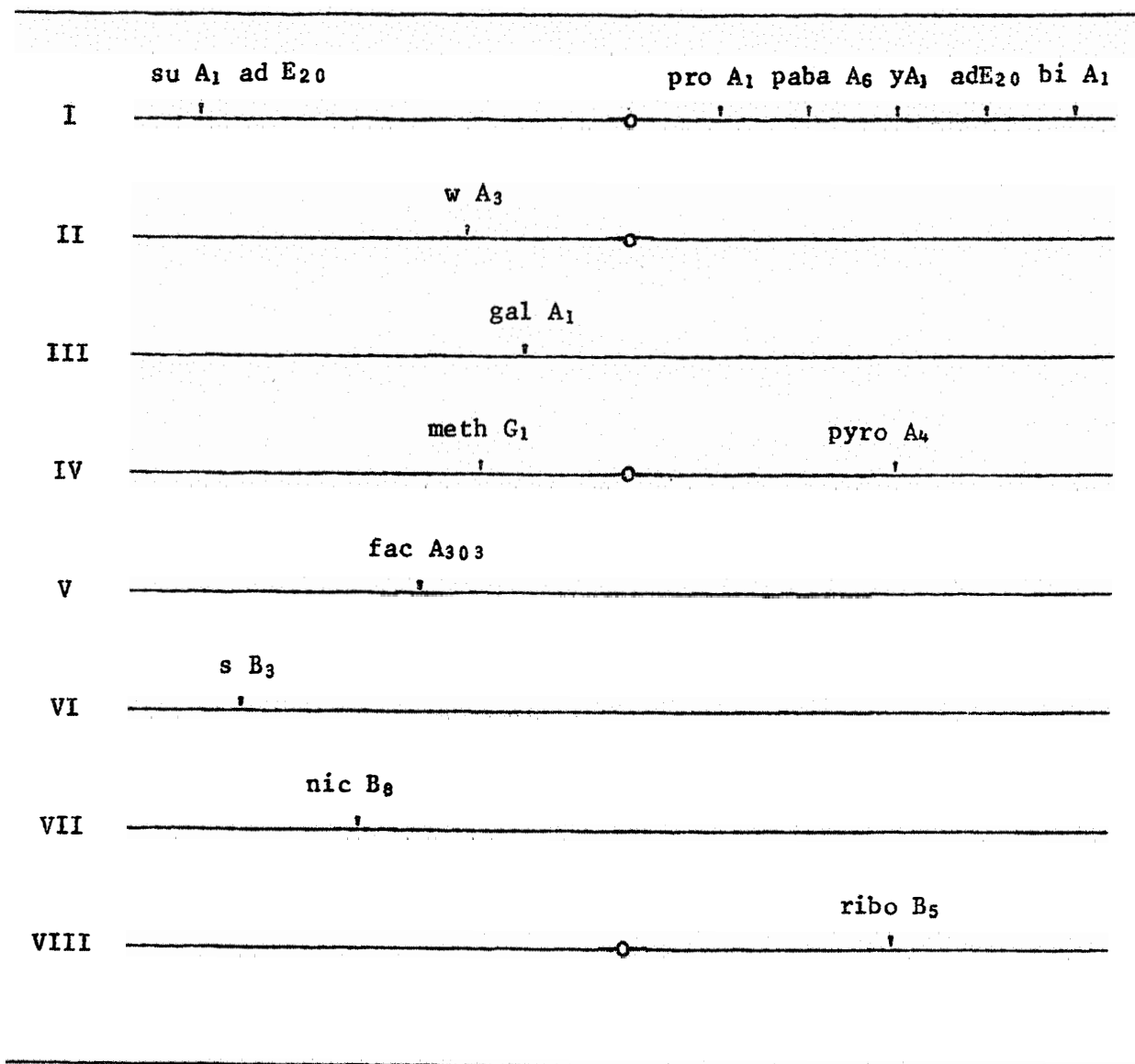


Figura 1 - Mapa genético de *Aspergillus nidulans*. As distâncias dos marcadores genéticos não estão em escala no mapa. o = Centrômero.



pleto inclinado a cerca de 4°C.

### 3.3. Meios de cultura

#### 3.3.1. Meio mínimo (PONTECORVO e col., 1953)

|  |       |        |
|--|-------|--------|
| Nitrato de sódio . . . . .                   | 6,00  | gramas |
| Sulfato de magnésio heptahidratado . . . . . | 0,52  | "      |
| Cloreto de potássio. . . . .                 | 0,52  | "      |
| Fosfato dihidrogenado de potássio. . . . .   | 1,52  | "      |
| Sulfato de ferro . . . . .                   |       | traços |
| Sulfato de zinco . . . . .                   |       | traços |
| Dextrose . . . . .                           | 10,00 | gramas |
| Ágar . . . . .                               | 20,00 | "      |
| Água . . . . .                               | 1.000 | ml     |

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1N.

#### 3.3.2. Meio completo (PONTECORVO e col., 1953)

Foi adicionado ao meio mínimo:

|  |      |        |
|--|------|--------|
| Peptona (Fisher) . . . . .                           | 2,00 | gramas |
| Caseína hidrolizada (Oxoid). . . . .                 | 1,50 | "      |
| Extrato de leveduras (Oxoid) . . . . .               | 0,50 | "      |
| Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras . . . . . | 2,5  | ml     |
| Solução de vitaminas . . . . .                       | 1,0  | ml     |

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1N.

## 3.3.3. Meio de galactose

|   |             |
|---|-------------|
| Galactose . . . . .                       | 10,0 gramas |
| Meio mínimo líquido sem dextrose. . . . . | 1.000 ml    |
| Ágar . . . . .                            | 20,0 gramas |

## 3.3.4. Meio de acetato de amônia (APIRION, 1962)

|  |             |
|--|-------------|
| Acetato de amônia . . . . .                  | 12,0 gramas |
| Cloreto de sódio. . . . .                    | 2,0 gramas  |
| Sulfato de magnésio heptahidratado . . . . . | 0,5 gramas  |
| Fosfato dihidrogenado de potássio . . . . .  | 3,0 gramas  |
| Sulfato de ferro. . . . .                    | traços      |
| Sulfato de zinco. . . . .                    | traços      |
| Ágar . . . . .                               | 15,0 gramas |
| Água . . . . .                               | 1.000 ml    |

O pH foi ajustado para 6,1 com NaOH 4%.

*Esterilização*

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave à pressão de 1 atmosfera durante 15 minutos e mantidos à temperatura ambiente, no escuro.

## 3.3.5. Meio mínimo líquido + 2% de meio completo

Foi adicionado 2% de meio completo líquido ao meio mínimo líquido. A mistura foi distribuída em tubos (2,5 ml em cada tubo) e a seguir

os tubos com a mistura foram autoclavados e mantidos no escuro.

### 3.4. Soluções e reagentes

#### 3.4.1. Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras

Ácido nucleico de leveduras . . . . . 2 gramas em 15 ml de solução normal de HCl.

Ácido nucleico de leveduras . . . . . 2 gramas em 15 ml de solução normal de NaOH.

As duas soluções foram aquecidas por 20 minutos em banho maria, misturadas e o pH foi ajustado para 6,0. A solução foi filtrada, o volume completado para 40 ml e a seguir, guardada em vidro escuro, com clorofórmio como preservativo, a 5°C.

#### 3.4.2. Solução de cloroneb

1,4-dicloro-2,5-dimetoxil benzeno . . . . . 100 mg

Água esterilizada . . . . . 50 ml

#### 3.4.3. Solução salina

Foi preparada uma solução de NaCl 0,9% com água destilada. Foram colocados 9 ml da solução em frascos e os mesmos foram autoclavados e mantidos à temperatura ambiente.

#### 3.4.4. Solução de "Tween"

Foi adicionado "tween" 80 à água destilada em uma concentração de 0,1% (v/v). 2,5 ml da solução foram colocados em tubos e esses foram em seguida autoclavados e mantidos à temperatura ambiente.

#### 3.4.5. Solução de vitaminas

|   |          |
|---|----------|
| Ácido nicotínico . . . . .              | 100,0 mg |
| Ácido <i>p</i> -aminobenzóico . . . . . | 10,0 mg  |
| Aneurina . . . . .                      | 50,0 mg  |
| Biotina . . . . .                       | 0,2 mg   |
| Piridoxina . . . . .                    | 50,0 mg  |
| Riboflavina . . . . .                   | 100,0 mg |
| Água destilada . . . . .                | 100,0 ml |

A solução foi colocada em banho-maria por 15 minutos e guardada em frasco escuro no refrigerador, sob clorofórmio.

#### 3.4.6. Suplementos adicionados ao meio mínimo

| <u>Substância</u>             | <u>Concentração final</u> |
|-------------------------------|---------------------------|
| Ácido nicotínico              | 0,25 µg/ml                |
| Ácido <i>p</i> -aminobenzóico | 0,25 µg/ml                |
| Adenina                       | 25,0 µg/ml                |
| Biotina                       | 0,10 µg/ml                |
| Metionina                     | 50,00 µg/ml               |
| Piridoxina                    | 0,25 µg/ml                |
| Prolina                       | 50,00 µg/ml               |

| <u>Substância</u>   | <u>Concentração final</u> |
|---------------------|---------------------------|
| Riboflavina         | 0,50 µg/ml                |
| Tiosulfato de sódio | 100,00 µg/ml              |

3.4.7. Solução ácida de antrona

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| Antrona . . . . .               | 2,0 g      |
| Ácido sulfúrico (95%) . . . . . | 1.000,0 ml |

3.4.8. Solução de cloreto de potássio (KCl 0,154M)

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| Cloreto de potássio . . . . . | 1,12 g     |
| Água destilada. . . . .       | 1.000,0 ml |

3.4.9. Solução de glicose

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| Glicose . . . . .       | 180 mg   |
| Água destilada. . . . . | 100,0 ml |

3.4.10. Solução de hidróxido de potássio (KOH 18%)

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| Hidróxido de potássio . . . . . | 18 g     |
| Água destilada. . . . .         | 100,0 ml |

### 3.4.11 Tampão fosfato (Sørensen) pH = 6,8

*Solução A:*

Solução de fosfato de sódio monobásico 0,2M . . . 27,8 g em 1.000 ml

*Solução B:*

Solução de fosfato de sódio dibásico 0,2M . . . . 53,65 g em 1.000 ml

Para obtenção do pH = 6,8, foram misturadas:

Solução A: 51,0 ml

Solução B: 49,0 ml

A mistura foi diluída para um total de 200 ml e em seguida foi esterilizada e mantida no refrigerador.

### 3.4.12. Solução de tris-ácido maleico (ADELBERG e col., 1965)

A solução de tris-ácido maleico consiste de meio-mínimo onde os sais de fosfato foram substituídos por:

|  |          |
|--|----------|
| 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (tris) M/20 . . . . . | 0,6057 g |
| Ácido maleico . . . . .                                      | 0,5804 g |
| Meio mínimo líquido . . . . .                                | 100,0 ml |

O pH da solução foi ajustado para 6,0 com NaOH.

A solução foi autoclavada e mantida no refrigerador.

### 3.5. Semeadura e incubação

Para obtenção de colônias isoladas os conídios foram transferidos para tubos com 2,5 ml de solução de "tween". As cadeias de conídios

foram desagregadas por agitação no "Vortex mixer". A estimativa do número de conídios foi feita em hematómetro Newbauer. Diluições adequadas foram feitas em 9 ml de solução salina para obtenção de cerca de 30 - 50 colônias por placa. Foi espalhado 0,1 ml da suspensão final em meio de cultura sólido com a alça de Drigalsky.

As placas mestras para análise genética foram preparadas inoculando-se os conídios das colônias segregantes em 26 pontos de disposição 1 + 5 x 5, marcados no fundo da placa. A transferência destas 26 colônias para diferentes meios de cultura foi feita por intermédio de um replicador de 26 pontas.

Durante todo o experimento a temperatura de incubação foi de 37°C, exceto nos casos que serão assinalados.

### 3.6. Tratamento com mutagênicos

Com a finalidade de aumentar a frequência de mutantes, as linhagens *bi* A<sub>1</sub>; *meth* G<sub>1</sub> e *pro* A<sub>1</sub>; *paba* A<sub>6</sub>; *y* A<sub>1</sub> foram tratadas com dois agentes mutagênicos: luz ultra-violeta e N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (nitrosoguanidina ou NTG).

#### 3.6.1. Tratamento com luz ultra-violeta

Os conídios de colônias com 5 - 7 dias de incubação foram transferidos para tubos com 2,5 ml de solução de "tween" e agitados para desagregação das cadeias. 1 ml dessa suspensão foi colocado em 9 ml de solução salina e esta suspensão diluída foi colocada em uma placa de Petri para irradiação. A lâmpada utilizada foi a Mineral light 2650 Å<sup>0</sup>, à cerca de 20 cm

de distância da suspensão de conídios. Amostras de 0,1 ml foram retiradas nos tempos 0, 1, 2 e 4 minutos e diluídas em solução salina. Foi semeado 0,1 ml da suspensão de conídios irradiada em placas com meio completo para determinar a porcentagem de conídios sobreviventes e proceder-se ao isolamento de derivados compactos.

### 3.6.2. Tratamento com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina

O tratamento com nitrosoguanidina foi realizado de acordo com a técnica descrita por CLUTTERBUCK e SINHA (1966).

Os conídios de colônias com 5 - 7 dias de incubação foram colocados em 2 ml de solução tris-ácido maleico pH = 6,0. Foram dissolvidos 6,0mg de NTG em 10 ml de solução tris-ácido maleico e após aquecimento as soluções foram misturadas e incubadas à 37°C com agitação ocasional. A concentração final foi de 0,5 mg de NTC por ml. As amostras foram retiradas após 10, 20 e 30 minutos em alíquotas de 2 ml, centrifugadas e suspensas em solução salina (2 vezes). Diluições convenientes das amostras foram semeadas em placas com meio completo para determinar a porcentagem de sobrevivência e proceder-se ao isolamento dos derivados compactos.

Como controle foi adotado o mesmo procedimento, mas sem adição de NTG.

### 3.7. Identificação e isolamento dos derivados compactos

Os derivados compactos foram identificados visualmente comparando-se o seu crescimento em relação à linhagem original. Os derivados selecionados foram transferidos isoladamente para placas com meio completo, pu-



rificados e estocados em tubos com meio completo inclinado.

### 3.8. Crescimento dos derivados compactos

Os derivados isolados foram inoculados no centro de placas com meio completo e após uma semana de incubação foram feitas medições do diâmetro da colônia. Como controle foi utilizada a linhagem normal *bí A<sub>1</sub>* *meth G<sub>1</sub>*

### 3.9. Produção de setores

O grau de instabilidade mitótica de uma linhagem pode ser observada através da produção de setores. Para verificar a possibilidade de ocorrência deste fenômeno, os conídios dos derivados compactos foram inoculados no centro de placas com meio completo e incubadas durante sete dias. Decorrido este tempo procedeu-se à verificação da instabilidade pela formação ou não de setores. Estes podem ser reconhecidos pela morfologia e (ou) taxa de crescimento alterada.

### 3.10. Análise genética

#### 3.10.1. Heterocários

O primeiro passo na análise genética consiste na obtenção de heterocários que resultam da inclusão de dois núcleos diferentes num citoplasma comum. Para obtenção de heterocários procedeu-se de acordo com a técnica descrita por PONTECORVO e col. (1953). Os conídios de duas linhagens com marcadores genéticos diferentes foram colocados em 2,5 ml de meio

mínimo líquido + 2% de meio completo. Este meio completo favorece um pequeno crescimento para que possa ocorrer a anastomose das hifas. A suspensão foi incubada durante 4 - 6 dias após o qual a massa micelial formada na superfície do meio de cultura foi removida, recortada e transferida para placas com meio mínimo.

Os heterocários para análise genética foram preparados a partir dos derivados compactos isolados com a linhagem MSE.

Por convenção os componentes do heterocário foram separados pelo sinal +.

### 3.10.2. Isolamento de diplóides

Os diplóides heterozigotos foram obtidos usando-se a técnica de ROPER (1952). Cerca de  $10^6$  conídios de um heterocário balanceado foram semeados em meio mínimo. Os conídios haplóides não se desenvolvem neste meio, entretanto, com a fusão de núcleos haplóides há formação de núcleos diplóides heterozigotos que originam os conídios diplóides capazes de crescer em meio mínimo. As colônias diplóides isoladas foram purificadas em meio mínimo e estocadas em meio mínimo inclinado.

Por convenção os componentes de um núcleo diplóide foram separados pelo sinal //.

### 3.10-3. Análise mitótica via ciclo parassexual

A indução para haploidização dos diplóides foi feita usando-se um análogo de aminoácido, a p-fluorfenilalanina (MORPURGO, 1961) e principalmente cloroneb (SANT'ANA, 1974), nas concentrações de 35 e 15 µg/ml,

respectivamente. Os conídios diplóides foram inoculados em quatro pontos equidistantes em placas com meio completo mais a droga. Após sete dias de incubação os setores haplóides produzidos foram purificados por estrias em meio completo.

A segregação somática induzida envolve segregação de cromossomos inteiros de forma que todos os marcadores genéticos de um grupo de ligação segregam como uma unidade. Consequentemente, genes mutantes podem ser relacionados com um grupo de ligação em particular, usando-se diplóides sintetizados entre o mutante compacto e uma linhagem testadora com marcadores genéticos nos oito grupos de ligação.

Os segregantes haplóides isolados foram classificados quanto aos fatores de crescimento e morfologia (cor dos conídios).

#### 3.10.4. Análise meiótica

A análise meiótica foi efetuada de acordo com a técnica descrita por PONTECORVO e col. (1953). Os heterocários obtidos dos diversos cruzamentos foram transferidos para placas com meio mínimo e após 7 - 10 dias de incubação os cleistotécios estavam formados e maduros. Cada cleistotécio foi, previamente limpo de conídios e células de Hülle aderentes, transferido para a parede de um frasco com solução salina (3 - 4 ml) e rompido com uma alça de platina. Comprovada a natureza híbrida do cleistotécio a suspensão de ascósporos foi diluída e semeada em meio completo. Após três dias de incubação as colônias puderam ser caracterizadas quanto à morfologia (normais ou compactos). Para se obter os dados de ligação genética as colônias segregantes foram isoladas e inoculadas em placas mestras de disposição 1 + 5 x 5. Os requisitos nutricionais de cada colônia foram ensaiados usando-se um replicador de 26 pontas adequadas para a transferência simultânea

das 26 colônias da placa mestra para placas com meio mínimo suplementado com os diferentes requisitos nutricionais. A resposta de crescimento foi normalmente observada após 24 horas para o marcador biotina, 48 horas para os demais marcadores e algumas vezes 72 horas para o marcador galactose.

Os valores de ligação genética foram obtidos através da fórmula:

$$c = \frac{r}{n} \times 100$$

r = nº total de recombinantes.

n = nº total de ascosporos analisados.

O desvio padrão foi calculado pela fórmula:

$$s = \frac{\sqrt{p(1-p)}}{n}$$

p = frequência de recombinantes.

n = nº total de ascosporos analisados.

### 3.10.5. Teste do heterocário

O teste do heterocário foi efetuado de acordo com o método descrito por JINKS (1963). Através deste teste pode ser verificada a origem citoplasmática do caráter compacto.

O heterocário foi preparado conforme o item 3.10.1, entre um derivado compacto e a linhagem MSE, colocado para desenvolver em meio mínimo e incubado durante uma semana. Com uma alça de platina foi retirada uma amostra de conídios formados pelo heterocário e após diluições convenientes

os conídios foram semeados em placas de meio mínimo suplementadas com os requisitos nutricionais de uma e de outra linhagem envolvidas no cruzamento.

O teste do heterocário é baseado na fusão citoplasmática que ocorre entre micélios de diferentes linhagens. Sendo o caráter determinado por fatores citoplasmáticos os conídios provenientes do heterocário serão exclusivamente do tipo normal ou compacto, dependendo da interação entre eles; se for um caráter determinado por fatores nucleares deverão surgir os dois tipos de morfologia, normal e compacta, associados com os marcadores genéticos de cada linhagem.

### 3.11. Respirometria

#### 3.11.1. Preparação da suspensão micelial

Os conídios de colônias com sete dias de crescimento foram transferidos para 2,5 ml de "tween" e agitados vigorosamente para desagregação das cadeias. Uma alíquota de 1 ml dessa suspensão foi colocada em 5 ml de meio completo líquido e levada ao agitador durante 24 horas à temperatura de 37°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). A massa micelial formada foi lavada duas vezes em solução de KCl 0,154M em uma centrífuga a 7.000 rpm durante 3 minutos. Foram suspensas em 6 ml da solução de KCl e levadas novamente ao agitador durante 16 horas. Esta operação foi efetuada afim de minimizar o nível da respiração endógena. Decorrido este tempo a suspensão micelial foi centrifugada duas vezes em 5 ml de tampão fosfato pH = 6,8, colocada em 10 ml deste tampão e a seguir distribuídas nos frascos de reação do aparelho.

A titulação foi feita a partir da suspensão inicial de conídios, por diluição em série e semeadura. A contagem de conídios em hematímetro não foi empregada devido à escassez na produção de conídios entre as

linhagens compactas. O método empregado corresponde à uma determinação da viabilidade celular, que substitui favoravelmente o método usual de contagem. O número de células viáveis foi mantido entre  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  cels/ml.

### 3.11.2. Determinações manométricas

As determinações manométricas foram feitas em aparelho de Warburg. Durante a operação os frascos de reação foram mantidos em banho-maria à temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , com agitação.

A calibragem, feita com a finalidade de determinar o volume total do sistema fechado, foi efetuada de acordo com o método descrito por BACILA (1960) usando-se mercúrio.

### 3.11.3. Preparação do aparelho de Warburg

Os cinco conjuntos de manômetros e os respectivos frascos de reação foram distribuídos da seguinte forma: o 1º conjunto como termobarômetro; o 2º para medir a respiração endógena e o 3º, 4º e 5º para medir o consumo de  $\text{O}_2$  usando-se glicose como substrato.

O termobarômetro foi utilizado para corrigir as modificações que se verificam durante a operação, da pressão e da temperatura. Foi utilizado volume de tampão idêntico ao volume de líquido dos frascos de reação.

Inicialmente, os frascos de reação e as respectivas rolhas foram untadas com lubrificante "Dow corning" nas regiões esmerilhadas. Pedacos retangulares de papel de filtro (0,5 x 5 cm) foram dobrados e colocados no interior do poço central de cada frasco, embebidos com solução de KOH afim de dar maior superfície de absorção ao  $\text{CO}_2$  que evolui durante a operação.

Nos frascos de reação foram colocados a suspensão micelial, substrato (glicose) e hidróxido de potássio, obedecendo à seguinte distribuição:

| Nº do frasco | Utilização | Corpo principal<br>(2,5 ml) | Braço lateral<br>(0,2 ml) | Poço central<br>(0,2 ml) |
|--------------|------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 184          | TB         | tampão PO <sub>4</sub>      | tampão PO <sub>4</sub>    | KOH                      |
| 145          | Endógeno   | Susp. micelial              | tampão PO <sub>4</sub>    | KOH                      |
| 135          | Respiração | " "                         | glicose                   | KOH                      |
| 199          | Respiração | " "                         | glicose                   | KOH                      |
| 192          | Respiração | " "                         | glicose                   | KOH                      |

O aparelho de Warburg foi ligado horas antes do início do experimento para que o mesmo entrasse em equilíbrio térmico. A temperatura do banho-maria foi mantida ao redor de  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

O experimento foi realizado durante 420 minutos com leituras no intervalo de 60 minutos. Para a realização do mesmo seguiu-se a metodologia citada por UMBREITT (1964). O tubo à direita do manômetro foi mantido à altura dos 170 mm durante o início do experimento. Quando foi atingido o equilíbrio a torneira do aparelho foi fechada e a coluna da solução de Krebs foi elevada à altura de 180 mm. Para as leituras, a coluna da direita foi nivelada até a altura dos 180 mm e a variação foi lida pela coluna da esquerda.

A variação da coluna é resultante das variações de pressão e temperatura ocorridas durante o experimento e também ao consumo de O<sub>2</sub> da suspensão micelial. Para ser obtida a variação devido apenas ao consumo de O<sub>2</sub>, é feita uma comparação com a variação obtida pelo termobarômetro. A variação resultante, devido ao consumo de O<sub>2</sub>, é multiplicada pelo respectivo valor de kO<sub>2</sub> e o resultado é obtido em  $\mu\text{l}$  de O<sub>2</sub> consumido.

### 3.11.4. Consumo de glicose

#### 3.11.4.1. Reta padrão de glicose

A reta padrão de glicose foi feita com a finalidade de servir como ponto de referência para quantificar a glicose residual em cada experimento. O método usado para determinar a quantidade de açúcar foi o método da antrona, conforme BACILA (1960). Consistiu em se utilizar 2 ml da solução de glicose de concentração conhecida ao qual foi adicionado 8 ml da solução de antrona com seringa, esperou-se 15 minutos e a leitura foi feita em colorímetro Klett utilizando-se filtro verde 540  $\mu$ m.

A reta padrão foi feita com quantidades de glicose de: 20, 40, 60 e 80  $\mu$ g/ml.

#### 3.11.4.2. Dosagem da glicose residual

A glicose foi adicionada em cada frasco como substrato e a glicose residual foi medida após 420 minutos de operação no aparelho de Warburg.

A determinação de glicose foi feita pelo método da antrona, nas mesmas condições do ítem anterior, usando-se agora 2 ml do conteúdo líquido de cada frasco de concentração de açúcar desconhecida. A leitura obtida foi relacionada com a reta padrão para ser obtida a dosagem da glicose residual.



## 3.11.5. Assimilação oxidativa

O cálculo da porcentagem de assimilação oxidativa foi feito segundo BACILA (1960) e DARBY e GODDARD (1950).

A quantidade de glicose consumida foi calculada subtraindo-se a quantidade inicial de substrato àquela que sobrou no final de 420 minutos de operação. A quantidade de glicose oxidada foi calculada assumindo-se a reação:  $C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$ , ou seja, que 6 moléculas de  $O_2$  são utilizadas por unidade de glicose. Como cada molécula grama de  $O_2$  é igual a 22,4 l de  $O_2$ , serão necessários 134,4 l para oxidação de 1 mol de glicose. A quantidade de glicose consumida é conhecida e pode-se então estabelecer o consumo de  $O_2$  esperado. O excesso de  $O_2$  entre o valor esperado e o observado foi considerado como a % assimilada e calculada pela fórmula:

$$\% \text{ assimilação oxidativa} = \frac{O_2 \text{ esperado} - O_2 \text{ observado}}{O_2 \text{ esperado}} \times 100$$

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Tratamento com mutagênicos

Os conídios das linhagens *bi A<sub>1</sub>*; *meth G<sub>1</sub>* e *pro A<sub>1</sub>*; *paba A<sub>6</sub>*; *y A<sub>1</sub>* foram tratados com luz ultra-violeta e nitrosoguanidina. A porcentagem de sobreviventes e de derivados compactos é apresentada nos itens 4.1.1. e 4.1.2.

#### 4.1.1. Tratamento com luz ultra-violeta (UV)

Os conídios das linhagens *bi A<sub>1</sub>*; *meth G<sub>1</sub>* e *pro A<sub>1</sub>*; *paba A<sub>6</sub>*; *y A<sub>1</sub>* submetidos à irradiação com luz ultra-violeta em diferentes tempos forneceram os resultados apresentados na tabela 1 e 2 e esquematizados na figura 2.

Tabela 1 - Tratamento com luz UV: porcentagem de sobreviventes e de derivados compactos da linhagem *bi A<sub>1</sub>*; *meth G<sub>1</sub>*.

| Tempo (minutos)           | 0                 | 1                 | 2                 | 4                 |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Total de conídios         | $5,2 \times 10^6$ | $2,4 \times 10^6$ | $1,4 \times 10^5$ | $3,1 \times 10^4$ |
| Nº de colônias examinadas | 332               | 155               | 299               | 350               |
| % de sobreviventes        | 100               | 46,7              | 2,9               | 0,6               |
| % de compactos            | 0                 | 0                 | 0,7               | 6                 |

Tabela 2 - Tratamento com luz UV: porcentagem de sobreviventes e de derivados compactos da linhagem *pro A<sub>1</sub>*; *paba A<sub>6</sub>*; *y A<sub>1</sub>*;

| Tempo (minutos)           | 0                 | 1                 | 2                 | 4                 |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Total de conídios         | $4,6 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^7$ | $1,2 \times 10^6$ | $3,5 \times 10^5$ |
| Nº de colônias examinadas | 463               | 207               | 213               | 383               |
| % de sobreviventes        | 100               | 23,9              | 2,6               | 0,8               |
| % de compactos            | 0                 | 0,5               | 1,0               | 2,1               |

#### 4.1.2. Tratamento com nitrosoguanidina (MTG)

Os conídios das linhagens *byA<sub>1</sub>*; *meth G<sub>1</sub>* e *pro A<sub>1</sub>*; *paba A<sub>6</sub>*; *y A<sub>1</sub>* tratados com nitrosoguanidina à concentração de 0,5 mg/ml em diferentes tempos forneceram os resultados apresentados nas Tabelas 3 e 4 e esquematizados na Figura 3.

Tabela 3 - Tratamento com NTG: porcentagem de sobreviventes e de derivados compactos da linhagem *bi* A<sub>1</sub>; *meth* G<sub>1</sub>.

| Tempo (minutos)           | 0                     | 10                    | 20                    | 30                    |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Total de conídios         | 3,8 x 10 <sup>7</sup> | 3,7 x 10 <sup>6</sup> | 1,1 x 10 <sup>6</sup> | 1,1 x 10 <sup>5</sup> |
| Nº de colônias examinadas | 828                   | 152                   | 750                   | 854                   |
| % de sobreviventes        | 100                   | 9,8                   | 3,0                   | 0,3                   |
| % de compactos            | 0                     | 3,3                   | 4,0                   | 4,7                   |

Tabela 4 - Tratamento com NTG: porcentagem de sobreviventes e de derivados compactos da linhagem *pro* A<sub>1</sub>; *paba* A<sub>6</sub>; *y* A<sub>1</sub>.

| Tempo (minutos)           | 0                     | 10                    | 20                    | 30                    |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Total de conídios         | 6,5 x 10 <sup>7</sup> | 5,6 x 10 <sup>6</sup> | 4,9 x 10 <sup>6</sup> | 4,9 x 10 <sup>5</sup> |
| Nº de colônias examinadas | 391                   | 508                   | 587                   | 491                   |
| % de sobreviventes        | 100                   | 7,9                   | 5,1                   | 0,6                   |
| % de compactos            | 0                     | 0,4                   | 1                     | 1,6                   |

#### 4.2. Identificação e isolamento dos derivados compactos

A identificação dos isolados compactos foi feita visualmente baseando-se apenas nas características de crescimento. Foram isolados 20 de derivados compactos dos diversos tratamentos efetuados resultantes das linhagens *bi* A<sub>1</sub>; *meth* G<sub>1</sub> e *pro* A<sub>1</sub>; *paba* A<sub>6</sub>; *y* A<sub>1</sub>. A origem e descrição dos derivados compactos pode ser vista na Tabela 6.

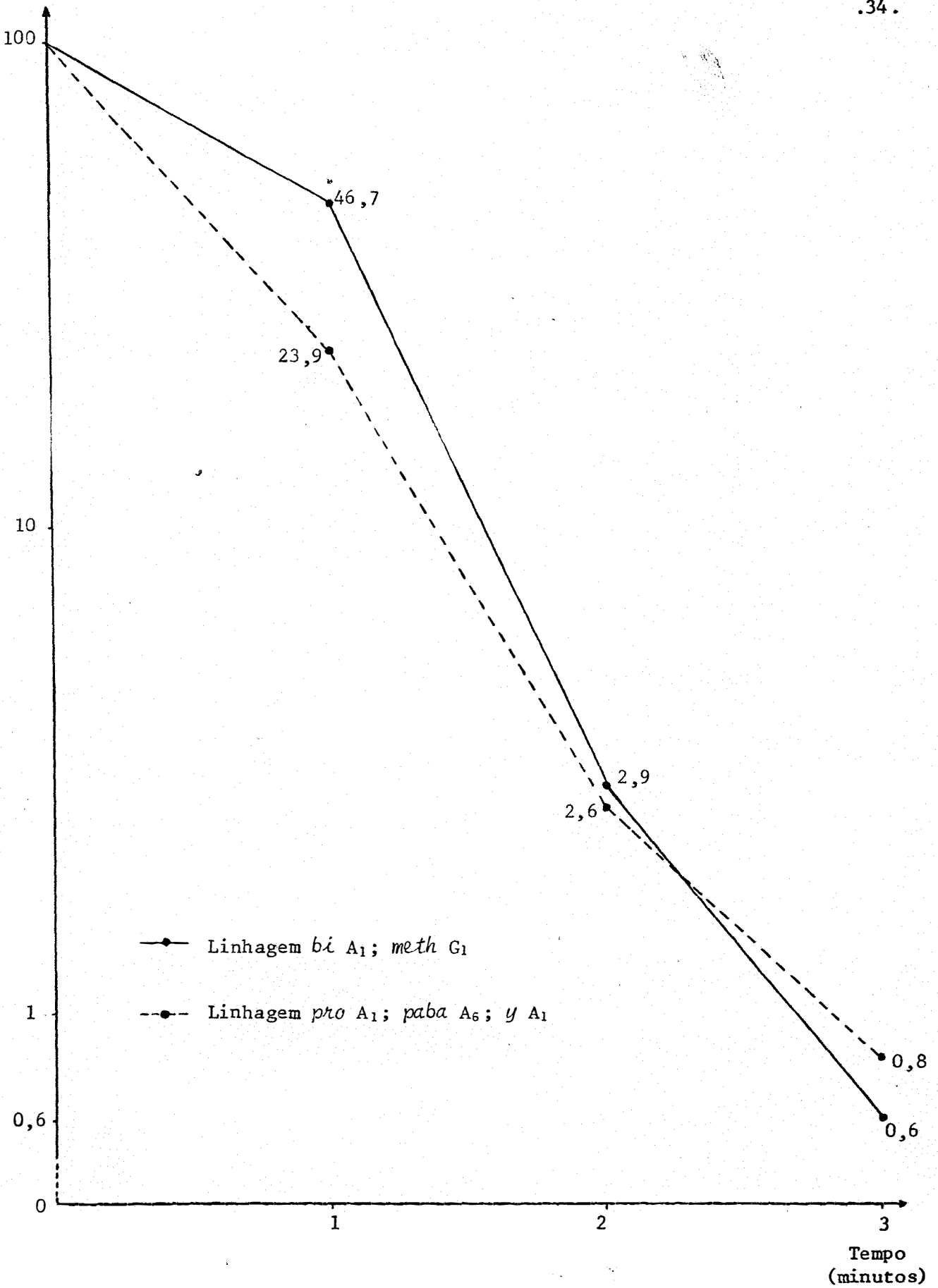


Figura 2 - Porcentagem de sobreviventes das linhagens *bi A1; meth G1* e *pro A1; paba A6; y A1* após tratamento com luz ultra-violeta.

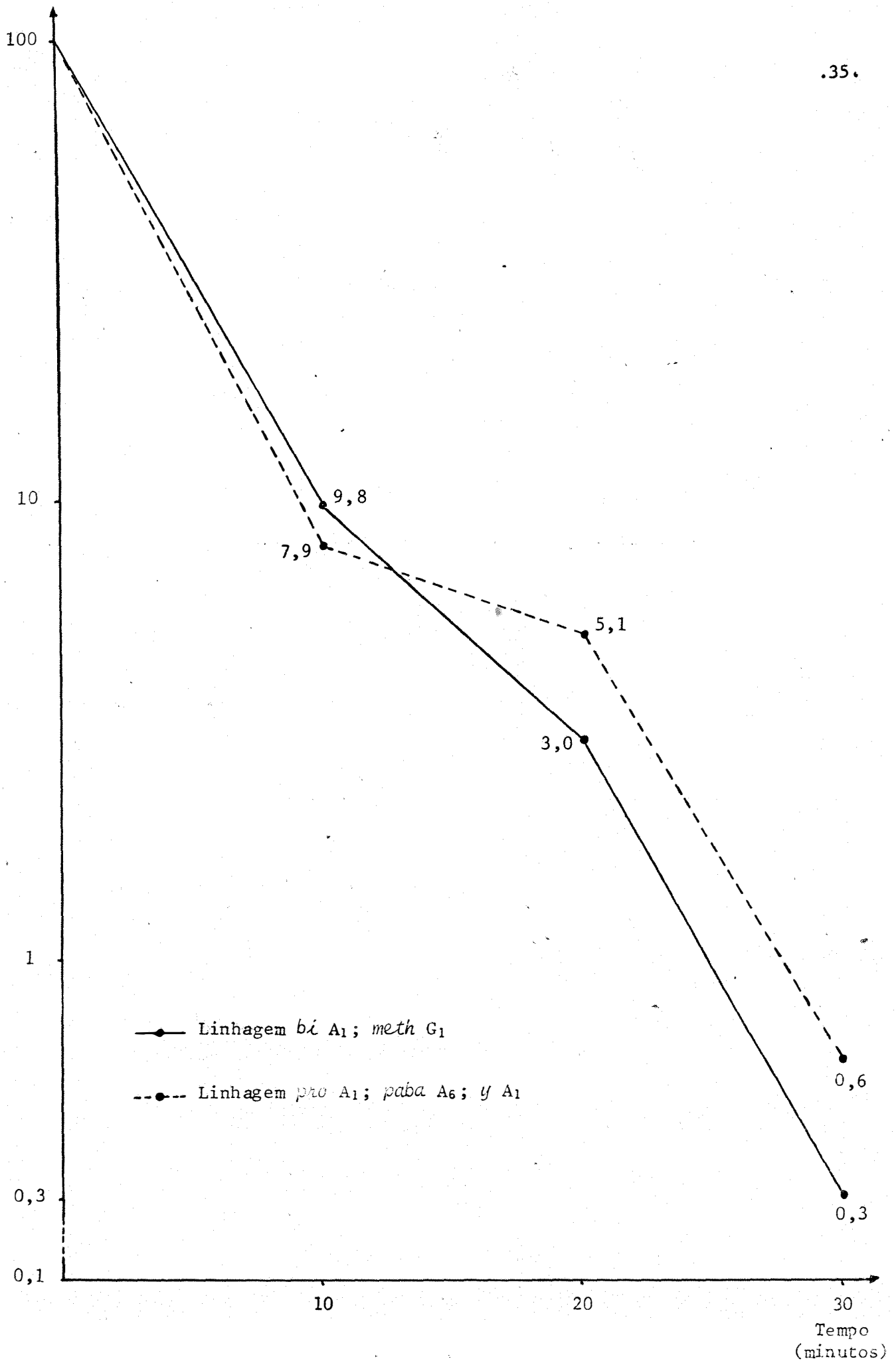


Figura 3 - Porcentagem de sobreviventes das linhagens *bi* A<sub>1</sub>; *meth* G<sub>1</sub> e *pro* A<sub>1</sub>; *paba* A<sub>6</sub>; *y* A<sub>1</sub> após tratamento com nitrosoguanidina.

### 4.3. Crescimento dos derivados compactos

O crescimento dos derivados compactos foi observado através da medição do diâmetro das colônias com sete dias de incubação. Os conídios foram inoculados no centro de placas com meio completo sólido e a medição foi efetuada com uma régua milimetrada. Foram feitas 10 placas para cada derivado e a média obtida pode ser vista na Tabela 6. A análise estatística efetuada através do teste F e Tukey se encontra na Tabela 5. Como controle foi utilizada apenas a linhagem *bi A<sub>1</sub>*; *meth G<sub>1</sub>* que apresentou diâmetro médio da colônia semelhante à linhagem *pro A<sub>1</sub>*; *paba A<sub>6</sub>*; *y A<sub>1</sub>*.

### 4.4. Classificação dos derivados compactos

Os derivados compactos das linhagens *pro A<sub>1</sub>*; *paba A<sub>6</sub>*; *y A<sub>1</sub>* e *bi A<sub>1</sub>*; *meth G<sub>1</sub>* foram classificados de acordo com as características de crescimento e a origem. Os isolados de nº 1 à 11 são derivados da linhagem *bi A<sub>1</sub>*; *meth G<sub>1</sub>* e os de nº 12 a 20 são derivados da linhagem *pro A<sub>1</sub>*; *paba A<sub>6</sub>*; *y A<sub>1</sub>* classificados em ordem crescente de crescimento (diâmetro médio das colônias).

Tabela 5 - Análise estatística do diâmetro da colônia da linhagem *bi A<sub>1</sub>*; *meth G<sub>1</sub>* e dos derivados compactos.

| Fonte de variação | G.L. | S.Q.     | Q.M.    | F            |
|-------------------|------|----------|---------|--------------|
| Isolados          | 20   | 433,4792 | 21,6739 | 2.798,4565** |
| Resíduo           | 189  | 4,7969   | 0,3858  |              |
| TOTAL             | 209  | 438.2762 |         |              |

Coefficiente de variação = 4,26.

Para verificar se havia diferenças significativas entre dois isolados quaisquer foi aplicado o Teste de Tukey, de acordo com PIMENTEL GOMES (1966), obtendo-se:

$$\Delta = 1,11$$

5%

Pelos resultados obtidos observa-se que todos os isolados compactos apresentam uma diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, em relação à linhagem normal.

#### 4.5. Produção de setores

Alguns isolados compactos apresentaram o fenômeno de instabilidade produzindo setores de morfologia diferente em relação ao tipo original. Para verificar este fenômeno cada isolado foi inoculado no centro de 30 placas com meio completo e após 7 dias de incubação foi verificado a formação ou não de setores. A Tabela 7 mostra os resultados encontrados para os derivados que apresentaram instabilidade. Os demais isolados se mostraram estáveis, assim como as linhagens normais *bi A<sub>1</sub>*; *meth G<sub>1</sub>* e *proA<sub>1</sub>*; *pabaA<sub>6</sub>*; *y A<sub>1</sub>*.

Em muitos derivados instáveis a formação de setores não é muito nítida. Assim o isolado 9 apresenta algumas regiões mais escuras, mas de igual morfologia; o isolado 10 apresenta os bordos da colônia com contornos irregulares e a diferenciação dos setores não é nítida; o isolado 18 também apresenta algumas regiões mais escuras mas visíveis principalmente pelo fundo da placa e finalmente o isolado 5 apresenta principalmente setores com poucos conídios.



Tabela 6 - Características morfológicas e de crescimento dos derivados compactos.

| Nº do isolado                               | Tratamento | Diâmetro da colônia* | Características da colônia                      |
|---|------------|----------------------|---|
| 1   | NTG        | 1,04                 | rosa claro, enrugado                            |
| 2   | UV         | 1,40                 | rosa queimado, estrias radiais regulares.       |
| 3   | UV         | 1,40                 | púrpura escuro; pigmentação no meio de cultura. |
| 4   | UV         | 1,44                 | claro, enrugado.                                |
| 5   | NTG        | 1,86                 | púrpura no centro, halo micelial ao redor.      |
| 6   | UV         | 1,98                 | púrpura escuro; áspero.                         |
| 7   | UV         | 1,99                 | púrpura; instável.                              |
| 8   | NTG        | 2,00                 | claro; enrugado.                                |
| 9   | UV         | 2,01                 | alto; rosa claro.                               |
| 10  | UV         | 2,02                 | claro; enrugado.                                |
| 11  | NTG        | 2,09                 | claro; estrias concêntricas.                    |
| 12  | NTG        | 1,42                 | marrom escuro, estrias radiais regulares.       |
| 13  | UV         | 1,53                 | marrom; enrugado.                               |
| 14  | NTG        | 1,54                 | cinza marrom.                                   |
| 15  | NTG        | 1,66                 | amarelo marrom; enrugado.                       |
| 16  | UV         | 1,76                 | cinza; enrugado.                                |
| 17  | NTG        | 1,76                 | claro; enrugado.                                |
| 18  | UV         | 2,03                 | alto; pequenas estrias nos bordos.              |
| 19  | NTG        | 2,04                 | marrom; enrugado.                               |
| 20  | UV         | 2,05                 | marrom; enrugado.                               |
| <i>bi A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub></i> |            | 8,26                 | normal  |

\*Medição do diâmetro da colônia (cm) após 7 dias de incubação. Média de 10 repetições.



Figura 4 - Morfologia de três isolados compactos e da linhagem normal.

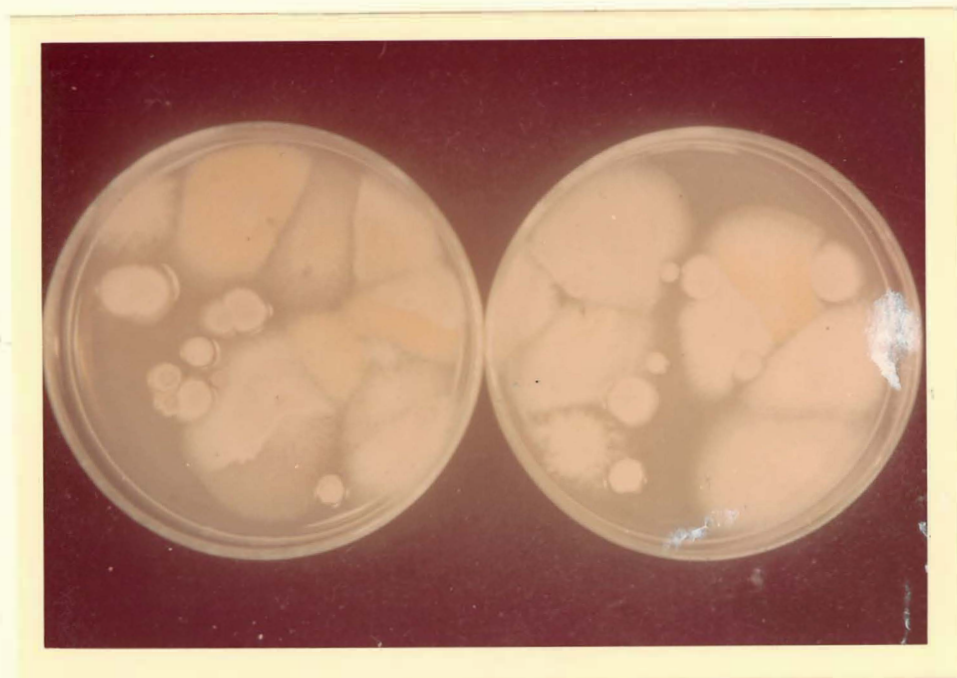


Figura 5 - Segregação meiôtica de compacto X normal.

Tabela 7 - Produção de setores em isolados instáveis.

| Isolado                                     | Nº de setores | Nº de colônias | Nº setores/colônia |
|---|---------------|----------------|--------------------|
| 5   | 24            | 25             | 0,96               |
| 7   | 35            | 32             | 1,09               |
| 9   | *             | 22             | -                  |
| 10  | 21            | 18             | 1,17               |
| 13  | 11            | 15             | 0,73               |
| 18  | 10            | 20             | 0,50               |
| 19  | 5             | 16             | 0,31               |
| 20  | 4             | 16             | 0,25               |
| <i>by A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub></i> | 0             | 38             | 0,00               |

\*A formação de setores não é nítida dificultando a contagem.



Figura 6 - Produção de setores apresentada pelo isolado 5.



Figura 7 - Produção de setores apresentada pelo isolado 7.

#### 4.6. Análise genética dos derivados compactos

Todos os derivados compactos isolados foram analisados geneticamente procurando-se determinar os fatores responsáveis pelo caráter compacto. A análise genética foi efetuada segundo o método descrito no item 3.10., por via mitótica e meiótica. Nos dois casos o cruzamento foi feito com a linhagem MSE.

##### 4.6.1. Análise mitótica

A análise mitótica foi efetuada segundo o método descrito no item 3.10.2 e 3.10.3., usando-se o *p*-fluorfenilalanina ou cloroneb para induzir a haploidização. Foram obtidos apenas segregantes haplóides morfologicamente normais; isto é esperado desde que a técnica favorece a seleção destes em relação aos tipos compactos. Desta forma, a localização do determinante compacto pôde ser feita verificando-se o não aparecimento de marcadores genéticos de um determinado grupo de ligação entre os segregantes normais. Entretanto, quando a haploidização foi efetuada com cloroneb os segregantes normais podem apresentar estes marcadores genéticos, mas em baixa frequência, devido à recombinação mitótica (AZEVEDO e col., 1977).

Os resultados obtidos com a análise mitótica estão sumarizados nas Tabelas de nº 8 a 27. Em alguns casos, devido à interação entre os marcadores *meth* (metionina) e  $\Delta$  (tiosulfato) os dados referentes ao marcador  $\Delta$  não puderam ser obtidos.

Tabela 8 - Análise mitótica do diplóide 1//MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores        | Segregantes normais |
|------------------|-------------------|---------------------|
| I                | bi <sup>+</sup>   | 7                   |
|                  | bi                | 13                  |
| II               | w <sup>+</sup>    | 0                   |
|                  | w                 | 20 *                |
| III              | gal <sup>+</sup>  | 1                   |
|                  | gal               | 19                  |
| IV               | pyro <sup>+</sup> | 12                  |
|                  | pyro              | 8                   |
| V                | fac <sup>+</sup>  | 10                  |
|                  | fac               | 10                  |
| VI               | s <sup>+</sup>    | 6                   |
|                  | s                 | 2                   |
| VII              | nic <sup>+</sup>  | 8                   |
|                  | nic               | 12                  |
| VIII             | ribo <sup>+</sup> | 8                   |
|                  | ribo              | 12                  |

\*Determinante compacto no grupo de ligação II.

Tabela 9 - Análise mitótica do diplóide 2 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores        | Segregantes normais |
|------------------|-------------------|---------------------|
| I                | bi <sup>+</sup>   | 7                   |
|                  | bi                | 12                  |
| II               | w <sup>+</sup>    | 5                   |
|                  | w                 | 14                  |
| III              | gal <sup>+</sup>  | 6                   |
|                  | gal               | 13                  |
| IV               | pyro <sup>+</sup> | 10                  |
|                  | pyro              | 9                   |
| V                | fac <sup>+</sup>  | 12                  |
|                  | fac               | 7                   |
| VI               | s <sup>+</sup>    | 7                   |
|                  | s                 | 2                   |
| VII              | nic <sup>+</sup>  | 0                   |
|                  | nic               | 19*                 |
| VIII             | ribo <sup>+</sup> | 15                  |
|                  | ribo              | 4                   |

\*Determinante compacto no grupo de ligação VII.

Tabela 10 - Análise mitótica do diplóide 3 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores        | Segregantes normais |
|------------------|-------------------|---------------------|
| I                | bi <sup>+</sup>   | 6                   |
|                  | bi                | 8                   |
| II               | w <sup>+</sup>    | 0 *                 |
|                  | w                 | 14                  |
| III              | gal <sup>+</sup>  | 13                  |
|                  | gal               | 1                   |
| IV               | pyro <sup>+</sup> | 0 *                 |
|                  | pyro              | 14                  |
| V                | fac <sup>+</sup>  | 6                   |
|                  | fac               | 8                   |
| VI               | s <sup>+</sup>    | 8                   |
|                  | s                 | 6                   |
| VII              | nic <sup>+</sup>  | 8                   |
|                  | nic               | 6                   |
| VIII             | ribo <sup>+</sup> | 1                   |
|                  | ribo              | 13                  |

\*Determinante compacto no grupo de ligação II e (ou) IV.



Tabela 11 - Análise mitótica do diplóide 4 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores        | Segregantes normais |
|------------------|-------------------|---------------------|
| I                | bi <sup>+</sup>   | 5                   |
|                  | bi                | 6                   |
| II               | w <sup>+</sup>    | 1                   |
|                  | w                 | 10                  |
| III              | gal <sup>+</sup>  | 7                   |
|                  | gal               | 4                   |
| IV               | pyro <sup>+</sup> | 0                   |
|                  | pyro              | 11                  |
| V                | fac <sup>+</sup>  | 3                   |
|                  | fac               | 8                   |
| VI               | s <sup>+</sup>    | 5                   |
|                  | s                 | 6                   |
| VII              | nic <sup>+</sup>  | 4                   |
|                  | nic               | 7                   |
| VIII             | ribo <sup>+</sup> | 5                   |
|                  | ribo              | 6                   |

\*Determinante compacto no grupo de ligação IV.

Tabela 12 - Análise mitótica do diplóide 5 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores        | Segregantes normais |
|------------------|-------------------|---------------------|
| I                | bi <sup>+</sup>   | 9                   |
|                  | bi                | 9                   |
| II               | w <sup>+</sup>    | 8                   |
|                  | w                 | 10                  |
| III              | gal <sup>+</sup>  | 4                   |
|                  | gal               | 14                  |
| IV               | pyro <sup>+</sup> | 11                  |
|                  | pyro              | 7                   |
| V                | fac <sup>+</sup>  | 9                   |
|                  | fac               | 9                   |
| VI               | s <sup>+</sup>    | 3                   |
|                  | s                 | 4                   |
| VII              | nic <sup>+</sup>  | 11                  |
|                  | nic               | 7                   |
| VIII             | ribo <sup>+</sup> | 4                   |
|                  | ribo              | 14                  |

Tabela 13 - Análise mitótica do diplóide 6 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores        | Segregantes normais |
|------------------|-------------------|---------------------|
| I                | bi <sup>+</sup>   | 16                  |
|                  | bi                | 8                   |
| II               | w <sup>+</sup>    | 2                   |
|                  | w                 | 22                  |
| III              | gal <sup>+</sup>  | 10                  |
|                  | gal               | 14                  |
| IV               | pyro <sup>+</sup> | 12                  |
|                  | pyro              | 12                  |
| V                | fac <sup>+</sup>  | 14                  |
|                  | fac               | 10                  |
| VI               | s <sup>+</sup>    | 10                  |
|                  | s                 | 2                   |
| VII              | nic <sup>+</sup>  | 9                   |
|                  | nic               | 15                  |
| VIII             | ribo <sup>+</sup> | 3                   |
|                  | ribo              | 21                  |

Tabela 14 - Análise mitótica do diplóide 7 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores        | Segregantes normais |
|------------------|-------------------|---------------------|
| I                | bi <sup>+</sup>   | 8                   |
|                  | bi                | 17                  |
| II               | w <sup>+</sup>    | 9                   |
|                  | w                 | 16                  |
| III              | gal <sup>+</sup>  | 17                  |
|                  | gal               | 8                   |
| IV               | pyro <sup>+</sup> | 10                  |
|                  | pyro              | 15                  |
| V                | fac <sup>+</sup>  | 2                   |
|                  | fac               | 23                  |
| VI               | s <sup>+</sup>    | 0                   |
|                  | s                 | 15 *                |
| VII              | nic <sup>+</sup>  | 7                   |
|                  | nic               | 18                  |
| VIII             | ribo <sup>+</sup> | 16                  |
|                  | ribo              | 9                   |

\*Determinante compacto no grupo de ligação VI.

Tabela 15 - Análise mitótica do diplóide 8 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores        | Segregantes normais |
|------------------|-------------------|---------------------|
| I                | bi <sup>+</sup>   | 25 *                |
|                  | bi                | 0                   |
| II               | w <sup>+</sup>    | 1                   |
|                  | w                 | 24                  |
| III              | gal <sup>+</sup>  | 9                   |
|                  | gal               | 16                  |
| IV               | pyro <sup>+</sup> | 15                  |
|                  | pyro              | 10                  |
| V                | fac <sup>+</sup>  | 20                  |
|                  | fac               | 5                   |
| VI               | s <sup>+</sup>    | **                  |
|                  | s                 |                     |
| VII              | nic <sup>+</sup>  | 11                  |
|                  | nic               | 14                  |
| VIII             | ribo <sup>+</sup> | 19                  |
|                  | ribo              | 6                   |

\*Determinante compacto no grupo de ligação I.

\*\*Dados não obtidos.

Tabela 16 - Análise mitótica do diplóide 9 // MSE

| Grupo de ligação | Marcadores        | Segregantes normais |
|------------------|-------------------|---------------------|
| I                | bi <sup>+</sup>   | 12                  |
|                  | bi                | 8                   |
| II               | w <sup>+</sup>    | 1                   |
|                  | w                 | 19                  |
| III              | gal <sup>+</sup>  | 16                  |
|                  | gal               | 4                   |
| IV               | pyro <sup>+</sup> | 0                   |
|                  | pyro              | 20*                 |
| V                | fac <sup>+</sup>  | 9                   |
|                  | fac               | 11                  |
| VI               | s <sup>+</sup>    | 9                   |
|                  | s                 | 11                  |
| VII              | nic <sup>+</sup>  | 5                   |
|                  | nic               | 15                  |
| VIII             | ribo <sup>+</sup> | 1                   |
|                  | ribo              | 19                  |

\*Determinante compacto no grupo de ligação IV.

Tabela 17 - Análise meiótica do diplóide 10 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores        | Segregantes normais |
|------------------|-------------------|---------------------|
| I                | bi <sup>+</sup>   | 16                  |
|                  | bi                | 8                   |
| II               | w <sup>+</sup>    | 0 *                 |
|                  | w                 | 24                  |
| III              | gal <sup>+</sup>  | 15                  |
|                  | gal               | 9                   |
| IV               | pyro <sup>+</sup> | 13                  |
|                  | pyro              | 11                  |
| V                | fac <sup>+</sup>  | 9                   |
|                  | fac               | 15                  |
| VI               | s <sup>+</sup>    | 1                   |
|                  | s                 | 10                  |
| VII              | nic <sup>+</sup>  | 11                  |
|                  | nic               | 13                  |
| VIII             | ribo <sup>+</sup> | 14                  |
|                  | ribo              | 10                  |

\*Determinante morfológico no grupo de ligação II.

Tabela 18 - Análise mitótica do diplóide 11 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores        | Segregantes normais |
|------------------|-------------------|---------------------|
| I                | bi <sup>+</sup>   | 11                  |
|                  | bi                | 18                  |
| II               | w <sup>+</sup>    | 0                   |
|                  | w                 | 29 *                |
| III              | gal <sup>+</sup>  | 22                  |
|                  | gal               | 7                   |
| IV               | pyro <sup>+</sup> | 11                  |
|                  | pyro              | 18                  |
| V                | fac <sup>+</sup>  | 16                  |
|                  | fac               | 13                  |
| VI               | s <sup>+</sup>    | 12                  |
|                  | s                 | 17                  |
| VII              | nic <sup>+</sup>  | 8                   |
|                  | nic               | 21                  |
| VIII             | ribo <sup>+</sup> | 14                  |
|                  | ribo              | 15                  |

\*Determinante compacto no grupo de ligação II.



Tabela 19 - Análise mitótica do diplóide 12//MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores                         | Segregantes normais |
|------------------|------------------------------------|---------------------|
| I                | pro <sup>+</sup> paba <sup>+</sup> | 16                  |
|                  | pro paba                           | 5                   |
| II               | w <sup>+</sup>                     | 1                   |
|                  | w                                  | 20                  |
| III              | gal <sup>+</sup>                   | 12                  |
|                  | gal                                | 9                   |
| IV               | pyro <sup>+</sup>                  | 11                  |
|                  | pyro                               | 10                  |
| V                | fac <sup>+</sup>                   | 0                   |
|                  | fac                                | 21*                 |
| VI               | s <sup>+</sup>                     | 13                  |
|                  | s                                  | 8                   |
| VII              | nic <sup>+</sup>                   | 15                  |
|                  | nic                                | 6                   |
| VIII             | ribo <sup>+</sup>                  | 10                  |
|                  | ribo                               | 11                  |

\*Determinante compacto no grupo de ligação V.

Tabela 20 - Análise mitótica do diplóide 13 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores                         | Segregantes normais |
|------------------|------------------------------------|---------------------|
| I                | pro <sup>+</sup> paba <sup>+</sup> | 24                  |
|                  | pro paba                           | 2                   |
| II               | w <sup>+</sup>                     | 11                  |
|                  | w                                  | 15                  |
| III              | gal <sup>+</sup>                   | 21                  |
|                  | gal                                | 5                   |
| IV               | pyro <sup>+</sup>                  | 25                  |
|                  | pyro                               | 1                   |
| V                | fac <sup>+</sup>                   | 0                   |
|                  | fac                                | 26*                 |
| VI               | s <sup>+</sup>                     | 18                  |
|                  | s                                  | 8                   |
| VII              | nic <sup>+</sup>                   | 21                  |
|                  | nic                                | 5                   |
| VIII             | ribo <sup>+</sup>                  | 22                  |
|                  | ribo                               | 4                   |

\*Determinante compacto no grupo de ligação V.

Tabela 21 - Análise mitótica do diplóide 14 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores                         | Segregantes normais |
|------------------|------------------------------------|---------------------|
| I                | pro <sup>+</sup> paba <sup>+</sup> | 7                   |
|                  | pro paba                           | 0*                  |
| II               | w <sup>+</sup>                     | 1                   |
|                  | w                                  | 6                   |
| III              | gal <sup>+</sup>                   | 1                   |
|                  | gal                                | 6                   |
| IV               | pyro <sup>+</sup>                  | 2                   |
|                  | pyro                               | 5                   |
| V                | fac <sup>+</sup>                   | 4                   |
|                  | fac                                | 3                   |
| VI               | s <sup>+</sup>                     | 6                   |
|                  | s                                  | 1                   |
| VII              | nic <sup>+</sup>                   | 0                   |
|                  | nic                                | 7*                  |
| VIII             | ribo <sup>+</sup>                  | 4                   |
|                  | ribo                               | 3                   |

\*Determinante compacto no grupo de ligação I e (ou) VII.

Tabela 22 - Análise mitótica do diplóide 15 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores                         | Segregantes normais |
|------------------|------------------------------------|---------------------|
| I                | pro <sup>+</sup> paba <sup>+</sup> | 16                  |
|                  | pro paba                           | 5                   |
| II               | w <sup>+</sup>                     | 5                   |
|                  | w                                  | 11                  |
| III              | gal <sup>+</sup>                   | 8                   |
|                  | gal                                | 13                  |
| IV               | pyro <sup>+</sup>                  | 11                  |
|                  | pyro                               | 10                  |
| V                | fac <sup>+</sup>                   | 6                   |
|                  | fac                                | 15                  |
| VI               | s <sup>+</sup>                     | 7                   |
|                  | s                                  | 14                  |
| VII              | nic <sup>+</sup>                   | 0                   |
|                  | nic                                | 21                  |
| VIII             | ribo <sup>+</sup>                  | 2                   |
|                  | ribo                               | 19                  |

\*Determinante compacto no grupo de ligação VII.

Tabela 23 - Análise mitótica do diplóide 16 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores                         | Segregantes normais |
|------------------|------------------------------------|---------------------|
| I                | pro <sup>+</sup> paba <sup>+</sup> | 13                  |
|                  | pro paba                           | 2                   |
| II               | w <sup>+</sup>                     | 11                  |
|                  | w                                  | 4                   |
| III              | gal <sup>+</sup>                   | 11                  |
|                  | gal                                | 4                   |
| IV               | pyro <sup>+</sup>                  | 0 *                 |
|                  | pyro                               | 15                  |
| V                | fac <sup>+</sup>                   | 11                  |
|                  | fac                                | 4                   |
| VI               | s <sup>+</sup>                     | 14                  |
|                  | s                                  | 1                   |
| VII              | nic <sup>+</sup>                   | 15 **               |
|                  | nic                                | 0                   |
| VIII             | ribo <sup>+</sup>                  | 15 **               |
|                  | ribo                               | 0                   |

\*Determinante compacto no grupo de ligação IV.

\*\*Determinante letal da linhagem MSE.

Tabela 24 - Análise mitótica do diplóide 17 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores                         | Segregantes normais |
|------------------|------------------------------------|---------------------|
| I                | pro <sup>+</sup> paba <sup>+</sup> | 12 *                |
|                  | pro paba                           | 0                   |
| II               | w <sup>+</sup>                     | 5                   |
|                  | w                                  | 7                   |
| III              | gal <sup>+</sup>                   | 7                   |
|                  | gal                                | 5                   |
| IV               | pyro <sup>+</sup>                  | 8                   |
|                  | pyro                               | 4                   |
| V                | fac <sup>+</sup>                   | 5                   |
|                  | fac                                | 7                   |
| VI               | s <sup>+</sup>                     | 7                   |
|                  | s                                  | 5                   |
| VII              | nic <sup>+</sup>                   | 9                   |
|                  | nic                                | 3                   |
| VIII             | ribo <sup>+</sup>                  | 4                   |
|                  | ribo                               | 8                   |

\*Determinante compacto no grupo de ligação I.

Tabela 25 - Análise mitótica do diplóide 18 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores                         | Segregantes normais |
|------------------|------------------------------------|---------------------|
| I                | pro <sup>+</sup> paba <sup>+</sup> | 10                  |
|                  | pro paba                           | 15                  |
| II               | w <sup>+</sup>                     | 0                   |
|                  | w                                  | 25 *                |
| III              | gal <sup>+</sup>                   | 20                  |
|                  | gal                                | 5                   |
| IV               | pyro <sup>+</sup>                  | 21                  |
|                  | pyro                               | 4                   |
| V                | fac <sup>+</sup>                   | 19                  |
|                  | fac                                | 6                   |
| VI               | s <sup>+</sup>                     | 10                  |
|                  | s                                  | 15                  |
| VII              | nic <sup>+</sup>                   | 10                  |
|                  | nic                                | 15                  |
| VIII             | ribo <sup>+</sup>                  | 0                   |
|                  | ribo                               | 25 *                |

\*Determinante compacto no grupo de ligação II e (ou) VIII.

Tabela 26 - Análise mitótica do diplóide 19 // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores                         | Segregantes normais |
|------------------|------------------------------------|---------------------|
| I                | pro <sup>+</sup> paba <sup>+</sup> | 5                   |
|                  | pro paba                           | 4                   |
| II               | w <sup>+</sup>                     | 2                   |
|                  | w                                  | 7                   |
| III              | gal <sup>+</sup>                   | 6                   |
|                  | gal                                | 3                   |
| IV               | pyro <sup>+</sup>                  | 9                   |
|                  | pyro                               | 0                   |
| V                | fac <sup>+</sup>                   | 5                   |
|                  | fac                                | 4                   |
| VI               | s <sup>+</sup>                     | 0                   |
|                  | s                                  | 9                   |
| VII              | nic <sup>+</sup>                   | 0                   |
|                  | nic                                | 9                   |
| VIII             | ribo <sup>+</sup>                  | 4                   |
|                  | ribo                               | 5                   |

\*Determinante compacto no grupo de ligação VI e (ou) VII.



Tabela 27 - Análise mitótica do diplóide 20 //MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores                         | Segregantes normais |
|------------------|------------------------------------|---------------------|
| I                | pro <sup>+</sup> paba <sup>+</sup> | 4                   |
|                  | pro paba                           | 7                   |
| II               | w <sup>+</sup>                     | 2                   |
|                  | w                                  | 9                   |
| III              | gal <sup>+</sup>                   | 6                   |
|                  | gal                                | 5                   |
| IV               | pyro <sup>+</sup>                  | 11                  |
|                  | pyro                               | 0 **                |
| V                | fac <sup>+</sup>                   | 0                   |
|                  | fac                                | 11 *                |
| VI               | s <sup>+</sup>                     | 8                   |
|                  | s                                  | 3                   |
| VII              | nic <sup>+</sup>                   | 5                   |
|                  | nic                                | 6                   |
| VIII             | ribo <sup>+</sup>                  | 9                   |
|                  | ribo                               | 2                   |

\*Determinante compacto no grupo de ligação V.

\*\*Determinante letal da linhagem MSE.

Os resultados da análise mitótica dos isolados compactos, constante nas Tabelas de nº 8 a 27, mostraram que todos os grupos de ligação, exceto o III, estão envolvidos com o caráter compacto. Uma idéia geral da distribuição dos determinantes compactos pelos diferentes grupos de ligação pode ser observada na Tabela 28.

Tabela 28 - Localização do determinante compacto de cada isolado, obtida através da análise mitótica.

| Isolado | Grupo de ligação | Observações                         |
|---------|------------------|-------------------------------------|
| 1       | II               |                                     |
| 2       | VII              |                                     |
| 3       | II - IV          |                                     |
| 4       | IV               |                                     |
| 5       | -                | nenhum grupo de ligação envolvido   |
| 6       | -                | poucos segregantes $w^+$ e $ribo^+$ |
| 7       | VI               | poucos segregantes $fac^+$          |
| 8       | I                |                                     |
| 9       | IV               | poucos segregantes $ribo^+$         |
| 10      | II               | poucos segregantes $s^+$            |
| 11      | II               | poucos segregantes $s^+$            |
| 12      | V                |                                     |
| 13      | V                |                                     |
| 14      | I - VII          |                                     |
| 15      | VII              |                                     |
| 16      | IV               | determinante letal no VII e VIII    |
| 17      | I                |                                     |
| 18      | II - VIII        |                                     |
| 19      | VI - VII         | determinante letal no IV            |
| 20      | V                | determinante letal no IV            |

#### 4.6.2. Análise meiótica

Através da análise genética pôde-se obter os dados de segregação meiótica e de ligação genética em relação a um marcador genético.

##### 4.6.2.1. Segregação meiótica

Os resultados de segregação meiótica foram obtidos por sementeira de uma amostra de ascósporos provenientes do cruzamento de cada derivado compacto com a linhagem MSE. As colônias segregantes foram classificadas em dois grupos: normal e compacto. A diferenciação entre os dois grupos foi baseada apenas na característica de crescimento. Os resultados de segregação meiótica estão resumidos na Tabela 29, analisados estatisticamente pelo teste  $X^2$  (PIMENTEL GOMES, 1966). O nível de significância adotado para rejeição ou não da hipótese nula é relativamente baixo em alguns casos. A adoção deste critério pode ser justificada pela dificuldade de discriminar o fenótipo compacto do normal em alguns casos, devido ao aparecimento de algumas classes intermediárias. Além disso, o crescimento mais rápido das colônias normais pode mascarar as colônias compactas, levando à sub-estimativa na frequência dos compactos.

Os resultados de segregação meiótica testados para a proporção 1:1 e que deram altamente significativos foram agora testados para a proporção de 2 normais: 1 compacto. Estes resultados se encontram na Tabela 30.

Tabela 29 - Segregação meiôtica dos cruzamentos de derivados compactos com a linhagem MSE.

| Isolado | Segregantes |           | Total | X <sup>2</sup> | Significância |
|---------|-------------|-----------|-------|----------------|---------------|
|         | normais     | compactos |       |                |               |
| 1       | 274         | 223       | 497   | 5,23           | *             |
| 2       | 137         | 162       | 299   | 2,09           | n.s.          |
| 3       | 173         | 123       | 296   | 8,45           | **            |
| 4       | 325         | 295       | 620   | 1,45           | n.s.          |
| 5       | 218         | 18        | 236   | 169,49         | ***           |
| 6       | 232         | 154       | 386   | 15,76          | ***           |
| 7       | 100         | 35        | 135   | 31,30          | ***           |
| 8       | 284         | 263       | 547   | 0,81           | n.s.          |
| 9       | 176         | 105       | 281   | 17,94          | ***           |
| 10      | 292         | 245       | 537   | 4,11           | *             |
| 11      | 200         | 211       | 411   | 0,29           | n.s.          |
| 12      | 197         | 211       | 408   | 0,48           | n.s.          |
| 13      | 203         | 183       | 386   | 1,04           | n.s.          |
| 14      | 136         | 166       | 302   | 2,98           | n.s.          |
| 15      | 121         | 153       | 274   | 3,74           | n.s.          |
| 16      | 170         | 175       | 345   | 0,07           | n.s.          |
| 17      | 280         | 135       | 415   | 50,66          | ***           |
| 18      | 364         | 189       | 553   | 55,38          | ***           |
| 19      | 387         | 216       | 603   | 48,49          | ***           |
| 20      | 543         | 308       | 851   | 64,89          | ***           |

X<sup>2</sup> - Testado para segregação 1:1.

n.s. - não significativo a 5%.

\* - Significativo a 5%.

\*\* - Significativo a 1%.

\*\*\* - Significativo a 0,1%.

Tabela 30 - Segregação meiôtica de derivados compactos com a linhagem MSE.  
Casos anômalos.

| Isolado | Segregantes |           | Total | $\chi^2$ | Significância |
|---------|-------------|-----------|-------|----------|---------------|
|         | normais     | compactos |       |          |               |
| 3       | 173         | 123       | 296   | 9,00     | *             |
| 5       | 218         | 18        | 236   | 70,17    | **            |
| 6       | 232         | 154       | 386   | 7,48     | *             |
| 7       | 100         | 35        | 135   | 3,33     | n.s.          |
| 9       | 176         | 105       | 281   | 2,05     | n.s.          |
| 17      | 280         | 135       | 415   | 0,12     | n.s.          |
| 18      | 364         | 189       | 553   | 0,18     | n.s.          |
| 19      | 387         | 216       | 603   | 1,68     | n.s.          |
| 20      | 543         | 308       | 851   | 3,13     | n.s.          |

$\chi^2$  - Testado para proporção 2:1.

n.s. - não significativo.

\* - Significativo a 1%.

\*\* - Significativo a 0,1%.

Pelos resultados de segregação meiótica, foi observado que os isolados compactos não apresentam um padrão de herança único. Podem ser caracterizados 3 tipos de segregação:

#### 1. Segregação 1:1

Neste caso se enquadram os isolados 1, 2, 4, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16. O caráter compacto segue um padrão de herança mendeliana simples.

#### 2. Segregação 2:1

Esta segregação é encontrada entre os isolados 3, 6, 7, 9, 17, 18, 19 e 20. Uma das classes compactas está ausente, devido possivelmente à existência de alterações estruturais cromossômicas.

#### 3. Herança citoplasmática

Neste caso se enquadra tipicamente o isolado 5 que não apresenta um padrão de herança regular. A análise mitótica também favorece a hipótese de herança não nuclear, pois os marcadores genéticos de todos os grupos de ligação segregam livremente. Os resultados com o teste do heterocáριο confirmam a herança citoplasmática, pois todos os conídios provenientes do heterocáριο 5 x MSE são de fenótipo normal, não surgindo o fenótipo do isolado 5.

#### 4.6.2.2. Ligação meiótica

A análise meiótica foi efetuada com uma amostragem casual de ascósporos resultante dos cruzamentos dos isolados compactos com a linhagem MSE. Os ascósporos foram inoculados em diversas placas mestras contendo meio

completo e posteriormente analisados quanto ao marcador genético do grupo de ligação apontado pela análise mitótica e também para alguns marcadores que apareceram em baixa frequência (ver Tabela 28). Os segregantes meióticos foram caracterizados em dois grupos, normais e compactos, a semelhança do item anterior. Os resultados da ligação meiótica se encontram sumarizados na Tabela 31.

Tabela 31 - Resultados de ligação genética dos cruzamentos dos derivados com pactos com a linhagem MSE.

| Isolado | Grupo de ligação | Marcador genético | Nº de ascósporos analisados | Ligação genética (%) | s (%) |
|---------|------------------|-------------------|-----------------------------|----------------------|-------|
| 1       | II               | w                 | 374                         | 34,20                | 2,45  |
| 2       | VII              | nic               | 288                         | 56,90                | 3,00  |
| 3*      | II               | w                 | 133                         | 37,60                | 4,47  |
|         | IV               | pyro              | 306                         | 53,90                | 2,83  |
| 4       | IV               | pyro              | 335                         | 51,60                | 2,65  |
| 6*      | II               | w                 | 75                          | 60,00                | 5,65  |
|         | VIII             | ribo              | 247                         | 52,60                | 3,16  |
| 7*      | V                | fac               | 92                          | 51,10                | 5,47  |
|         | VI               | s                 | 26                          | 25,00                | 8,49  |
| 8       | I                | bi                | 200                         | 43,50                | 3,46  |
| 9*      | IV               | pyro              | 189                         | 46,03                | 3,62  |
|         | VIII             | ribo              | 190                         | 21,47                | 3,00  |
| 10      | II               | w                 | 277                         | 55,60                | 3,00  |
| 11      | II               | w                 | 200                         | 35,50                | 3,32  |
| 12      | V                | fac               | 173                         | 32,95                | 3,60  |
| 13      | V                | fac               | 97                          | 28,87                | 4,58  |
| 14      | I                | pro               | 227                         | 41,85                | 3,30  |
|         |                  | paba              | 227                         | 45,37                | 3,16  |
|         | VII              | nic               | 227                         | 59,90                | 3,32  |
| 15      | VII              | nic               | 285                         | 30,53                | 2,70  |
| 16      | IV               | pyro              | 188                         | 41,49                | 3,60  |
| 17*     | I                | pro               | 214                         | 33,64                | 3,20  |
|         |                  | paba              | 214                         | 35,98                | 3,30  |
| 18*     | II               | w                 | 385                         | 52,47                | 2,45  |
|         | VIII             | ribo              | 175                         | 71,43                | 3,46  |
| 19*     | VI               | s                 | 278                         | 51,44                | 3,00  |
|         | VII              | nic               | 278                         | 52,52                | 4,36  |
| 20*     | V                | fac               | 419                         | 42,24                | 2,40  |

\*Segregação 2 normais : 1 compacto.



Os resultados apresentados na Tabela 31 mostraram que em alguns casos pôde ser detectada ligação genética em relação aos marcadores utilizados. Entretanto, na maioria dos casos, os valores de ligação genética se situam entre 30 - 40% o que indica uma fraca ligação; acima de 40% praticamente não se pode afirmar a existência de ligação. No caso do isolado 14, como a ligação meiótica não pode ser detectada com os marcadores do grupo de ligação I ou VII, não foi possível indicar a localização do determinante compacto.

Os isolados que apresentaram segregação de 2 normais: 1 compacto possuem dois grupos de ligação envolvidos com o caráter compacto de acordo com os resultados da análise genética (isolados nº 3, 6, 7, 9, 18 e 19), exceto os derivados 17 e 20 que apresentaram um único grupo de ligação.

#### 4.7. Análise genética dos setores de isolados instáveis

Devido ao fenômeno de instabilidade mitótica apresentado por alguns derivados compactos, foram isolados setores de alguns desses isolados instáveis. Foram analisados 7 setores provenientes de 3 isolados compactos, incluindo 2 do isolado nº 5 que apresenta características morfológicas com herança não mendeliana. Os setores foram designados pelo mesmo número do isolado original acrescido dos índices a, b ou c. Todos eles possuem crescimento melhorado e características morfológicas diferentes em relação ao tipo original.

Os setores isolados foram analisados geneticamente em cruzamentos com a linhagem MSE.

## 4.7.1. Análise mitótica

Os resultados da análise mitótica se encontram nas Tabelas de nº 32 a 36. Apenas os setores 13a e 13b não foram analisados por via mitótica devido à não haploidização dos respectivos diplóides em meio contendo cloroneb até a concentração de 40 µg/ml.

Tabela 32 - Análise mitótica do diplóide 5a // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores        | Setores normais |
|------------------|-------------------|-----------------|
| I                | bi <sup>+</sup>   | 9               |
|                  | bi                | 23              |
| II               | w <sup>+</sup>    | 12              |
|                  | w                 | 20              |
| III              | gal <sup>+</sup>  | 32              |
|                  | gal               | 0               |
| IV               | pyro <sup>+</sup> | 15              |
|                  | pyro              | 17              |
| V                | fac <sup>+</sup>  | 16              |
|                  | fac               | 16              |
| VI               | s <sup>+</sup>    | 9               |
|                  | s                 | 23              |
| VII              | nic <sup>+</sup>  | 17              |
|                  | nic               | 15              |
| VIII             | ribo <sup>+</sup> | 12              |
|                  | ribo              | 20              |

\*Determinante letal da linhagem MSE.

Tabela 33 - Análise mitótica do diplóide 5b // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores        | Setores normais |
|------------------|-------------------|-----------------|
| I                | bi <sup>+</sup>   | 37              |
|                  | bi                | 8               |
| II               | w <sup>+</sup>    | 12              |
|                  | w                 | 33              |
| III              | gal <sup>+</sup>  | 31              |
|                  | gal               | 14              |
| IV               | pyro <sup>+</sup> | 21              |
|                  | pyro              | 24              |
| V                | fac <sup>+</sup>  | 9               |
|                  | fac               | 36              |
| VI               | s <sup>+</sup>    | 15              |
|                  | s                 | 29              |
| VII              | nic <sup>+</sup>  | 30              |
|                  | nic               | 15              |
| VIII             | ribo <sup>+</sup> | 24              |
|                  | ribo              | 21              |

Tabela 34 - Análise mitótica do diplóide 7a // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores        | Setores normais |
|------------------|-------------------|-----------------|
| I                | bi <sup>+</sup>   | 8               |
|                  | bi                | 10              |
| II               | w <sup>+</sup>    | 7               |
|                  | w                 | 11              |
| III              | gal <sup>+</sup>  | 9               |
|                  | gal               | 9               |
| IV               | pyro <sup>+</sup> | 18              |
|                  | pyro              | 0               |
| V                | fac <sup>+</sup>  | 6               |
|                  | fac               | 12              |
| VI               | s <sup>+</sup>    | 1               |
|                  | s                 | 17*             |
| VII              | nic <sup>+</sup>  | 11              |
|                  | nic               | 7               |
| VIII             | ribo <sup>+</sup> | 12              |
|                  | ribo              | 6               |

\*Determinante morfológico no grupo de ligação VI.

Tabela 35 - Análise mitótica do diplóide 7b // MSE.

| Grupo de ligação | Marcadores        | Setores normais |
|------------------|-------------------|-----------------|
| I                | bi <sup>+</sup>   | 9               |
|                  | bi                | 8               |
| II               | w <sup>+</sup>    | 6               |
|                  | w                 | 11              |
| III              | gal <sup>+</sup>  | 12              |
|                  | gal               | 5               |
| IV               | pyro <sup>+</sup> | 17              |
|                  | pyro              | 0               |
| V                | fac <sup>+</sup>  | 8               |
|                  | fac               | 9               |
| VI               | s <sup>+</sup>    | 0               |
|                  | s                 | 17*             |
| VII              | nic <sup>+</sup>  | 7               |
|                  | nic               | 10              |
| VIII             | ribo <sup>+</sup> | 11              |
|                  | ribo              | 6               |

\*Determinante morfológico no grupo de ligação VI.

Tabela 36 - Análise mitótica do diplóide 7a // MSE.

| % Grupo de ligação | Marcadores        | Setores normais |
|--------------------|-------------------|-----------------|
| I                  | bi <sup>+</sup>   | 7               |
|                    | bi                | 4               |
| II                 | w <sup>+</sup>    | 4               |
|                    | w                 | 7               |
| III                | gal <sup>+</sup>  | 4               |
|                    | gal               | 7               |
| IV                 | pyro <sup>+</sup> | 11              |
|                    | pyro              | 0               |
| V                  | fac <sup>+</sup>  | 1               |
|                    | fac               | 10              |
| VI                 | s <sup>+</sup>    | 0               |
|                    | s                 | 11 *            |
| VII                | nic <sup>+</sup>  | 8               |
|                    | nic               | 3               |
| VIII               | ribo <sup>+</sup> | 9               |
|                    | ribo              | 2               |

\*Determinante morfológico no grupo de ligação VI.

## 4.7.2. Análise meiótica

## 4.7.2.1. Segregação meiótica

Os segregantes meióticos foram classificados em dois grupos principais: normais e morfológicos; nesta última classe foram considerados os segregantes com morfologia semelhante a do setor sob análise. Na maioria dos cruzamentos pôde ser distinguido um terceiro grupo de segregantes: a dos compactos, que possuem morfologia semelhante ao isolado compacto original.

Os resultados de segregação meiótica se encontram sumarizados na Tabela 37.

Tabela 37 - Segregação meiótica dos setores de derivados instáveis em cruzamentos com a linhagem MSE.

| Setor | Segregantes |              | Total | X <sup>2</sup> (+) |
|-------|-------------|--------------|-------|--------------------|
|       | normais     | morfológicos |       |                    |
| 7a    | 142         | 195          | 337   | 8,33**             |
| 7c    | 228         | 116          | 344   | 36,46***           |
| 13a   | 205         | 98           | 303   | 37,88***           |
| 13b   | 269         | 323          | 592   | 4,93*              |

(+) X<sup>2</sup> testado para a proporção 1:1.

\*Significativo a 5% de probabilidade.

\*\*Significativo a 1% de probabilidade.

\*\*\*Significativo a 0,1% de probabilidade.

Os valores de X<sup>2</sup> altamente significativo foram testados agora para a proporção de 2 normais: 1 compacto, resultando valores não significativos de 0,02 e 0,13 para os setores 7c e 13a, respectivamente. O valor do

$\chi^2$  para o setor 7a também é relativamente alto, entretanto, o segregante morfológico apresenta características semelhantes ao normal, após três dias de incubação, o que pode ter levado à uma sub-estimativa dos normais.

Todos os setores analisados apresentaram segregantes meióticos com morfologia semelhante aos respectivos tipos originais. No caso dos setores 7b e 13b, a frequência do fenótipo compacto é baixa (12,67% e 17,15%, respectivamente) enquanto que no caso de 7a a frequência é superior a 30%. Por outro lado, o setor 13a apresenta segregantes apenas dos tipos normal e compacto, provavelmente devido à dificuldade na identificação da morfologia de 13a que pode ser confundida com o tipo normal.

#### 4.7.2.2. Ligação meiótica

Os setores de derivados instáveis foram analisados meioticamente em relação aos marcadores dos grupos de ligação indicados pela análise mitótica (item 4.7.2.1.). Os setores 5a e 5b, à semelhança do tipo original não indicaram qualquer grupo de ligação envolvido com o caráter apresentado; desta forma os valores de ligação meiótica não foram ensaiados. Com relação aos setores 13a e 13b, a análise meiótica foi efetuada em relação à todos os marcadores genéticos devido a não realização da análise mitótica.

Os resultados obtidos com o teste de dois pontos se encontram resumidos na Tabela 38.

Os resultados da análise genética dos setores de derivados mostraram algumas alterações em relação aos tipos originais.



Tabela 38 - Resultados de ligação genética dos cruzamentos dos setores 7a e 7c com a linhagem MSE.

| Isolado | Grupo de ligação | Marcadores genéticos | Nº de ascósporos analisados | Ligação genética(%) | s (%) |
|---------|------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------|-------|
| 7a      | VI               | s                    | 61                          | 44,27               | 6,36  |
| 7c      | V                | fac                  | 144                         | 38,70               | 4,10  |
|         | VI               | s                    | 20                          | 45,00               | 11,12 |

Tabela 39 - Ligação meiótica do cruzamento 13a X MSE.

| Marcadores                | Segregantes |           | Tipos* |     |       | s (%) |
|---------------------------|-------------|-----------|--------|-----|-------|-------|
|                           | normais     | compactos | P      | R   | c     |       |
| pro <sup>+</sup><br>pro   | 52<br>26    | 43<br>14  | 66     | 69  | 66,67 | 4,30  |
| paba <sup>+</sup><br>paba | 61<br>43    | 39<br>18  | 79     | 82  | 60,93 | 3,30  |
| w <sup>+</sup><br>w       | 112<br>93   | **        | 93     | 112 | 54,63 | 3,50  |
| gal <sup>+</sup><br>gal   | 40<br>64    | 40<br>17  | 104    | 57  | 35,40 | 3,80  |
| pyro <sup>+</sup><br>pyro | 60<br>44    | 35<br>22  | 79     | 82  | 60,93 | 3,40  |
| fac <sup>+</sup><br>fac   | 3<br>101    | 24<br>33  | 125    | 36  | 22,36 | 3,30  |
| s <sup>+</sup><br>s       | 61<br>43    | 32<br>25  | 75     | 86  | 53,41 | 3,90  |
| nic <sup>+</sup><br>nic   | 46<br>58    | 33<br>24  | 91     | 70  | 43,48 | 3,90  |
| ribo <sup>+</sup><br>ribo | 50<br>54    | 29<br>28  | 83     | 78  | 48,45 | 3,30  |

\* P = Paternais; R = Recombinantes

\*\* Não distinguíveis

Tabela 40 - Ligação meiótica do cruzamento 13b X MSE.

| Marcadores        | Segregantes |             | Tipos* |     | c     | s(%) |
|-------------------|-------------|-------------|--------|-----|-------|------|
|                   | normais     | compactos** | P      | R   |       |      |
| pro <sup>+</sup>  | 51          | -           |        |     |       |      |
| pro               | 26          | -           | 51     | 26  | 33,77 | 5,30 |
| paba <sup>+</sup> | 44          | -           |        |     |       |      |
| paba              | 33          | -           | 44     | 33  | 42,85 | 5,60 |
| w <sup>+</sup>    | 134         | -           |        |     |       |      |
| w                 | 135         | -           | 135    | 134 | 49,81 | 2,00 |
| gal <sup>+</sup>  | 29          | -           |        |     |       |      |
| gal               | 48          | -           | 48     | 29  | 37,66 | 0,30 |
| pyro <sup>+</sup> | 46          | -           |        |     |       |      |
| pyro              | 31          | -           | 31     | 46  | 59,74 | 5,59 |
| fac <sup>+</sup>  | 15          | -           |        |     |       |      |
| fac               | 62          | -           | 62     | 15  | 19,48 | 4,51 |
| s <sup>+</sup>    | 48          | -           |        |     |       |      |
| s                 | 29          | -           | 29     | 48  | 62,33 | 6,99 |
| nic <sup>+</sup>  | 46          | -           |        |     |       |      |
| nic               | 31          | -           | 31     | 46  | 59,74 | 5,59 |
| ribo <sup>+</sup> | 40          | -           |        |     |       |      |
| ribo              | 37          | -           | 37     | 40  | 51,95 | 5,69 |

\* P = Paternais; R = Recombinantes

\*\* Não analisados

Os setores 5a e 5b, à semelhança do isolado 5, não apresentaram qualquer grupo de ligação envolvido com o caráter compacto desde que todos os grupos de ligação segregaram independentemente entre os recombinantes haplóides normais analisados. As alterações encontradas podem ser atribuídas à fatores de natureza citoplasmática.

Os setores 7a, 7b e 7c apresentaram em comum alterações no grupo de ligação VI, desde que segregantes haplóides normais  $\Delta^+$  quase não foram detectados na análise mitótica. Além do grupo de ligação VI, o setor 7c apresentou segregantes haplóides  $\Delta ac^+$  em baixa frequência (1:10) indicando que este grupo de ligação deve também estar envolvido com o caráter apresentado por 7c (Tabela 36). A análise meiótica de 7a mostrou que o determinante compacto do isolado 7, localizado a 25,00 unidades do marcador  $\Delta$  não se encontra mais nessa posição, mas à 44,27 unidades. O setor 7c por sua vez apresentou um determinante morfológico no grupo de ligação VI, numa localização semelhante à de 7a (45,0 unidades). Adicionalmente há ainda um segundo determinante no grupo de ligação V (38,70 unidades). A segregação meiótica encontrada foi de 2 normais : 1 compacto, sugerindo portanto, dois determinantes, ao passo que no caso de 7a foi de 1:1. Nos dois casos, de 7a e 7c, foram detectados o aparecimento do fenótipo compacto original.

A análise genética dos setores 13a e 13b apresentaram valores de ligação semelhantes em relação ao marcador  $\Delta ac$  do grupo de ligação V (22,38 e 19,48%, respectivamente). Os resultados de segregação meiótica encontrados indicam que no caso de 13a a proporção é de 2 normais : 1 compacto, ao passo que para 13b é de 1:1.

## 4.8. Respirometria

Os resultados de consumo de  $O_2$  de cada isolado compacto foram obtidos através do respirômetro de Warburg, num total de 420 minutos de operação com leituras em intervalos regulares de 60 minutos.

## 4.8.1. Calibração

Para medir o consumo de  $O_2$ , foi preciso inicialmente calibrar o conjunto manômetro + frasco de reação a fim de calcular o volume total de cada conjunto. O procedimento foi efetuado segundo BACILA (1960) e o volume final de cada conjunto se encontra na Tabela 41.

Tabela 41 - Volume do conjunto manômetro + frasco.

| Nº do conjunto | Frasco |         |        | Manômetro |         |        | Volume final |
|----------------|--------|---------|--------|-----------|---------|--------|--------------|
|                | T      | D       | Vol. 1 | T         | D       | Vol. 2 |              |
| 184-03         | 29,5   | 13,5230 | 17,00  | 28,50     | 13,5254 | 1,22   | 18,22        |
| 145-14         | 28,0   | 13,5266 | 17,00  | 29,50     | 13,5230 | 1,30   | 18,30        |
| 135-32         | 30,0   | 13,5217 | 17,27  | 30,00     | 13,5217 | 1,20   | 18,47        |
| 199-37         | 28,5   | 13,5254 | 16,52  | 28,50     | 13,5254 | 1,27   | 17,79        |
| 192-39         | 29,0   | 13,5242 | 17,27  | 29,50     | 13,5217 | 1,20   | 18,47        |

T = temperatura do Hg.

D = densidade do Hg.

Vol. = volume (em ml).

4.8.2. Constantes de  $O_2$ 

Calibrado o conjunto manômetro + frasco, foi calculado as constantes de  $O_2$  para cada conjunto, de acordo com BACILA (1960).

Tabela 42 - Constantes de  $O_2$  ( $kO_2$ ).

| Nº do conjunto | $kO_2$ ( $\mu l$ ) |
|----------------|--------------------|
| 184-03         | 1,39               |
| 145-14         | 1,40               |
| 135-32         | 1,41               |
| 199-37         | 1,35               |
| 192-39         | 1,38               |

4.8.3. Cálculo do consumo de  $O_2$ 

Obtido o valor de  $kO_2$ , este foi multiplicado pela variação encontrada nas leituras do manômetro, para obter-se o consumo de  $O_2$  em  $\mu l$ . Um exemplo do cálculo de consumo de  $O_2$ , efetuado de acordo com UMBREITT e Col. (1964), pode ser visto através da Tabela 43. Os resultados obtidos com os isolados compactos podem ser vistos no Apêndice e um sumário desses resultados se encontra na Tabela 44 e nas Figuras de nº 8 a 17. Como controle foi utilizada a linhagem *bí A<sub>1</sub>; meth A<sub>1</sub>*.

Tabela 43 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>.

| Tempo<br>(minutos) | TB  |     | Conjunto 145-14 |    |    |       | Conjunto 135-32 |     |    |        | Conjunto 199-37 |     |    |        | Conjunto 192-39 |     |    |        |
|--------------------|-----|-----|-----------------|----|----|-------|-----------------|-----|----|--------|-----------------|-----|----|--------|-----------------|-----|----|--------|
|                    | L   | V   | 1               | 2  | 3  | 4     | 1               | 2   | 3  | 4      | 1               | 2   | 3  | 4      | 1               | 2   | 3  | 4      |
| 0                  | 190 | 183 |                 |    |    | 184   |                 |     |    | 188    |                 |     |    | 193    |                 |     |    |        |
| 60                 | 197 | 7   | 176             | -7 | 14 | 19,60 | 172             | -12 | 19 | 26,19  | 182             | -6  | 13 | 17,55  | 183             | -10 | 17 | 23,46  |
| 120                | 210 | 20  | 176             | -7 | 27 | 37,80 | 171             | -13 | 33 | 46,53  | 182             | -6  | 26 | 35,10  | 182             | -11 | 31 | 42,78  |
| 180                | 213 | 23  | 174             | -9 | 32 | 44,80 | 158             | -26 | 49 | 69,09  | 177             | -11 | 34 | 45,90  | 174             | -19 | 42 | 57,96  |
| 240                | 232 | 42  | 182             | -1 | 43 | 60,20 | 158             | -26 | 68 | 95,88  | 177             | -11 | 53 | 71,55  | 178             | -15 | 57 | 78,66  |
| 300                | 241 | 51  | 186             | 3  | 48 | 67,20 | 157             | -27 | 78 | 109,98 | 177             | -11 | 62 | 83,70  | 178             | -15 | 66 | 91,08  |
| 360                | 242 | 52  | 183             | 0  | 52 | 72,80 | 149             | -35 | 87 | 122,67 | 169             | -19 | 71 | 95,85  | 172             | -21 | 73 | 100,74 |
| 420                | 243 | 53  | 176             | -7 | 60 | 84,00 | 140             | -44 | 97 | 136,17 | 160             | -28 | 81 | 109,35 | 163             | -30 | 83 | 114,54 |

L = Leitura do termobarômetro (TB); V = Variação do termobarômetro.

1 = Leitura no manômetro; 2 = Diferença de linhas no manômetro; 3 = Nº de linhas + ou - a variação do TB;

4 = µl O<sub>2</sub> consumido obtido multiplicando-se os números da coluna 3 pelo kO<sub>2</sub> (Tabela 42).

Tabela 44 - Consumo de O<sub>2</sub> total dos derivados compactos e da linhagem bi A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub>. Média de três repetições.

| Iso-<br>lado                               | Tempo (minutos) |       |        |        |        |        |        |
|--|-----------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
|  | 60              | 120   | 180    | 240    | 300    | 360    | 420    |
| 1  | 3,67            | 4,14  | 13,39  | 25,81  | 43,62  | 50,23  | 70,03  |
| 2  | 15,63           | 31,27 | 38,64  | 48,85  | 61,77  | 77,47  | 88,09  |
| 3  | 13,23           | 30,15 | 59,81  | 84,11  | 107,36 | 123,81 | 139,33 |
| 4  | 15,65           | 35,43 | 53,42  | 78,81  | 120,31 | 141,99 | 172,85 |
| 5  | 2,76            | 3,69  | 14,27  | 20,74  | 31,33  | 40,99  | 51,12  |
| 6  | 6,89            | 13,80 | 30,39  | 54,79  | 59,86  | 66,78  | 76,90  |
| 7  | 18,40           | 43,24 | 59,90  | 83,46  | 101,94 | 120,88 | 141,59 |
| 8  | 13,85           | 31,82 | 65,46  | 107,38 | 140,55 | 174,12 | 195,75 |
| 9  | 24,01           | 45,74 | 73,91  | 95,12  | 122,72 | 141,13 | 159,06 |
| 10   | 15,23           | 38,40 | 73,95  | 94,71  | 122,36 | 147,70 | 161,53 |
| 11   | 19,75           | 43,54 | 78,49  | 123,97 | 175,01 | 209,85 | 241,53 |
| 12   | 2,81            | 9,28  | 20,82  | 29,13  | 38,86  | 49,93  | 61,00  |
| 13   | 18,87           | 41,02 | 71,98  | 125,02 | 172,81 | 205,01 | 229,37 |
| 14   | 27,56           | 51,47 | 70,79  | 88,23  | 106,62 | 124,10 | 137,85 |
| 15   | 8,70            | 22,00 | 41,65  | 63,64  | 87,01  | 106,27 | 130,67 |
| 16   | 5,49            | 16,52 | 26,15  | 51,84  | 76,67  | 96,31  | 124,29 |
| 17   | 30,86           | 60,38 | 93,56  | 123,50 | 144,20 | 160,31 | 173,19 |
| 18   | 11,11           | 20,79 | 28,69  | 51,77  | 84,46  | 117,17 | 144,29 |
| 19   | 12,83           | 17,02 | 26,22  | 42,78  | 57,48  | 73,57  | 89,24  |
| 20   | 13,36           | 18,09 | 46,63  | 64,64  | 80,78  | 90,97  | 106,21 |
| bi A <sub>1</sub> ;<br>meth G <sub>1</sub> | 43,15           | 81,79 | 132,50 | 182,17 | 213,48 | 239,71 | 271,03 |

Tabela 45 - Análise estatística do consumo de  $O_2$  de derivados compactos e da linhagem *bi A<sub>1</sub>*; *meth G<sub>1</sub>*, após 420 minutos no respirômetro de Warburg.

| Fonte de variação | G.L. | S.Q.        | Q.M.       | F     |
|-------------------|------|-------------|------------|-------|
| Tratamentos       | 20   | 214031,1636 | 10701,5581 | 2,29* |
| Resíduo           | 42   | 47769,9023  | 4671,1285  |       |
| Total             | 62   | 261801,0659 |            |       |

C.V. = 22,5234

s = 68,3456

#### 4.8.4. Valores de $QO_2$

Os valores de  $QO_2$  representam o consumo de  $O_2$  em  $\mu l O_2/1h/10^5$  conídios e representam a média de 7 horas no respirômetro de Warburg. A porcentagem foi calculada assumindo-se o valor da linhagem normal (*bi A<sub>1</sub>*; *meth G<sub>1</sub>*) como 100%.



Tabela 46 - Valores de QO<sub>2</sub> dos isolados compactos e da linhagem *bi A<sub>1</sub>*; *meth G<sub>1</sub>*.

| Isolado   | QO <sub>2</sub> | %      |
|---|-----------------|--------|
| 1   | 10,00           | 25,83  |
| 2   | 12,58           | 32,49  |
| 3   | 19,90           | 51,39  |
| 4   | 24,69           | 63,76  |
| 5   | 7,30            | 18,85  |
| 6   | 10,99           | 28,38  |
| 7   | 20,23           | 52,25  |
| 8   | 27,96           | 72,21  |
| 9   | 22,72           | 58,68  |
| 10  | 23,08           | 59,61  |
| 11  | 34,50           | 89,10  |
| 12  | 8,71            | 22,49  |
| 13  | 32,77           | 84,63  |
| 14  | 19,69           | 50,85  |
| 15  | 18,67           | 48,22  |
| 16  | 17,76           | 45,87  |
| 17  | 24,74           | 53,89  |
| 18  | 20,61           | 53,23  |
| 19  | 12,75           | 32,93  |
| 20  | 15,17           | 39,18  |
| <i>bi A<sub>1</sub></i> ; <i>meth G<sub>1</sub></i> | 38,72           | 100,00 |

4.8.5. Correlação entre crescimento e consumo de O<sub>2</sub>

Com a finalidade de verificar se os isolados compactos de pequeno crescimento apresentavam paralelamente um menor consumo de O<sub>2</sub>, foi feita uma análise estatística através do teste de correlação (SNEDECOR; 1956).

Inicialmente foi efetuada um teste de correlação incluindo os valores de diâmetro médio da colônia e de consumo de O<sub>2</sub> (420 minutos) de todos os isolados compactos ( $r_{\text{geral}}$ ); numa análise seguinte os isolados compactos foram analisados em dois grupos distintos: do isolado 1 ao 11 (excluindo o 5 que é de origem citoplasmática) derivados da linhagem *bi A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub>* ( $r_1$ ), e um segundo grupo incluindo os isolados de nº 12 ao 20, derivados da linhagem *pro A<sub>1</sub>; paba A<sub>6</sub>; y A<sub>1</sub>* ( $r_2$ ). Desta forma foi possível observar também a influência de marcadores genéticos no consumo de O<sub>2</sub>.

Os valores do coeficiente de correlação encontrados para cada caso seguem abaixo:

|                    |           | <u>Significância</u> |
|--------------------|-----------|----------------------|
| $r_{\text{geral}}$ | = 0,5322  | significativo a 5%   |
| $r_1$              | = 0,5622  | não significativo    |
| $r_2$              | = -0,1638 | não significativo    |

Pelos valores de  $r$  encontrados, observa-se que no caso de  $r_{\text{geral}}$  isto é, abrangendo todos os isolados compactos mais a linhagem normal há uma correlação significativa a 5%. Entretanto, quando os isolados das linhagens *bi A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub>* e *pro A<sub>1</sub>; paba A<sub>6</sub>; y A<sub>1</sub>* foram analisados em grupos distintos os valores de  $r$  não são significativos. No caso do coeficiente de correlação  $r_1$ , principalmente o valor de correlação é alto, mas sua não

significância pode ser atribuída ao pequeno número de amostras analisadas o que reduziu consideravelmente o nº de graus de liberdade. Pode-se, entretanto, observar que há uma certa tendência para correlação positiva. No caso de  $r_2$ , o coeficiente de correlação é baixo e não significativo, com tendência a ser negativo.

#### 4.8.6. Glicose residual

##### 4.8.6.1. Construção da reta padrão de glicose

Foi utilizado o método da antrona para dosagem de glicose (BACILA, 1960). A reta padrão foi feita com diferentes concentrações de glicose: 20, 40, 60 e 80  $\mu\text{g/ml}$ . A leitura da densidade óptica foi feita em fotolorímetro Klett-Summerson com filtro verde (540  $\text{m}\mu$ ). A calibração foi feita com água destilada e a concentração 0 corresponde à do reagente de antrona sem adição de glicose. A leitura das diferentes concentrações de glicose foi posteriormente corrigida subtraindo-se pela leitura da concentração 0. O colorímetro Klett-Summerson tem uma escala graduada em unidades proporcionais à densidade óptica. A fórmula que relaciona a leitura da escala e densidade óptica é:

$$\text{Densidade óptica} = \frac{2 \cdot (\text{Leitura})}{1.000}$$

Os valores de densidade óptica das diferentes concentrações de glicose podem ser vistas na Tabela 47 e Figura 18.

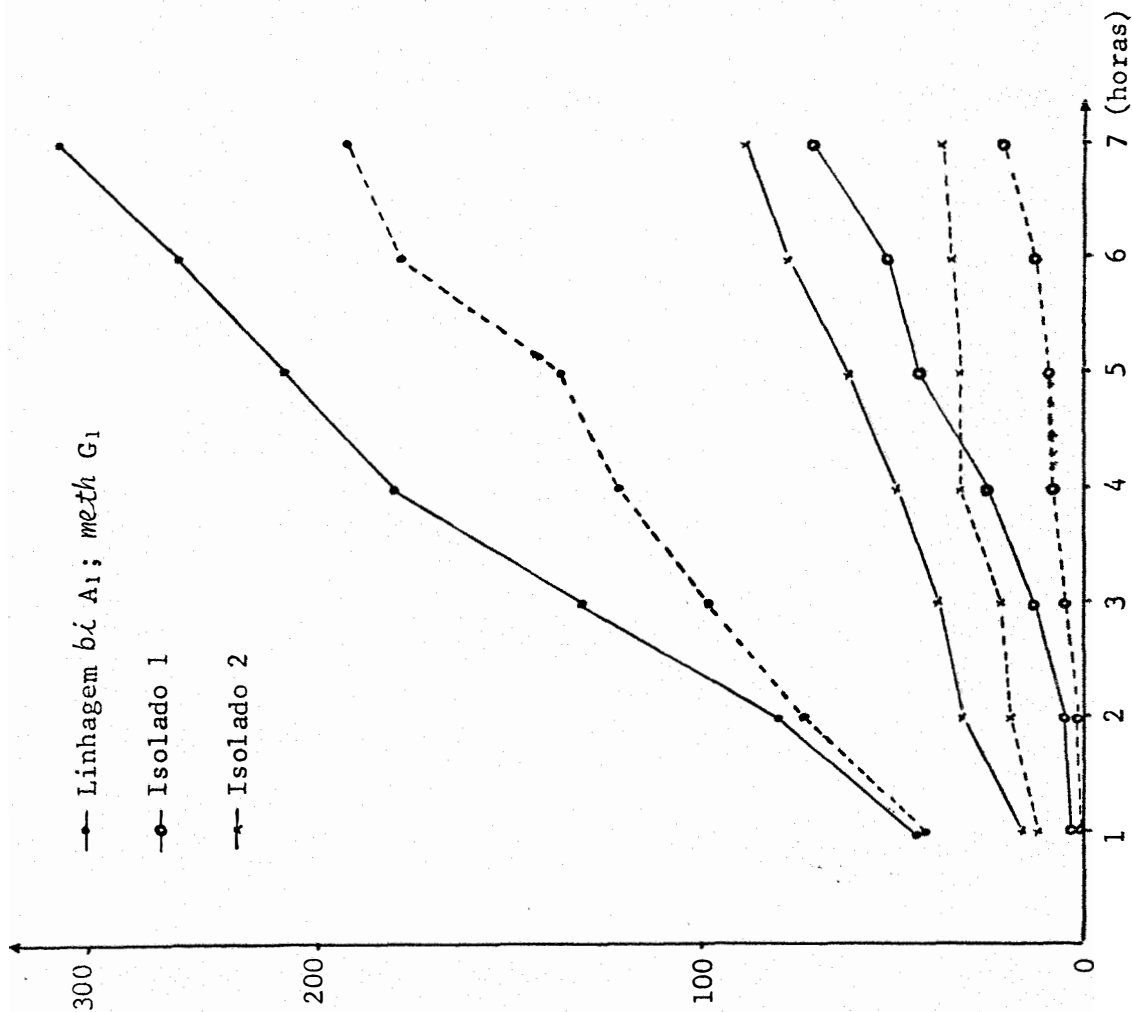


Figura 8 - Consumo de  $O_2$  da linhagem  $b_1 A_1$ ; meth  $G_1$  e dos isolados 1 e 2.

—●— Consumo de  $O_2$  total.  
 - - - x - - - Endógeno.

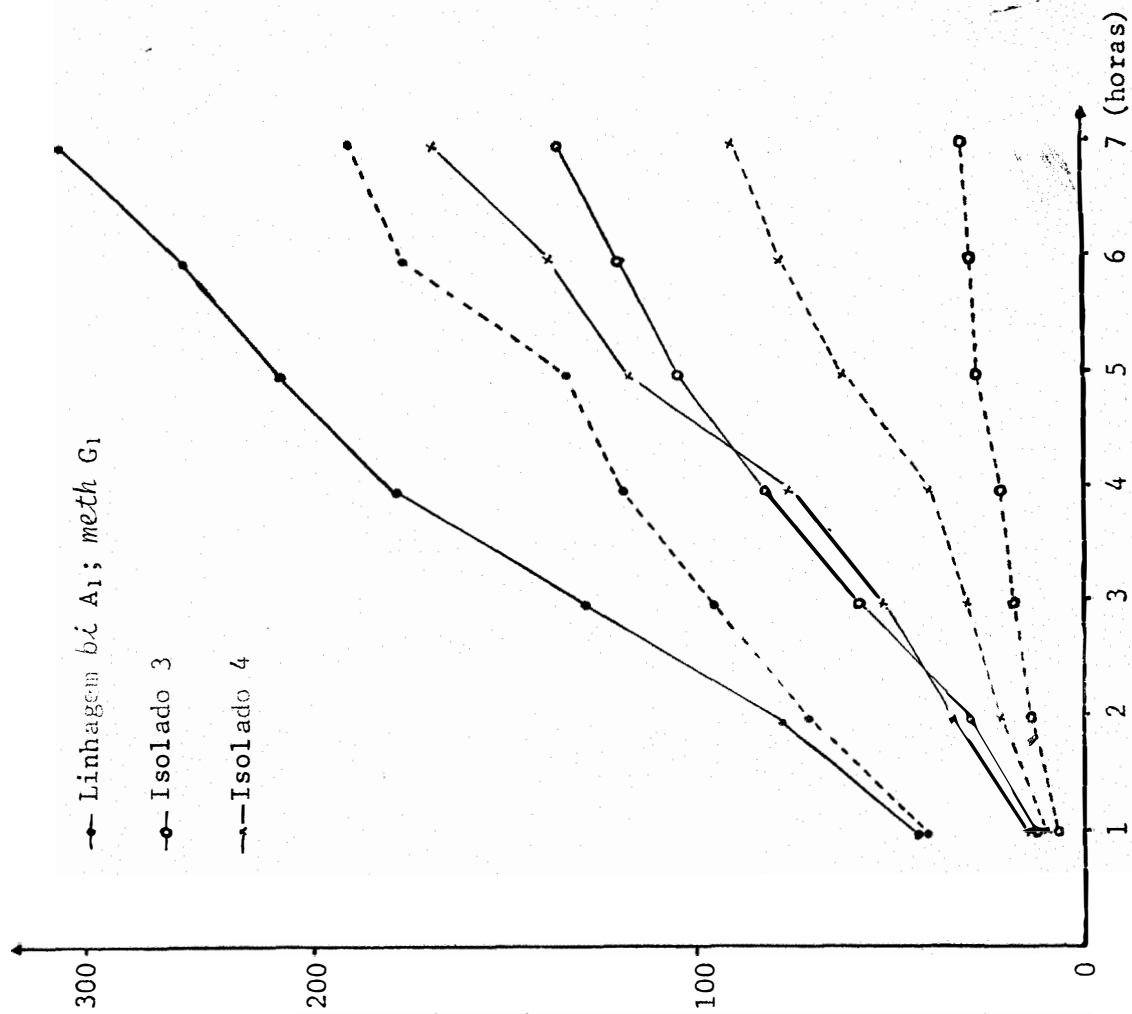


Figura 9 - Consumo de  $O_2$  da linhagem  $b_1 A_1$ ; meth  $G_1$  e dos isolados 3 e 4.

—●— Consumo de  $O_2$  total.  
 - - - x - - - Endógeno.

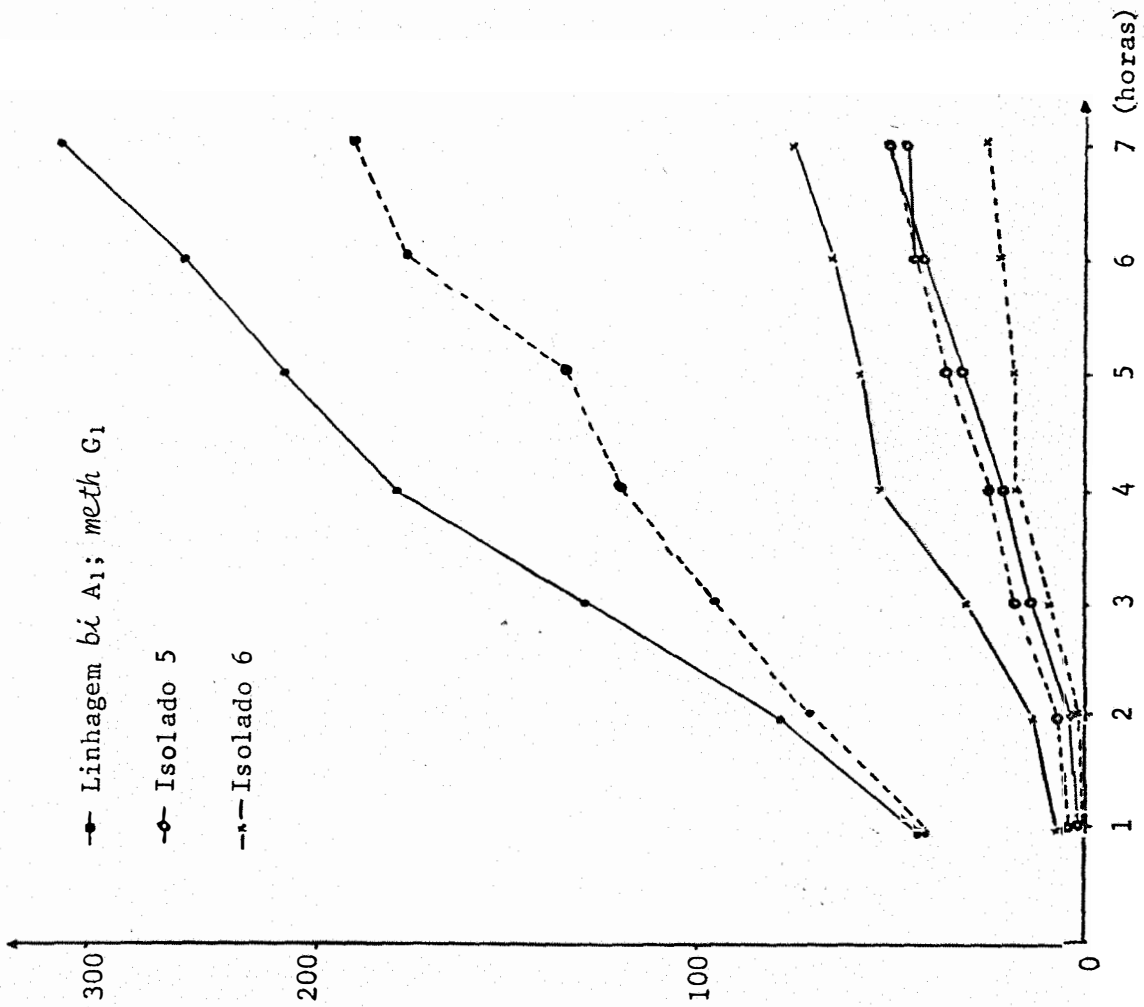


Figura 10 - Consumo de O<sub>2</sub> da linhagem bí A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub> e dos isolados 5 e 6.

—●— Consumo de O<sub>2</sub> total.  
 —x— Endógeno.

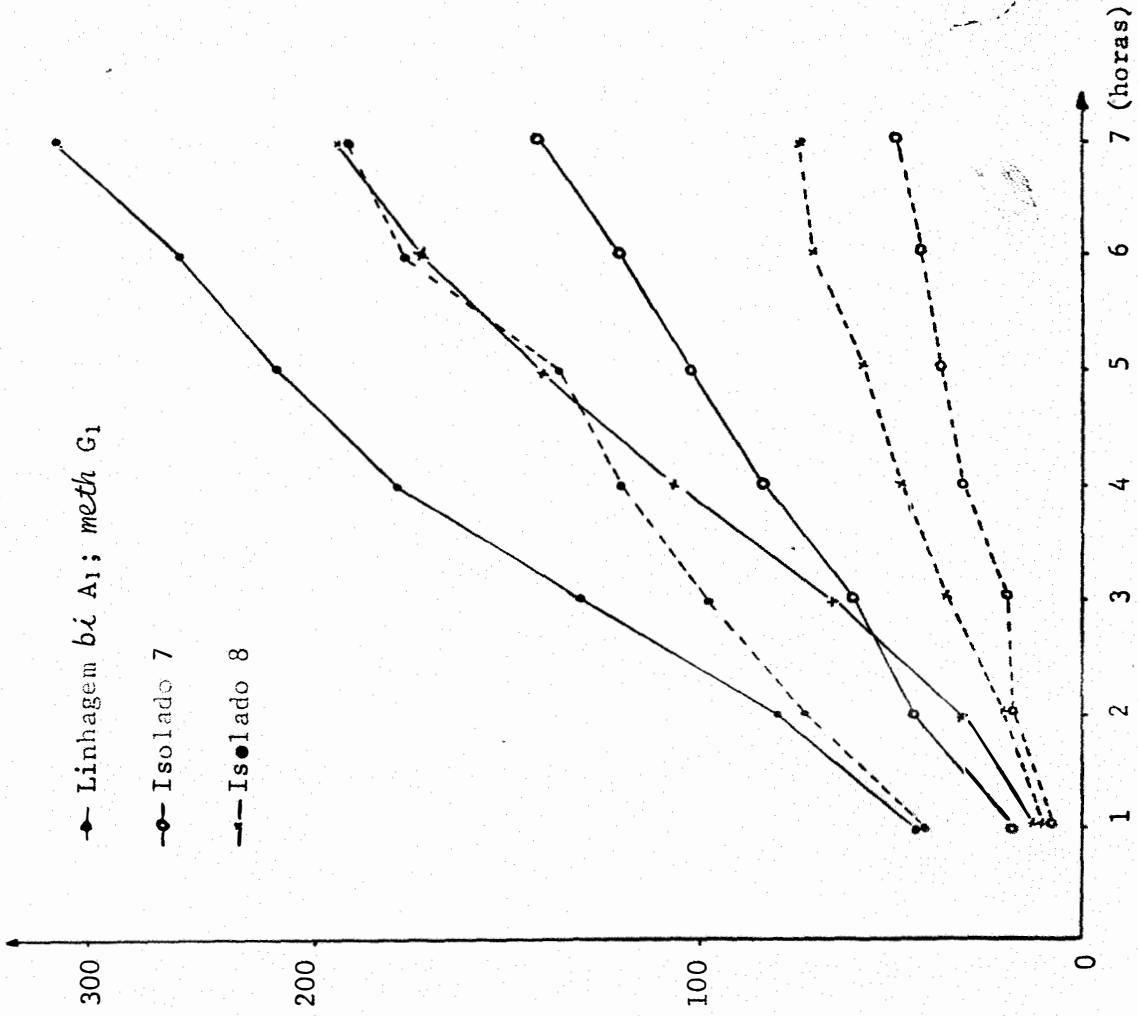


Figura 11 - Consumo de O<sub>2</sub> da linhagem bí A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub> e dos isolados 7 e 8.

—●— Consumo de O<sub>2</sub> total.  
 —x— Endógeno.

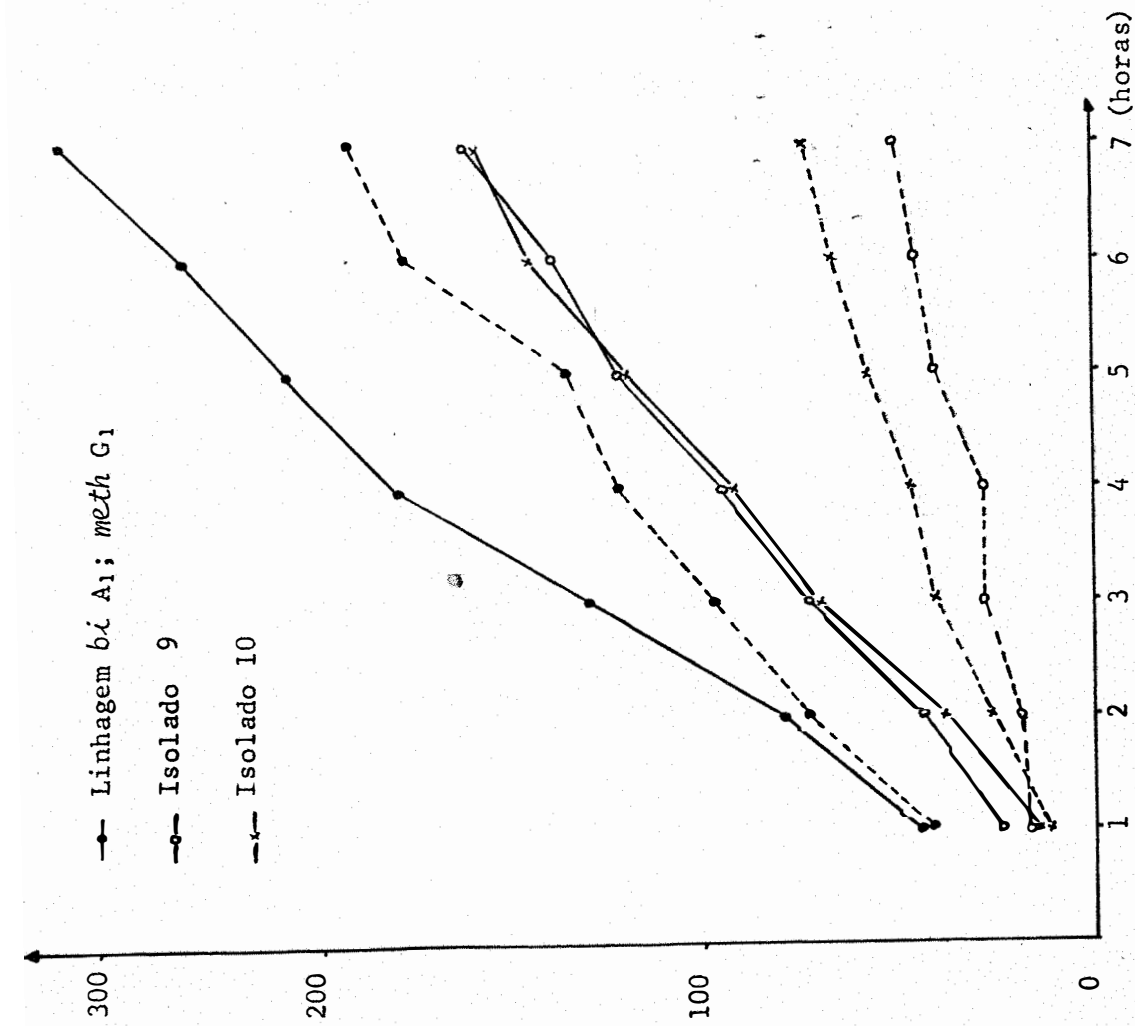


Figura 12 - Consumo de O<sub>2</sub> da linhagem b<sub>1</sub> A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub> e dos isolados 9 e 10.

—●— Consumo de O<sub>2</sub> total.  
 --- Endógeno.

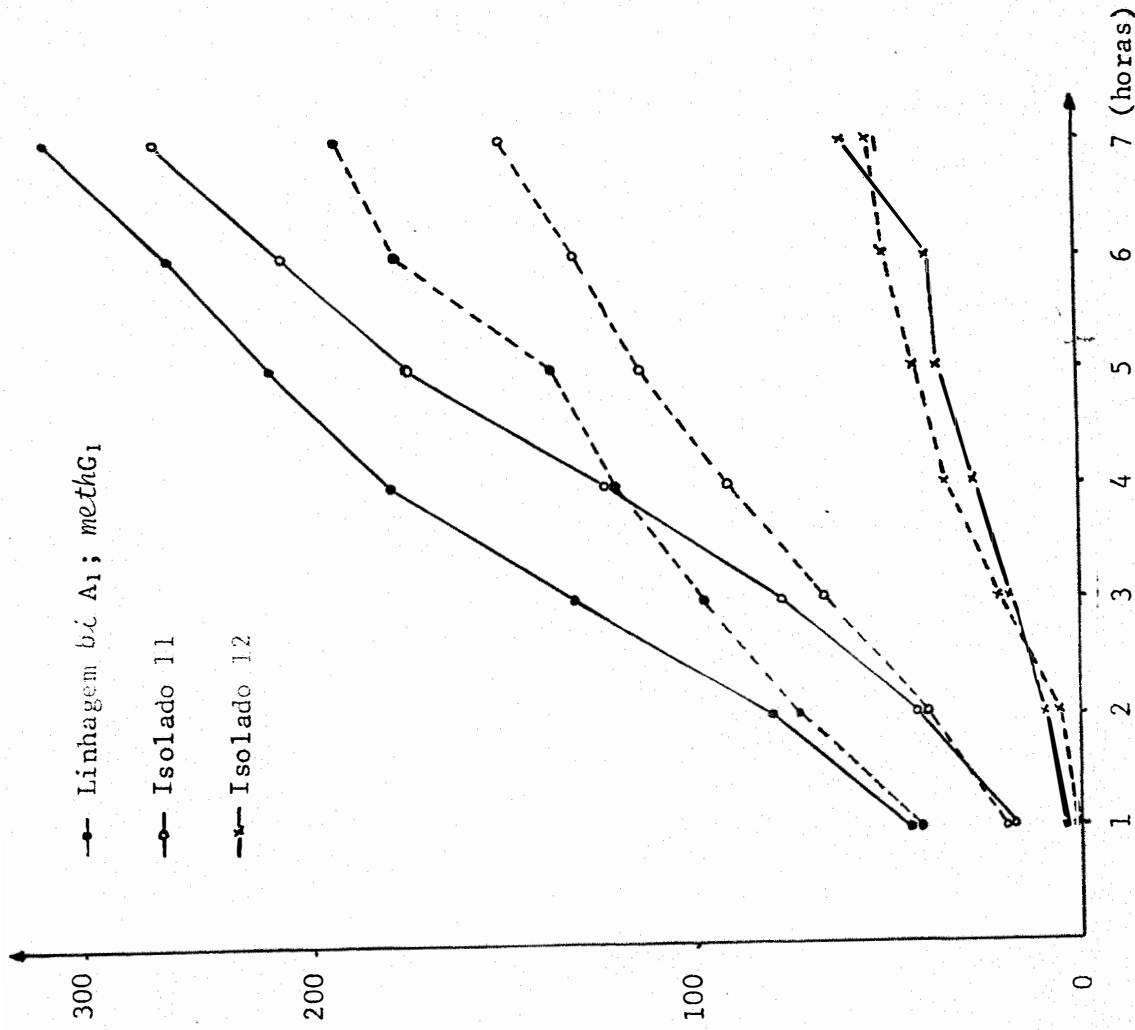


Figura 13 - Consumo de O<sub>2</sub> da linhagem b<sub>1</sub> A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub>

—●— Consumo de O<sub>2</sub> total.  
 --- Endógeno.

Consumo de O<sub>2</sub> (μl)

● Linhagens bí A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub>  
○ Isolado 13  
x Isolado 14

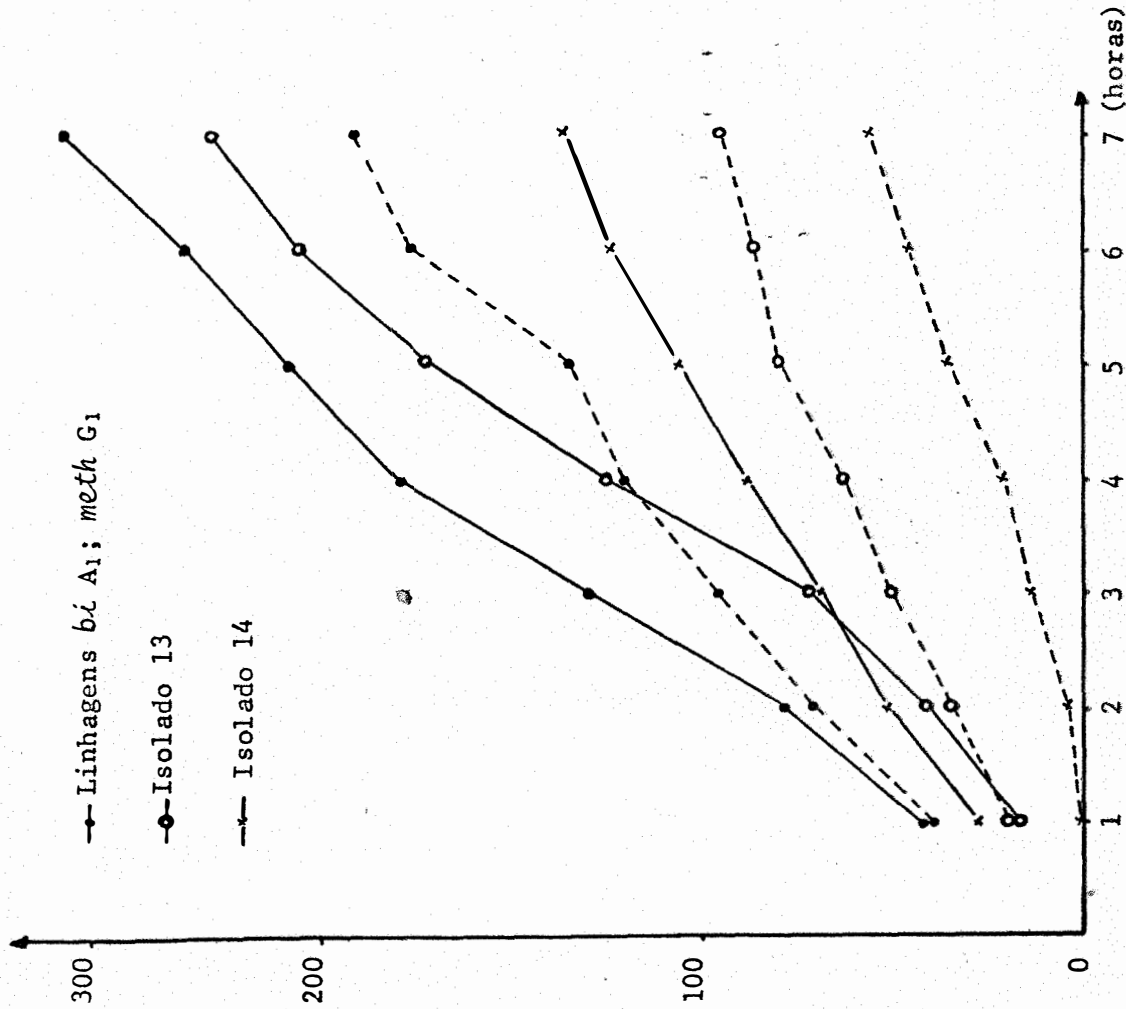


Figura 14 - Consumo de O<sub>2</sub> da linhagem bí A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub> e dos derivados 13 e 14.

— Consumo de O<sub>2</sub> total.  
- - - Endógeno.

Consumo de O<sub>2</sub> (μl)

● Linhagens bí A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub>  
○ Isolado 15  
x Isolado 16

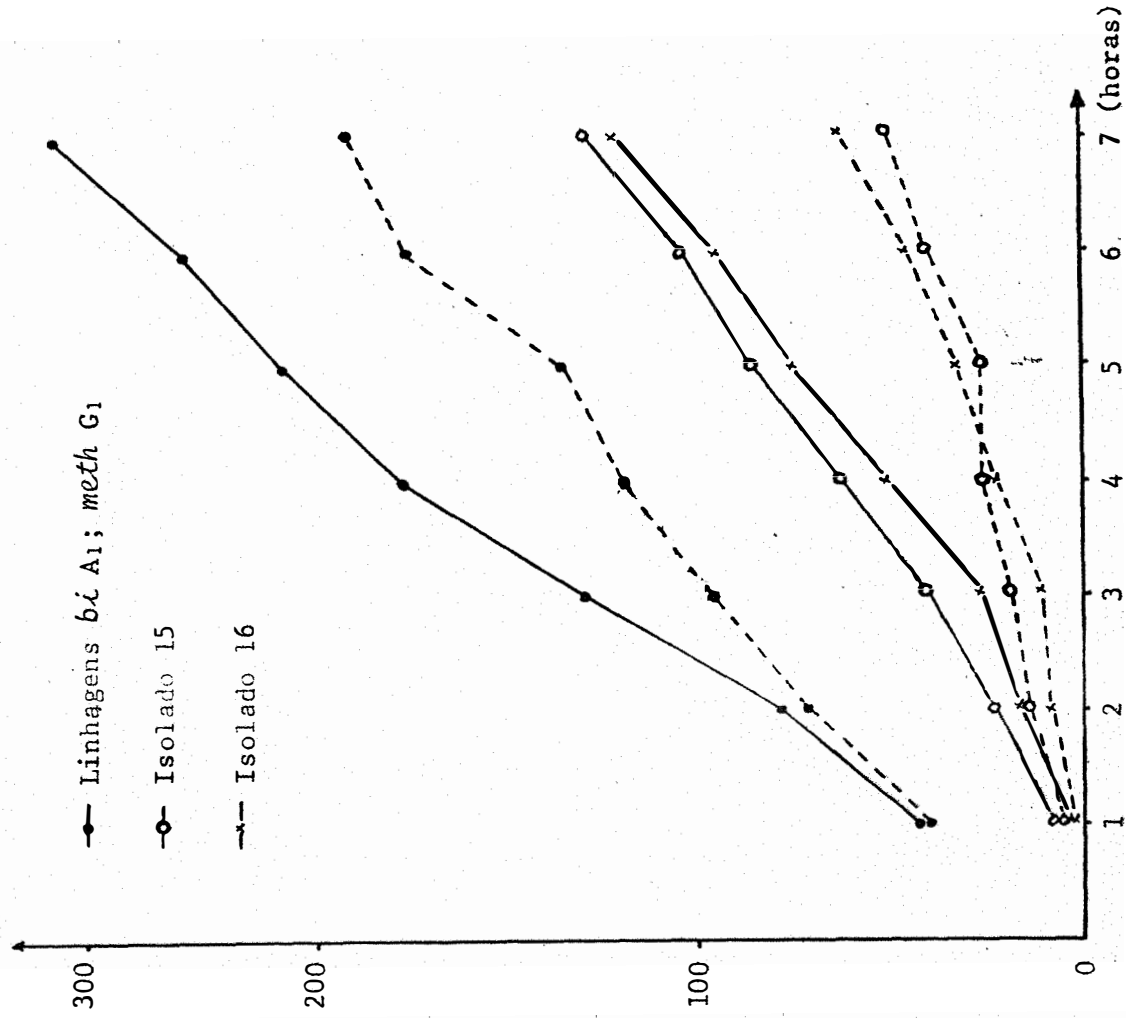


Figura 15 - Consumo de O<sub>2</sub> da linhagem bí A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub> e dos derivados 15 e 16.

— Consumo de O<sub>2</sub> total.  
- - - Endógeno.

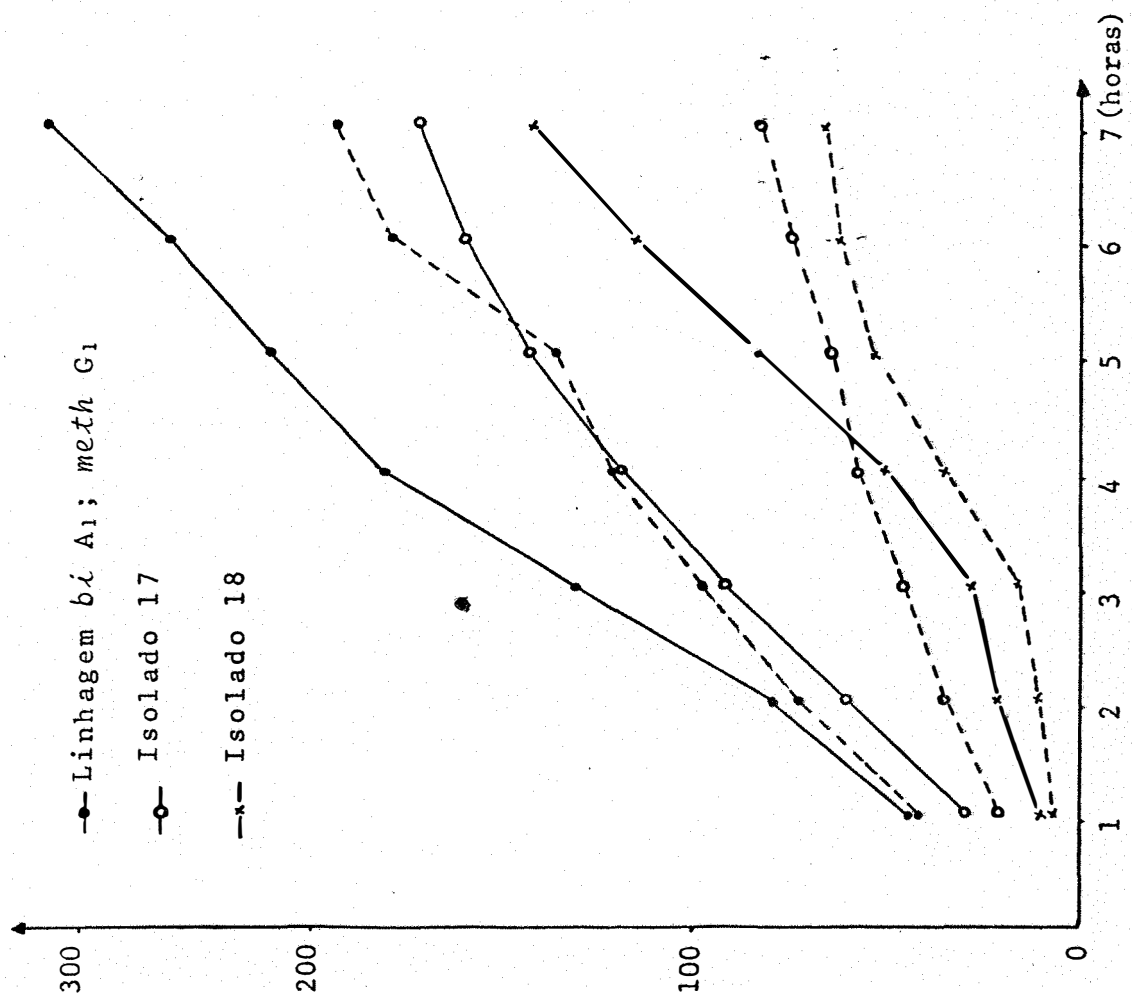


Figura 16 - Consumo de O<sub>2</sub> da linhagem *b1 A1* e dos isolados 17 e 18.

—●— Consumo de O<sub>2</sub> total.  
 --- Endógeno.

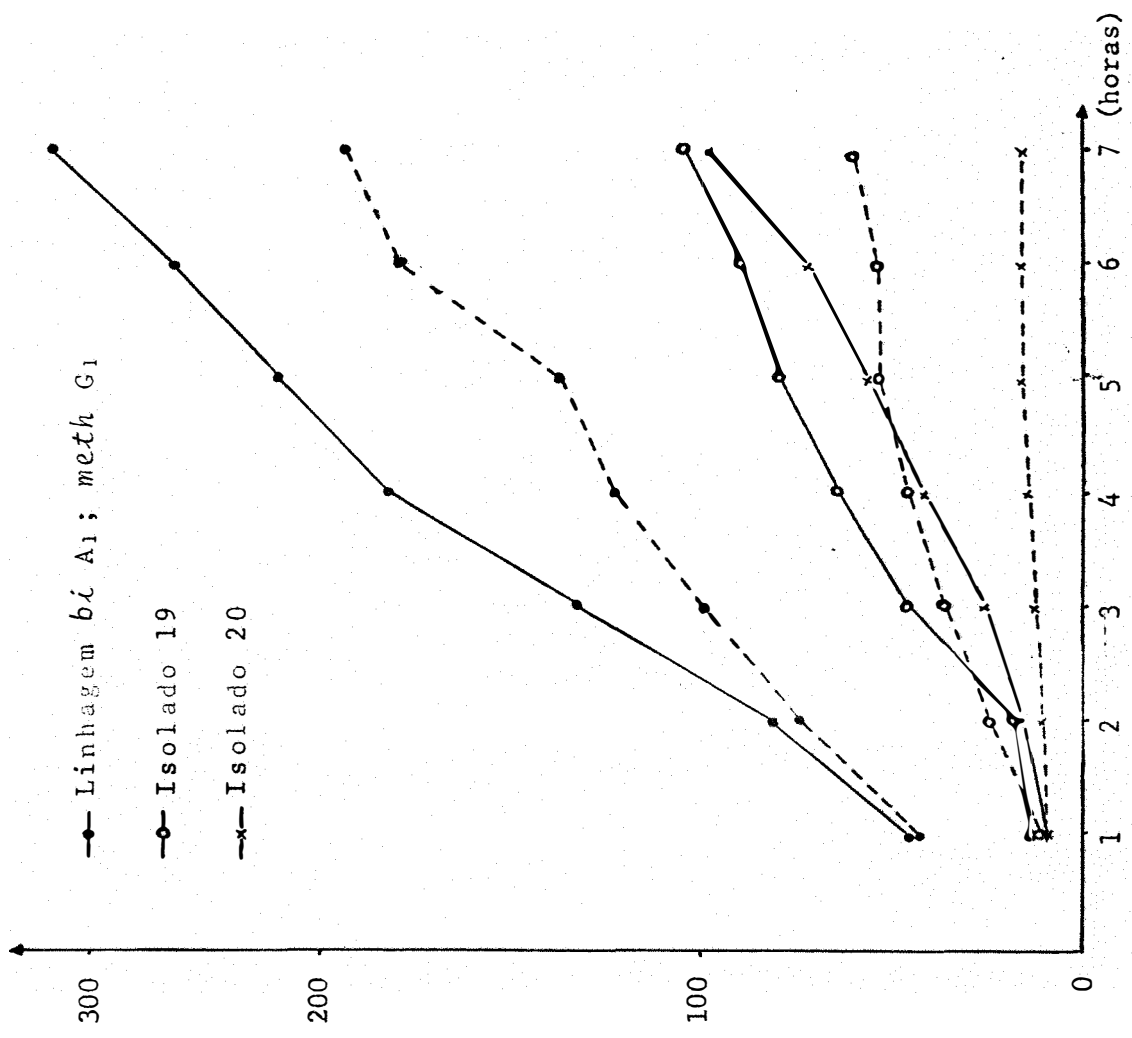


Figura 17 - Consumo de O<sub>2</sub> da linhagem *b1 A1; meth G1* e dos isolados 19 e 20.

—●— Consumo de O<sub>2</sub> total.  
 --- Endógeno.



Tabela 47 - Densidade óptica de diferentes concentrações de glicose.

| Concentração<br>µg/ml | Leitura | Leitura<br>corrigida | Densidade<br>óptica |
|-----------------------|---------|----------------------|---------------------|
| 0                     | 56      | -                    | -                   |
| 20                    | 427     | 371                  | 0,742               |
| 40                    | 600     | 544                  | 1,088               |
| 60                    | 850     | 794                  | 1,588               |
| 80                    | 930     | 874                  | 1,748               |

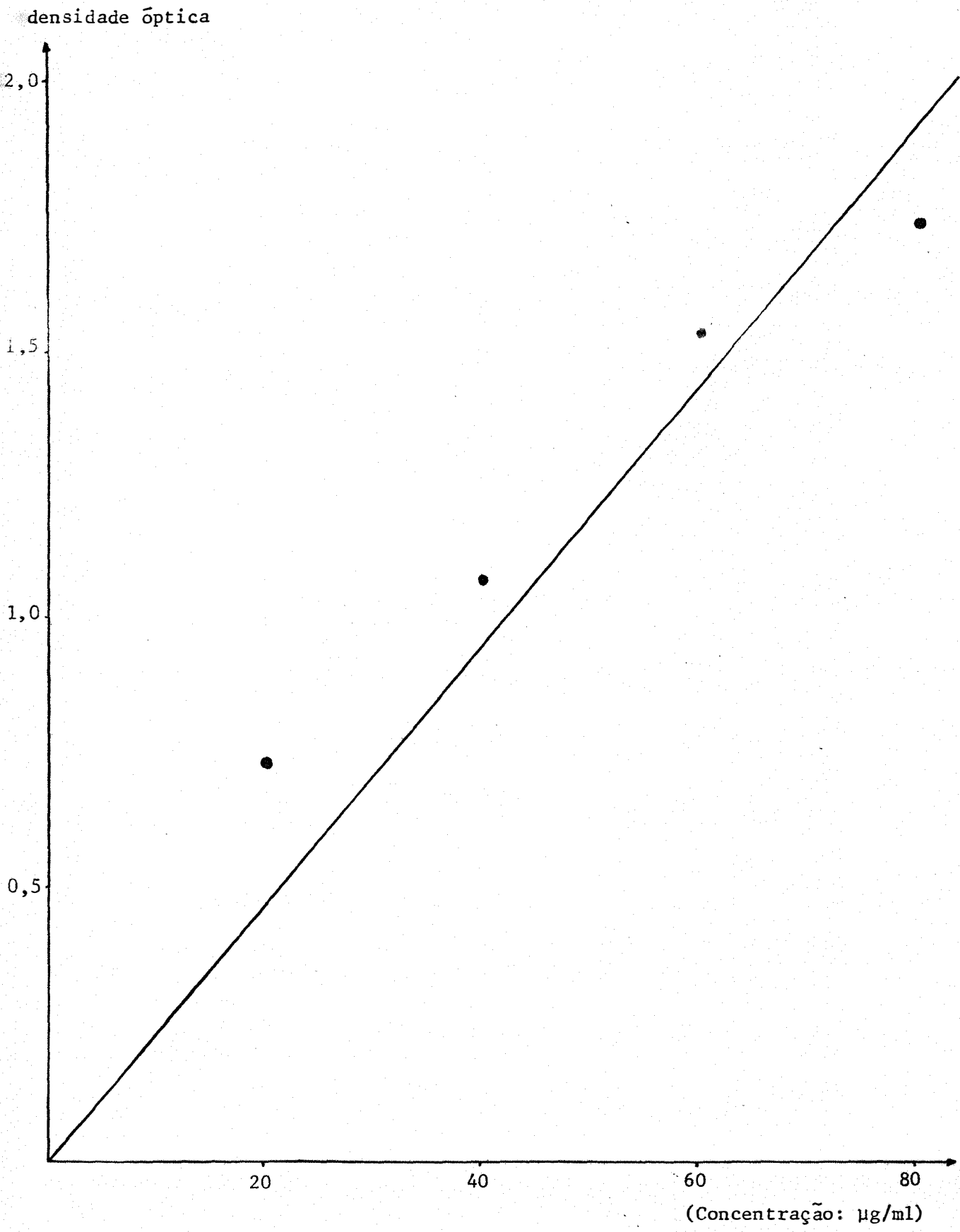


Figura 18 - Reta padrão de glicose.

#### 4.8.6.2. Consumo de glicose

Aos frascos de reação do aparelho de Warburg foi adicionado glicose em quantidade conhecida (360  $\mu\text{g}$ ) e dosando-se a glicose residual foi possível estimar a quantidade de açúcar consumida após 420 minutos de operação.

Os resultados de consumo de glicose se encontram na Tabela 48 e representam a média de três repetições.

#### 4.8.7. Assimilação oxidativa

A porcentagem de assimilação oxidativa foi calculada através da relação:

$$\text{Assimilação oxidativa} = \frac{\text{consumo } O_2 \text{ esperado} - \text{consumo } O_2 \text{ observado}}{\text{consumo } O_2 \text{ esperado}} \times 100$$

O consumo de  $O_2$  esperado foi calculado assumindo-se que todo açúcar foi completamente oxidado a  $CO_2$  e  $H_2O$ , ou seja:



Através dessa reação 6 moléculas de  $O_2$  são necessárias para oxidar uma unidade de glicose. Como se conhece a quantidade de glicose consumida, pode-se calcular o volume de  $O_2$  para oxidação total do substrato.

Na Tabela 48 encontram-se os resultados de assimilação oxidativa para cada isolado compacto e de uma linhagem normal (*bi A<sub>1</sub>*; *meth G<sub>1</sub>*), bem como a glicose consumida e o consumo de  $O_2$  esperado. Os resultados de consumo de  $O_2$  observado são os mesmos da Tabela 44 (420 minutos) tendo-se agora subtraído o valor da respiração endógena, considerando-se que o nível da respiração endógena permanece o mesmo com adição de glicose.

Tabela 48 - Assimilação oxidativa dos derivados compactos e da linhagem *bi A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub>*, após 420 minutos no respirômetro de Warburg.

| Iso-<br>lado | Consumo de glicose* |      | Consumo de O <sub>2</sub><br>esperado(μl) | Consumo de O <sub>2</sub><br>observado<br>(μl) | Assimilação<br>oxidativa<br>(%) |
|--------------|---------------------|------|---|--|---------------------------------|
|              | μg                  | μM   |   |  |                                 |
| 1            | 326,0               | 1,81 | 243,26                                    | 49,03  | 79,84                           |
| 2            | 334,0               | 1,85 | 248,64                                    | 53,09  | 78,65                           |
| 3            | 321,0               | 1,75 | 239,23                                    | 105,73   | 55,80                           |
| 4            | 332,5               | 1,84 | 247,30                                    | 79,05  | 68,03                           |
| 5            | 328,0               | 1,82 | 244,60                                    | 4,92   | 97,99                           |
| 6            | 338,5               | 1,88 | 252,67                                    | 51,70  | 79,54                           |
| 7            | 357,0               | 1,98 | 266,11                                    | 92,59  | 65,21                           |
| 8            | 352,0               | 1,95 | 262,08                                    | 121,55   | 53,62                           |
| 9            | 357,5               | 1,99 | 267,46                                    | 107,26   | 59,90                           |
| 10           | 359,0               | 1,99 | 267,46                                    | 85,83  | 67,91                           |
| 11           | 337,0               | 1,87 | 251,33                                    | 90,33  | 64,06                           |
| 12           | 300,5               | 1,67 | 224,45                                    | 5,00   | 97,77                           |
| 13           | 282,5               | 1,57 | 211,01                                    | 134,17   | 36,41                           |
| 14           | 321,5               | 1,79 | 240,58                                    | 81,85  | 65,98                           |
| 15           | 294,0               | 1,63 | 219,07                                    | 80,27  | 63,36                           |
| 16           | 294,0               | 1,63 | 219,07                                    | 79,29  | 63,81                           |
| 17           | 333,5               | 1,85 | 248,64                                    | 89,19  | 64,13                           |
| 18           | 294,5               | 1,64 | 220,42                                    | 77,09  | 65,02                           |
| 19           | 300,0               | 1,67 | 224,45                                    | 72,44  | 67,72                           |
| 20           | 319,5               | 1,77 | 237,89                                    | 46,01  | 80,66                           |
| Normal       | 354,0               | 1,97 | 264,77                                    | 70,83  | 73,25                           |

\*Glicose inicial = 360 μg.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Isolamento e caracterização dos mutantes compactos

Os diversos mutantes isolados no decorrer deste trabalho foram resultantes do tratamento de conídios de linhagens normais com luz ultra-violeta e nitrosoguanidina. Não se manteve nenhum limite de sobrevivência para se proceder ao isolamento e eles foram isolados independentemente do tratamento utilizado. Entretanto, a maior parte dos isolados é proveniente dos tratamentos com menor porcentagem de sobrevivência, desde que os tratamentos mais drásticos ofereciam maior frequência de derivados compactos.

Os vinte mutantes isolados, numerados de nº 1 a 20 podem ser agrupados em dois tipos de crescimento: restrito e lento. No caso de crescimento restrito, ou seja, onde após um determinado tempo quase não se verifica aumento no tamanho da colônia, enquadram-se os isolados: 1, 2, 3, 4, 9, 12, 14, 15, 17 e 18. Os demais casos, podem ser incluídos entre os mutantes morfológicos de crescimento lento. Apesar dessa diferença, todos eles serão aqui tratados simplesmente como mutantes compactos.

Além do reduzido crescimento observado entre os mutantes compactos, as características gerais da colônia são também profundamente alteradas. Há uma reduzida conidiação, a coloração do micélio varia desde o cinza até púrpura escuro e a colônia apresenta enrugamento em vários graus. Algumas dessas diferenças podem ser vistas nas Figuras 4, 6 e 7.

## 5.2. Análise genética dos mutantes compactos

De acordo com os resultados obtidos com a análise genética podem ser caracterizados três grupos de mutantes compactos distintos ou sejam: os que apresentam segregação de 1:1; os de segregação 2:1 e o mutante citoplasmático.

### 5.2.1. Mutantes que apresentaram modelo de segregação 1:1

Neste grupo foram incluídos os isolados nº 1, 2, 4, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16, cujos determinantes foram relacionados com os respectivos grupos de ligação (Tabela 28). Destes 11 mutantes compactos, 3 foram relacionados com o grupo de ligação II, mas num todos apresentaram ligação genética com o marcador *w*. De acordo com diversos critérios ou sejam, frequência de recombinação, número de quebras cromossômicas, média de letais recessivos e frequência média de aneuplóides (D'ARCE, 1971) foi observado que o grupo de ligação II corresponde a um dos maiores cromossomos observados citologicamente (ELLIOT, 1960 e ROBINOW e CATEN, 1969). Desta forma a frequência de determinantes compactos neste grupo de ligação pode ser melhor compreendida. Por outro lado, poderia se supor a existência de determinantes morfológicos agregados neste grupo de ligação ou de regiões particularmente susceptíveis às mutações morfológicas. GARNJOBST e TATUM (1967) analisaram

diversos mutantes morfológicos e verificaram a possibilidade de agregação destas mutações frequentemente perto do centrômero. Os demais mutantes compactos analisados no presente trabalho, foram localizados nos grupos de ligação I, IV, V e VII. Apenas o mutante 14 não pode ser claramente associado ao respectivo grupo de ligação podendo estar no I ou VII; os valores de ligação meiótica com os marcadores desses grupos de ligação situam-se ao redor de 50% o que não possibilita também a localização do determinante compacto com segurança. Os resultados de ligação genética da maioria dos casos analisados estão situados acima de 35% e portanto, a ligação é fraca. Um mapeamento mais detalhado pode ser efetuado em estágio posterior usando-se linhagens com maior número de marcadores no grupo de ligação em questão.

Apesar destes mutantes possuírem um único determinante para o caráter compacto, a segregação deste caráter não é realmente nítida em cruzamentos com as linhagens normais. Alguns cruzamentos mostraram uma grande variabilidade de tamanho de colônia e a distinção entre os dois grupos é na verdade apenas tentativa, especialmente para o mutante 11. Isto pode ser atribuído à baixa expressividade do gene ou à ação de genes modificadores.

Por outro lado, alguns destes mutantes mostraram uma segregação nítida entre normais e compactos podendo, na prática, ser usados como excelentes marcadores genéticos. Entre eles destacam-se os mutantes 1, 4, 12 e 16, pertencentes aos grupos de ligação II, IV, I e IV, respectivamente.

Além desta utilização prática para estudos genéticos, os mutantes compactos oferecem um campo de pesquisa amplo, ao nível bioquímico e morfológico. Alguns desses mutantes estão sendo observados microscopicamente procurando detectar algumas diferenças na germinação e formação de hifas e alterações notórias estão sendo encontradas (BIAGI, não publicado). Estas alterações podem ser correlacionadas com os produtos primários das mutações ou sejam, alterações na estrutura, cinética e estabilidade de determinadas en

zimas. Estudos dessa natureza foram realizados em *Neurospora* e aspectos importantes da morfogênese foram caracterizados (SCOTT, 1976 e MISHRA, 1977), ressaltando-se o importante papel desempenhado pela parede celular. Trabalhos semelhantes foram conduzidos em leveduras por GLICK e col. (1960) e em bactérias por TOMASZ e BOREK (1960).

Em *Neurospora crassa* os estudos iniciais sobre morfogênese foram conduzidos utilizando-se um agente indutor de crescimento colonial, a sorbose. Um estudo paralelo pode ser efetuado em *Aspergillus nidulans* pois é conhecido que desoxicolato de sódio induz a formação de colônias compactas neste organismo (MacINTOSH e PRITCHARD, 1963). Os estudos nesta linha em *Aspergillus*, tanto ao nível genético como bioquímico, poderiam fornecer uma contribuição para compreensão do fenômeno da diferenciação morfológica.

#### 5.2.2. Mutantes que apresentaram segregação 2:1

A segregação de 2 normais:1 compacto foi encontrada entre os mutantes 3, 6, 7, 9, 17, 18, 19 e 20. A maioria deles também apresentou resultados de análise mitótica indicando que dois grupos de ligação estavam envolvidos com o caráter (Tabela 28). Para explicar estes resultados pode-se supor a existência de dois determinantes em grupos de ligação distintos que em ação conjunta determinam o caráter compacto. Em cruzamento compacto x normal, uma das classes recombinantes deve ser inviável produzindo, portanto, a proporção 2 normais para 1 compacto. Estes resultados podem ser explicados através de uma translocação não recíproca no mutante compacto (Figura 19).



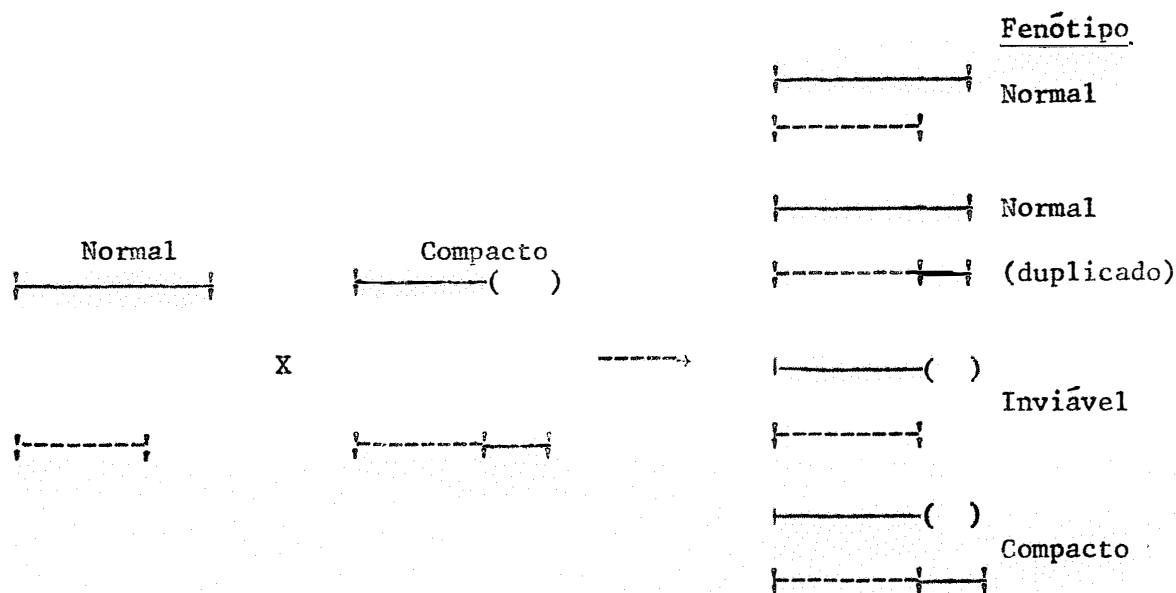


Figura 19 - Modelo apresentado para explicar a segregação 2:1, através de uma translocação não recíproca no mutante compacto.

Uma das classes recombinantes possui uma deleção, o que deve conferir inviabilidade, desde que se trata de um organismo haplóide. O outro recombinante deve possuir uma pequena duplicação, mas seria de fenótipo semelhante ao normal ou "crinckled" (BAINBRIDGE e ROPER, 1966). O fenótipo "crinckled" (*cr*) é resultante da existência de uma duplicação de um segmento cromossômico em *Aspergillus nidulans*, mas não são características sistematicamente observadas (ALMEIDA, 1976). Em alguns cruzamentos com a linhagem MSE, este fenótipo foi encontrado entre os segregantes meióticos dos mutantes 3 e 7, principalmente.

O sentido da translocação não recíproca não foi determinado no presente trabalho. Uma análise mais detalhada é possível usando-se métodos de recombinação mitótica (PONTECORVO e KÄFER, 1958; KÄFER, 1977) ou a não disjunção específica (UPSHALL e KÄFER, 1974).

Além da translocação não recíproca, outros tipos de aberra-

ções poderiam estar envolvidas, mas devido à conhecida prevalência de translocações (KÄFER, 1965) é possível que esta explicação seja a mais apropriada. Os casos de translocações não recíprocas associadas à alterações morfológicas já foram descritos por alguns autores (BAINBRIDGE, 1963 e CLUTTERBUCK, 1970).

Entretanto, os mutantes 17 e 20 apresentaram um único grupo de ligação envolvido com o caráter compacto e portanto, o modelo de translocação não recíproca, não pode ser aplicado nestes casos. A ocorrência de outros tipos de aberrações cromossômicas como a inversões poderiam ser postuladas, entretanto, a comprovação de alterações estruturais desta natureza são mais laboriosas e complexas. As inversões de maneira geral, originam cromossomos com duplicações e deficiências no cruzamento com linhagens normais, resultando em ausência de pelo menos uma classe de segregantes (SWANSON, 1967). Supondo-se que a duplicação seja pequena esta poderia resultar em um fenótipo normal, ao passo que as deficiências seriam letais num organismo haplóide.

### 5.2.3. Mutante citoplasmático

Entre os vinte isolados compactos, apenas o isolado número 5 apresentou características de herança não mendeliana. Os resultados de segregação meiótica (Tabela 30) se apresentaram irregulares, sem proporção definida e os resultados da análise mitótica não apresentaram indícios de ligação genética com os marcadores utilizados. A hipótese da herança citoplasmática foi reforçada pelos resultados do teste do heterocário (JINKS, 1963). Os indivíduos provenientes do heterocário formado entre o mutante 5 e a linhagem MSE foram todos de fenótipo normal, com os marcadores genéticos de uma ou outra linhagem envolvida na formação do heterocário. O não aparecimento do

fenótipo compacto pode ser explicado por supressão dos determinantes citoplasmáticos mutantes pela atividade dos determinantes normais (ARLETT e col., 1962).

O isolado 5 apresentou o fenômeno de instabilidade mitótica, produzindo setores de morfologia alterada incluindo os tipos normais. A produção de setores de morfologia normal sugere, portanto, a presença de determinantes citoplasmáticos normais no isolado 5, correspondendo ao "heteroplasmon" descrito por ARLETT e col., (1962) no mutante "red" e por FAULKNER e ARLETT (1964) na variante "minute". Esses autores sugerem também que o estado homoplásmico mutante deve ser letal, desde que não obtiveram fenótipo mutante puro sem apresentar segregação. No caso do isolado 5, entretanto, esta sugestão não pode ser aceita incondicionalmente pois algumas colônias compactas não apresentam setores, mas apenas um halo de micélio sem conídios. Por outro lado, o fenótipo de "minute" e "red" não é transmitido através de cruzamentos, o que pode ser conseguido com o isolado 5. Apesar dessas diferenças, há muitos pontos de similaridade, como o padrão de instabilidade teste do heterocário, supressão e características morfológicas, o que permite sugerir um modo de herança semelhante para os três casos.

### 5.3. Instabilidade mitótica

A instabilidade mitótica foi um fenômeno detectado entre alguns mutantes compactos analisados no presente trabalho. Este fenômeno pôde ser detectado pela formação de setores de morfologia alterada. Os tipos de setores produzidos mostraram grande variabilidade tanto entre diferentes mutantes compactos como entre colônias do mesmo mutante; apenas aquele que apresentaram uma nítida formação de setores foram analisados (isolados 7 e 13).

Os resultados obtidos através da análise genética demonstram diferenças no padrão de instabilidade apresentado por estes mutantes de forma que eles serão discutidos isoladamente.

### 5.3.1. Instabilidade do mutante 7

Este mutante é altamente instável mostrando pelo menos um setor por colônia. Os tipos de setores apresentados variam muito nas suas características morfológicas surgindo também setores normais, semelhante ao tipo original (*bi* A<sub>1</sub>; *meth* G<sub>1</sub>).

No cruzamento 7 X MSE, observou-se que entre os segregantes meiôticos se incluíam colônias enrugadas, com crescimento melhorado em relação ao compacto e que se assemelhavam aos setores produzidos mitoticamente. Consequentemente durante o processo de divisão (meiose ou mitose) devem ocorrer modificações nos loci responsáveis pela morfologia.

De acordo com o que foi discutido no item 5.2.2. o mutante 7 pode ter uma translocação não recíproca. Tal tipo de alteração estrutural torna possível a explicação do tipo de instabilidade apresentada. Primariamente, dois grupos de ligação (V e VI) estão envolvidos com o mutante 7; o setor 7a apresentou segregação de 1:1 e apenas um grupo de ligação envolvido (VI), enquanto que o setor 7c apresentou também os dois grupos de ligação (V e VI) envolvidos. Os dois setores apresentaram resultados de análise genética diferentes entre si e com relação ao tipo original.

Para esclarecer a complexa situação encontrada através da análise genética, é apresentado um modelo para explicar a instabilidade do mutante 7 (Figura 20).

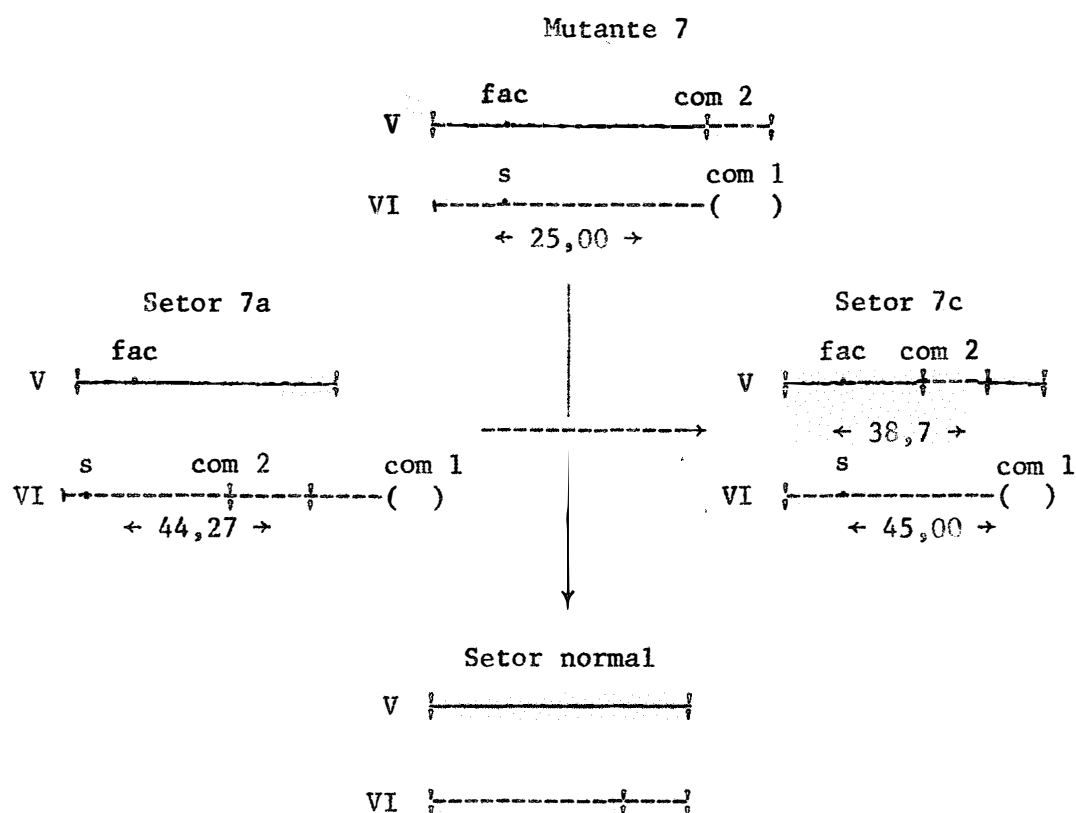


Figura 20 - Modelo apresentado para explicar a instabilidade do mutante 7. Explicações no texto. com 1 = ponto de quebra; com 2 = ponto de junção do segmento.

O mutante 7, de acordo com as considerações do item 5.2.2., deve possuir uma translocação não recíproca entre os grupos de ligação V e VI, resultando um cromossomo com deleção e o outro com duplicação. De acordo com os resultados da análise mitótica (Tabela 14), podemos verificar que os segregantes  $\delta^+$  não aparecem, e portanto, correspondendo ao cromossomo com deleção. Os segregantes  $fac^+$  foram detectados, mas em baixa frequência, devido possivelmente à existência da duplicação. No modelo apresentado (Figura 20) foi representado o cromossomo VI com deleção e o segmento translocado no V (tracejado  $\frac{---}{-}$ ). Este segmento, numa posição anormal, é altamente instável e sofre transposição para o grupo de ligação VI e dentro do próprio

cromossomo. No caso do setor 7a, a transposição deve ter ocorrido para o grupo de ligação VI, anulando portanto o efeito da deleção e produzindo a proporção meiótica de 1:1. O fenótipo resultante não é normal pois a posição original não foi restabelecida. No caso do setor 7c, a transposição do segmento é dentro do próprio cromossomo (portanto, insercional), mais próximo ao marcador  $\delta ac$ . Entretanto, um determinante permanece ainda no grupo de ligação VI. Devido a alta capacidade de transposição do segmento translocado é possível que as estruturas dos setores 7a e 7b e do tipo original sejam estruturas reversíveis, explicando portanto, o aparecimento do mutante 7 original entre segregantes dos cruzamentos 7a X MSE e 7b X MSE. O aparecimento do setor normal é também explicável através da transposição do segmento para a posição original produzindo uma integração estável. Neste caso o processo é irreversível. Assumindo-se ser esta a situação e que a transposição ocorre tanto na mitose como na meiose, o restabelecimento do fenótipo normal, de conídios verdes, entre os segregantes meióticos deve ter aumentado. E na realidade isto ocorreu. A proporção de conídios branco : amarelo mais verde é de 1:1 em situações normais e no caso do cruzamento 7 X MSE o resultado foi de 0,35 : 0,64 ( $X^2 = 5,07^*$ ).

Os resultados de ligação meiótica não foram considerados devido ao pequeno número de ascósporos analisados em relação ao marcador  $\delta$ . Tal fato é atribuído à interação existente entre o marcador  $\delta$  e *meth*. Desta forma, a localização dos determinantes *com 1* e *com 2* no grupo de ligação VI é apenas sugestiva, podendo ser insercionais ou terminais.

Um fato coincidente na análise mitótica dos setores 7a, 7b e 7c (Tabelas 34, 35 e 36) é a completa ausência de segregantes *piro<sup>-</sup>*. Estes resultados podem ser explicados pela indução de um determinante letal no grupo de ligação IV da linhagem MSE ou por uma seleção de segregantes *piro<sup>+</sup>* devido à ação de cloroneb. A primeira alternativa, indução de determinantes letais, supõe a existência de regiões particularmente susceptíveis no grupo

de ligação IV da linhagem MSE. Determinantes desta natureza foram também detectados por ZUCCHI (1975) na mesma linhagem, mas sem localização preferencial. A segunda alternativa, seleção de segregantes *piro*<sup>+</sup>, devido à ação do cloroneb não foi investigada sistematicamente, mas alguns diplóides parecem apresentar esta seleção com maior frequência (PIZZIRANI, não publicado).

O modelo apresentado para explicar a instabilidade do mutante 7 foi baseado apenas na análise genética inicial usando-se linhagens com poucos marcadores, entretanto, ele possui algum reforço desde que fenômenos desta natureza já foram descritos por alguns autores, ressaltando-se o trabalho de DAWSON e SMITH-KEARY (1963) em bactérias e em *Aspergillus nidulans* os de BAINBRIDGE e ROPER (1966), NGA e ROPER (1968, 1969), AZEVEDO E ROPER (1970), MENEZES (1975). O mecanismo de transposição não é ainda bem claro podendo ocorrer através de uma permuta desigual entre cromatídios irmãos ou permuta numa alça intracromossômica (NGA e ROPER, 1968).

### 5.3.2. Instabilidade do mutante 13

Os resultados da análise genética do mutante 13 apresentaram um determinante genético simples, localizado no grupo de ligação V, à cerca de 29,0 unidades de recombinação do marcador *fac*. Valores de recombinação semelhantes foram encontrados na análise genética dos setores 13a e 13b (ao redor de 20%). Os resultados de segregação meiótica mostraram uma proporção de 1 normal:1 compacto, exceto no caso de 13a (2:1). Para explicar os resultados obtidos e também a instabilidade encontrada no mutante 13 é apresentado um modelo que pode ser observado através da Figura 21.

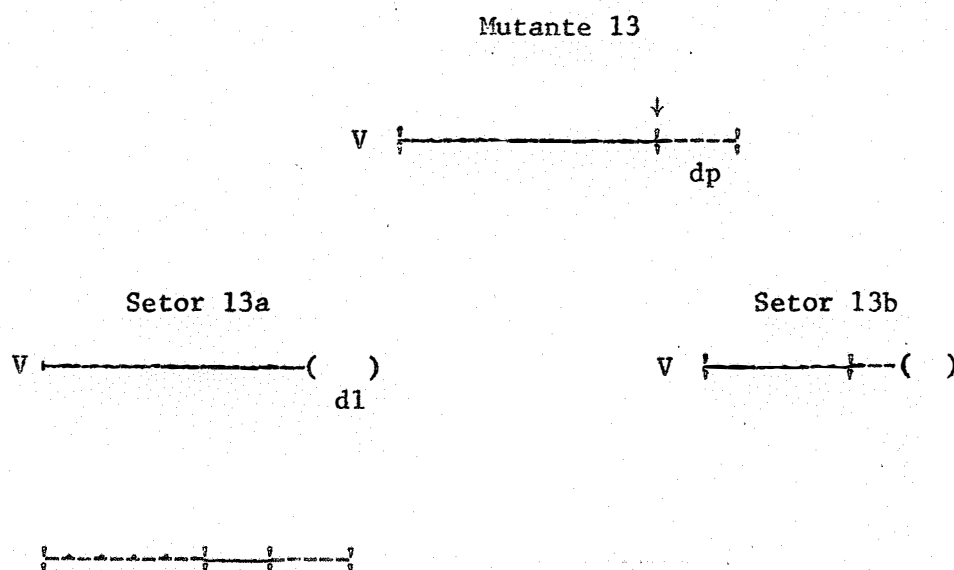


Figura 21 - Modelo apresentado para explicar a instabilidade do mutante 13.  
dp = duplicação; d1 = deleção.

Neste modelo é sugerida a presença de uma duplicação de um segmento cromossômico ligado ao grupo de ligação V, no caso de 13. O ponto de ligação entre eles pode ser o determinante genético responsável pela morfologia e instabilidade, à semelhança do modelo sugerido por BALL (1967). O segmento duplicado deve ser instável e capaz de sofrer translocação para outros grupos de ligação; nesta translocação o segmento duplicado pode carregar consigo um pedaço do grupo de ligação V, ocasionando portanto, uma deleção. Esta situação pode ser apresentada pelo setor 13a; em cruzamento com a linhagem normal, o fenótipo compacto pode ser restabelecido pela junção da duplicação em um outro grupo de ligação ao passo que a deleção provocaria a ausência de uma classe de segregante.

A origem do setor 13b pode ser explicada por perda de uma parte da região duplicada o que levaria a um fenótipo melhorado, ou seja, mais próximo ao tipo normal. Esta situação é semelhante àquela apresentada por



NGA e ROPER (1968) e AZEVEDO e ROPER (1970) que obtiveram setores melhorados a partir de linhagens com duplicações cromossômicas.

### 5.3.3. Considerações gerais sobre a instabilidade mitótica

O fenômeno de instabilidade mitótica foi registrado pela primeira vez por EMERSON (1914) em milho. Este tipo de pesquisa foi mantido inicialmente por pequenos grupos mas atualmente a instabilidade mitótica já foi detectada numa diversidade muito ampla de organismos, de vírus a sistemas de organismos eucariotos. Uma visão geral sobre esse assunto pode ser encontrada no volume 73 de Genetics Supplement (abril de 1973). Em bactérias, os estudos nesta linha estão bastante avançados com o conhecimento dos segmentos de inserção e transposons (COHEN, 1976). A partir das evidências encontradas neste microrganismo, NEVERS e SAEDLER (1977) apresentaram um modelo ao nível molecular explicando o mecanismo de instabilidade em organismos eucariotos, mais especificamente em milho, a partir dos resultados obtidos por McCLINTOCK (1950, 1951). Em muitos processos de instabilidade, um fenômeno é relativamente comum: o da transposição de elementos genéticos, geralmente associada a rearranjos estruturais nos cromossomos.

Em *Aspergillus nidulans* os casos de instabilidade mais complexos são também relacionados com alterações na estrutura dos cromossomos (BAINBRIDGE e ROPER, 1966; NGA e ROPER, 1968, 1969; AZEVEDO e ROPER, 1970; ZUCCHI, 1975; ALMEIDA, 1976). Os dois mutantes compactos, 7 e 13, analisados no presente trabalho também são instáveis e a análise genética indica alterações cromossômicas. Diversos outros derivados compactos apresentaram igualmente essa característica (Tabela 7). Em vista da alta frequência de instabilidade encontrada em mutantes compactos, uma nova perspectiva se abre na metodologia usada para a procura de linhagens instáveis. As linhagens

instáveis de *Aspergillus nidulans* (linhagens A, B, C e D) apresentam principalmente dois tipos de setores: deteriorados e melhorados. A visualização de setores deteriorados é entretanto dificultada devido ao seu pequeno crescimento e escassez na produção de conídios. Em mutantes compactos esse tipo de setor não foi constatado; aparecem setores do tipo melhorado, com taxa de crescimento maior, mas exibindo diferentes morfologia, em vários graus, até o tipo normal. Com o estudo do compacto original, que se assemelha ao tipo deteriorado, e das várias classes intermediárias é possível, portanto, estabelecer a sequência dos eventos genéticos que levam finalmente à produção do fenótipo normal. Desta forma, faz-se necessária a pesquisa de maior número de mutantes compactos instáveis e verificar se o processo de instabilidade em *Aspergillus nidulans* pode ser explicado por um mecanismo comum.

#### 5.4. Considerações gerais sobre o consumo de O<sub>2</sub>

O conhecimento sobre o metabolismo respiratório de fungos filamentosos em geral, tem sido prejudicado pelas dificuldades técnicas de preparar o material de forma padronizada para uso no respirômetro e obter respostas satisfatórias. Este problema foi resolvido parcialmente no presente trabalho usando-se macerado de micélio; entretanto, os valores encontrados constituem uma sub-estimativa desde que DARBY e GODDARD (1950) mostraram que o tecido macerado apresentava uma menor taxa respiratória do que esporos ou micélio intacto.

Os resultados de absorção de O<sub>2</sub> obtidos mostram que existe uma variação muito grande sob este aspecto, entre os mutantes compactos. O maior valor de consumo de O<sub>2</sub> foi verificado para a linhagem normal *bi A*<sub>1</sub>; *meth G*<sub>1</sub>; os demais valores encontrados para os mutantes compactos são os menores (Figuras de nº 8 a 17). Observa-se através destas Figuras que os

isolados 11 e 13 apresentam valores de consumo de  $O_2$  que mais se aproximam à da linhagem normal, ao passo que os isolados 5 e 12 apresentam os menores valores. Estes resultados podem ser melhor observados através da Tabela 46, calculados em porcentagem. A maioria dos mutantes possui valor de  $kO_2$  abaixo de 60% da linhagem normal e apenas os isolados 4, 8, 11 e 13 possuem valores superiores a 60%. Estes resultados sugerem que o metabolismo oxidativo entre os mutantes compactos e com relação à linhagem normal é diferente. Os valores de  $QO_2$  obtidos por diferentes autores (BAINBRIDGE e col., 1971; CARTER e col., 1971 e HOUGHTON, 1971) não são comparáveis desde que a metodologia usada apresenta consideráveis diferenças. Normalmente os valores de  $QO_2$  são expressos por unidade de peso seco; no presente caso, a padronização foi feita por número de conídios viáveis devido à pouca quantidade de micélio formada pelos mutantes compactos o que poderia conduzir a erros maiores na estimativa dos dados.

Apesar da ausência de correlação positiva altamente significativa entre crescimento radial da colônia e consumo de  $O_2$ , pôde ser observada uma certa tendência para correlação entre os mutantes compactos derivados da linhagem *bi A<sub>1</sub>; meth G<sub>1</sub>* (isolados de nº 1 ao 11), excluindo o isolado 5 que é de origem citoplasmática. Para os isolados da linhagem *pro A<sub>1</sub>; paba A<sub>6</sub>; y A<sub>1</sub>* a correlação não é significativa. Este resultado pode ser devido à adição de prolina e ácido *p*-aminobenzóico à suspensão micelial dos mutantes compactos de nº 12 à 20, que pode exercer um efeito estimulatório no consumo de  $O_2$ , atribuído principalmente à prolina. FIGUEIREDO (1963) verificou que este aminoácido era estimulante da respiração em *Trypanosoma cruzi* e PAGNOCA (1976) também verificou um fenômeno semelhante em *Cladosporium carrionii*, mas em menor grau.

Em culturas de quemostato, CARTER e col. (1971) observaram uma relação linear entre taxa de crescimento e coeficiente respiratório em *Aspergillus nidulans* e em leveduras também foi registrado fenômeno semelhan-

te (TEMPEST e HERBERT, 1965). A ausência de correlação entre crescimento radial e consumo de  $O_2$  nos mutantes compactos, pode ser devido à inadequação do parâmetro utilizado ou seja o crescimento radial. O uso de um outro parâmetro como o aumento de biomassa ou peso seco por unidade de tempo, pode refletir uma condição mais real.

### 5.5. Respiração endógena

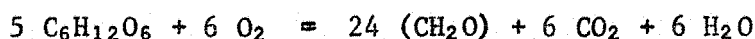
A maioria dos microrganismos são capazes de sobreviver, algumas vezes por períodos consideráveis, na ausência de nutrientes. Suspensões de organismos aeróbicos ou facultativos em água, salina ou solução tampão consomem oxigênio e liberam dióxido de carbono, o que indica a oxidação de material de reserva, possivelmente fornecendo energia necessária para sobrevivência. Estas reações metabólicas que ocorrem no interior da célula na ausência de um substrato exógeno é comumente chamado de metabolismo endógeno. Entretanto, acredita-se que estas mesmas reações podem continuar na presença de substratos exógenos (DAWES e RIBBONS, 1962).

Os valores de consumo de  $O_2$  devido ao metabolismo endógeno permanecem relativamente altos, mas com tendência a diminuir desde que os gráficos não se apresentam lineares. A exceção é encontrada para a linhagem normal e alguns mutantes compactos, em especial o 11. Nestes casos, o tempo de restrição nutricional ("starvation") de cerca de 16 horas em solução de KCl não deve ter sido suficiente para esgotar as reservas em nível equivalente à dos demais mutantes. Entretanto, um tempo muito prolongado não é aconselhável desde que foi observado redução na viabilidade celular e autólise de hifas em *Aspergillus nidulans* (BAINBRIDGE e col., 1971).

Devido à dificuldade de distinguir diretamente entre o oxigênio consumido na oxidação do substrato endógeno e exógeno, algumas aproxima-

ções foram feitas pelo cálculo da assimilação oxidativa introduzido por BARKER (1936, in DAWES e RIBBONS, 1962).

Os altos valores de assimilação oxidativa encontrados, de 36,41 a 97,99% (Tabela 48) indicam uma grande assimilação de glicose do meio e que não está sendo totalmente oxidada. Dos vinte isolados compactos analisados, 13 apresentaram assimilação oxidativa entre 60 e 80%. Estes valores são semelhantes àqueles obtidos por DARBY e GODDARD (1950) em *Myrothecium verrucaria* usando-se glicose ou sacarose como substrato. Ao nível de 80% a assimilação oxidativa foi representada pela equação:



A oxidação da glicose é incompleta e possivelmente este açúcar está sendo assimilado intracelularmente para biossíntese da parede celular (CORINA e MUNDAY, 1971). Por outro lado, devido ao tempo de restrição nutricional utilizado para preparação da suspensão micelial, possivelmente uma parte do açúcar assimilado deve ser convertido como substrato em potencial para a respiração endógena e os resultados obtidos no presente trabalho devem constituir uma super-estimativa. Alguns casos, como os dos isolados 5 e 12, apresentam praticamente 100% de assimilação. Estes isolados merecem uma análise mais detalhada, considerando-se a natureza distinta dos dois isolados. O isolado 5 foi considerado um mutante citoplasmático enquanto que o 12 é nuclear. Portanto, fatores de natureza distinta parecem estar atuando sobre um mecanismo comum: o respiratório. Uma comprovação da natureza nuclear e citoplasmática atuando na respiração pode ser verificada com estes dois isolados adicionando-se corantes especiais no meio cultura (GILLIE, 1970). A existência de mutantes deficientes respiratórios é bastante conhecida em organismos como *Neurospora* (MITCHELL e MITCHELL, 1952) e mesmo o estudo da herança mitocondrial progrediu muito em leveduras (THOMAS e WILKIE, 1968). Entretanto, os estudos nesse sentido quase não foram efetuados em

*Aspergillus nidulans*, restringindo-se aos trabalhos efetuados por HOUGHTON (1967; 1971).

Contrastando com os dois casos descritos, o isolado 13 apresenta o menor valor de assimilação oxidativa (36%). Apresenta um alto consumo de  $O_2$  refletindo, portanto, um alto metabolismo oxidativo ( $kO_2 = 85\%$ ) em comparação com a maioria dos compactos.

### 5.6. Consumo de glicose

O consumo de glicose apresentado na Tabela 48 mostra que houve uma grande assimilação do açúcar sem grandes variações entre os diversos isolados compactos e a linhagem normal. Em alguns casos, como o dos isolados 7, 8, 9 e 10 a assimilação foi praticamente de 100%, à semelhança da linhagem *bi A<sub>1</sub>;meth G<sub>1</sub>*. O menor valor, ao redor de 78%, foi detectado para o isolado 13. Este isolado apresenta um alto consumo de  $O_2$  e um menor consumo de glicose, refletindo portanto, um metabolismo oxidativo eficiente, conforme citado no item anterior. Apesar da diferença do consumo de glicose em relação à linhagem normal algumas considerações podem ser feitas sob este aspecto. Os resultados de ligação meiótica mostram que a maioria dos segregantes é *fac<sup>-</sup>* (82,2%), significando que eles não crescem em acetato como fonte única de carbono. ROMANO e KORNENBERG (1968, 1969) sugerem que a utilização dos açúcares é regulada por acetil-coenzima A, um produto metabólico do acetato. O mutante 13 pode apresentar alguma anormalidade na formação de acetil-coenzima A, o que acarretaria um menor entrada de glicose na célula e explicaria também o não crescimento em meio de acetato. A proporção de segregantes *fac<sup>+</sup> : fac<sup>-</sup>* não está de acordo com uma proporção mendeliana e a análise meiótica de dois setores, 13a e 13b, confirma a superioridade na frequência de segregantes *fac<sup>-</sup>* (82,2 e 80,6%, respectivamente), semelhante àque-

la encontrada para o isolado 13 (82,2%). A origem deste comportamento pode ser atribuída a fatores de origem citoplasmática em analogia aos resultados obtidos por EVANS e WILKIE (1976) que determinaram fatores mitocondriais controlando a habilidade na utilização de alguns açúcares em *Saccharomyces cerevisiae*.

Os demais isolados compactos apresentam valores de consumo de glicose mais próximo ao do tipo normal (Tabela 48) e esta situação parece ser a comumente encontrada por alguns autores (VERBINA, 1960; HOUGHTON, 1971). Portanto, a permeabilidade à glicose não deve estar alterada e a sua entrada se procede normalmente. O pequeno crescimento observado entre os mutantes compactos pode ser tentativamente atribuído a um menor metabolismo oxidativo. Isto traduzindo em termos de ATP, significaria uma menor quantidade de energia disponível para a ocorrência das reações biossintéticas necessárias para o desenvolvimento de um organismo (HOUGHTON, 1971).

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

Foram isolados vinte mutantes compactos de *Aspergillus nidulans* que apresentaram além do crescimento restrito, alterações na coloração do micélio, escassez na produção de conídios e enrugamento em vários graus. Eles foram obtidos a partir das linhagens *bi A<sub>1</sub>*; *meth G<sub>1</sub>* e *pro A<sub>1</sub>*; *paba A<sub>6</sub>*; *y A<sub>1</sub>*, após tratamento de conídios com luz ultra-violeta e nitrosoguanidina.

Os mutantes compactos foram analisados geneticamente e foi verificado que dos 20 mutantes analisados, 12 apresentaram uma herança mendeliana simples em cruzamentos com linhagens normais; 7 apresentaram segregação de 2 normais : 1 compacto indicando a possível ocorrência de aberrações cromossômicas e um dos mutantes foi de origem citoplasmático. Os determinantes morfológicos foram localizados em quase todos os grupos de ligação, exceto o III e o VIII. Os valores de ligação genética, ensaiados através do teste de dois pontos, foram obtidos em alguns casos.

Alguns mutantes apresentaram o fenômeno de instabilidade mitótica e 7 setores foram analisados. Os resultados da análise genética mos-



traram que o mecanismo de instabilidade pode ser atribuído a elementos de natureza citoplasmática e à alterações cromossômicas. Foram apresentados alguns modelos para explicar o fenômeno.

Com a finalidade de verificar outras diferenças entre os mutantes compactos e a linhagem normal, foi utilizado o respirômetro de Warburg para medir o consumo de  $O_2$ , utilizando-se glicose como substrato. Os valores de consumo de  $O_2$  obtidos foram sempre menores para os isolados compactos indicando um metabolismo oxidativo mais baixo, sendo que o menor valor foi detectado para o isolado citoplasmático. A respiração endógena permanece relativamente alta e com tendência a diminuir na maioria dos casos. O consumo de glicose permaneceu em nível semelhante para todos os casos analisados, exceto no caso do isolado 13 que apresentou valores um pouco inferiores. A origem deste comportamento é discutida.

## 7. SUMMARY

Twenty compact mutants were isolated from strains *bi* A<sub>1</sub>; *meth* G<sub>1</sub> and *pro* A<sub>1</sub>; *paba* A<sub>6</sub>; *y* A<sub>1</sub> of *Aspergillus nidulans* after treatment with ultra-violet light and nitrosoguanidine. Besides the restrict growth, these mutants presented alterations in mycelium pigmentation, poor conidiation and several degrees of crinckled phenotype.

The compact mutants were genetically analysed; twelve of them had a genetic marker segregating as a simple gene, giving in crosses with non compact strains a proportion of 1 compact to 1 normal colony; seven analysed compacts gave a 2 normal : 1 compact segregation indicating a possible occurrence of chromosome aberrations; finally the last compact analysed behaved as if the character was due to cytoplasmic inheritance. The genetic determinants of the compact morphology were located in almost all linkage groups; only in linkage groups III and VIII these determinants were not found. In some instances, meiotic linkage was detected.

Some compact mutants presented mitotic instability, producing several types of sectors. Seven sectors were genetically analysed. The

results have shown that instability can be due to cytoplasmic factors and to chromosome aberrations. Some models were presented to explain the instability phenomenon in such cases.

A measure of  $O_2$  consumption using manometric techniques and glucose as substrate was carried out in order to detect other differences among the compact mutants. In all cases compact mutants showed lower  $O_2$  consumption as compared to the normal strain; such results are indicative of lower oxydative metabolism; the cytoplasmic mutant being the lowest one. Glucose consumption remained at a high level in all cases but one, that is, mutant number 13.

## 8. BIBLIOGRAFIA CITADA

- ADELBERG, E.A.; MANDEL, M. e CHEN, G.C.C. (1965). Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli*. K-12. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 18:788-795.
- ALMEIDA, L.M. (1976). Obtenção de linhagens com duplicações cromossômicas em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter e sua instabilidade. Dissertação de Mestrado, ESALQ, USP. 122 pp. Piracicaba, SP.
- APIRION, D. (1962). A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice-versa in microorganism. *Nature*, London, 192:959-961.
- ARLETT, C.F. (1957). Induction of cytoplasmic mutants in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London, 179:1250-1251.
- ARLETT, C.F., GRINDLE, M. e JINKS, J.L. (1962). The red cytoplasmic variant of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 17:197-209.
- AZEVEDO, J.L. e ROPER, J.A. (1970). Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: successive and transposable genetic changes. *Genetical Research*, Cambridge, 16:79-93.

- AZEVEDO, J.L., SANTANA, E.P. e BONATELLI, R. (1977). Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 48:163-172.
- BACILA, M. (1960). Curso de Fisiologia de Microorganismos. Apostila de Bioquímica da Universidade do Paraná, Tomo II. 290pp.
- BAINBRIDGE, B.W. (1963). Genetic analysis of morphological mutants. *Aspergillus News Letter*, 4:20-21.
- BAINBRIDGE, B.W., BULL, A.T., PIRT, S.J., ROWLEY, B.I. e TRINCI, A.P.J. (1971). Biochemical and structural changes in non-growing maintained and autolysing cultures of *Aspergillus nidulans*. *Transaction of the British Mycological Society*, 56: 371-385.
- BAINBRIDGE, B.W. e ROPER, J.A. (1966). Observations of the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. *Journal of the General Microbiology*, 42:417-424.
- BALL, C. (1967). Chromosome instability related to gene suppression in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, Cambridge, 10:173-183.
- BALL, C. e ROPER, J.A. (1966). Studies on the inhibition and mutation of *Aspergillus nidulans* by acridines. *Genetical Research*, Cambridge, 7:207-221.
- BARRAT, R.W. e GARNJOBST, L. (1949). Genetics of a colonial microconidiating mutant strain of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 34:351-369.
- BRODY, S. e TATUM, E.L. (1966). The primary biochemical effect of a morphological mutation in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Science*, U.S.A., 56:1290-1297.
- BRODY, S. e TATUM, E.L. (1967). Phosphoglucosmutase mutants and morphological changes in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 58:923-930.
- CARTER, B.L.A.; BULL, A.T., PIRT, S.J. e ROWLEY, B.I. (1971). Relationship between energy, substrate utilization and specific growth rate in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 108:309-313.

- CLUTTERBUCK, A.J. (1970). A variegated position effect in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, Cambridge, 16:303-316.
- CLUTTERBUCK, A.J. (1974). *Aspergillus nidulans*, in R.C. KING (ed.). *Handbook of Genetics*, vol. I, Plenum Press, New York, pp.447-510.
- CLUTTERBUCK, A.J. e SINHA, V.S. (1966). N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) as a mutagen for *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 7: 12-13.
- CORINA, D.L. e MUNDAY, K.A. (1971). The metabolic stability of carbohydrates in walls of hyphae of *Aspergillus clavatus*. *Journal of General Microbiology*, 65:253-257.
- COHEN, S.N. (1976). Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature*, London, 163:731-738.
- CROCKEN, B. e TATUM, E.L. (1968). The effect of sorbose on metabolism and morphology of *Neurospora*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 156:1-8.
- CUNHA, P.R. (1970). A study of aspects of heterokaryosis in *Aspergillus nidulans*. *Reimpresso das Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 68:119-167.
- DARBY, R.T. e GODDARD, D.R. (1950). Studies on the respiration on the mycelium of the fungus *Myrothecium verrucaria*. *American Journal of Botany*, 37:379-387.
- D'ARCE, M.M.C.D. (1972). Contribuição ao estudo de aberrações cromossômicas numéricas em *Aspergillus nidulans*. Tese de Mestrado, ESALQ-USP. 50pp. Piracicaba, SP.
- DAWES, E.A. e RIBBONS, D.W. (1962). Endogenous metabolism of microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 16:241-264.
- DAWSON, G.W.P. e SMITH-KEARY, P.F. (1963). Episomic control of mutation in *Salmonella typhimurium*. *Heredity*, 18:1-20.
- ELLIOT, C.G. (1960). The cytology of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, Cambridge, 1:462-476.

- EMERSON, R.A. (1914). The inheritance of somatic variation in variegated ear of maize. *American Naturalist*, 48:87-115.
- EPHRUSSI, B., MARGARIE-HOTTINGUER, H. e ROMAN, H. (1955). Supressiveness: a new factor in the genetic determination of the synthesis of respiratory enzymes in yeast. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, 41:1065-1071.
- EPHRUSSI, B., HOTTINGUER, H. e CHIMENEZ, A.M. (1949). Action de l'acriflavine sur les levures: la mutation "petite colonie". *Annales de L'Institute Pasteur*, 16:351-367.
- EVANS, I.H. e WILKIE, D. (1976). Mitochondrial factors in the utilization of sugar in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetical Research*, Cambridge, 27:89-93.
- FAULKNER, B.M., ARLETT, C.F. (1964). The "minute" cytoplasmic variant of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 19:63-74.
- FIGUEIREDO, Y.P. (1963). Metabolismo oxidativo de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 62pp.
- GARNJOBST, L. e TATUM, E.E. (1967). A survey of new morphological mutants in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 57:579-604.
- GILLIE, O.J. (1970). Methods for the study of nuclear and cytoplasmic variation in respiratory activity of *Neurospora crassa*, and the discovery of three new genes. *Journal of General Microbiology*, 61:379-395.
- GLICK, M.C., SALL, T. e ZILIKEN, F. (1960). Morphological changes of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus* produced by a cell wall precursor. *Biochimica et Biophysica Acta*, 37:361-363.
- GRINDLE, M. (1964). Nucleo-cytoplasmic interactions in the "red" cytoplasmic variant of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 19:75-95.
- HOUGHTON, J.A. (1967). Respiratory deficient mutants of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 8:19.

- HOUGHTON, J.A. (1970). A new class of slow growing non-perithecial mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, Cambridge, 16:285-292.
- HOUGHTON, J.A. (1971). Biochemical investigations of the slow growing non-perithecial (*sgp*) mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, Cambridge, 17:237-244.
- JINKS, J.L. (1963). Extranuclear inheritance, in C.C. Ainsworth e A.S. Susman (ed.). *The fungi*, vol. II, pp.619-660.
- KÄFER, E. (1958). An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 9:105-145.
- KÄFER, E. (1965). Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 16:217-232.
- KÄFER, E. (1977). Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus nidulans* and its chromosomal aberrations. *Advances in Genetics*, 19:33-131.
- LACAVA, P.M. (1973). Mutantes morfológicos induzidos por raios gama em *Aspergillus nidulans*. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia de Jaboticabal. 85pp. Jaboticabal, SP.
- LINDEGREN, C.C. e LINDEGREN, G. (1941). X-ray and ultraviolet induced mutations in *Neurospora*. *Journal of Heredity*, 32:401-412.
- MAHADEVAN, P.R. e TATUM, E.L. (1965). Relationship of the major constituents of *Neurospora crassa* cell wall to the wild type and colonial morphology. *Journal of Bacteriology*, 90:1073-1081.
- McCLINTOCK, B. (1950). The origin and behaviour of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Science*, U.S.A., 36:344-355.
- McCLINTOCK, B. (1951). Chromosome organization and genetic expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 16:13-47.
- McCULLY, K.S. e FORBES, E. (1965). The use of *p*-fluorofenylalanine for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research*, Cambridge, 6:352-359.



- McKINTOSH, M.E. e PRITCHARD, R.H. (1963). The production and replica plating of microcolonies of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 4:320-322.
- MENEZES, E.M. (1974). Análise genética de variantes deteriorados e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Dissertação de Mestrado, ESAIQ-USP. 114pp. Piracicaba, SP.
- MISHRA, N.C. (1977). Genetics and biochemistry of morphogenesis in *Neurospora*. *Advances in Genetics*, 19:341-405.
- MISHRA, N.C. e TATUM, E.L. (1970). Phosphoglucomutase mutants of *Neurospora sitophila* and their relation to morphology. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, 66:638-645.
- MISHRA, N.C. e TATUM, E.L. (1972). Effects of L-sorbose in polysaccharide synthetase of *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, 69:313-317.
- MITCHELL, M.B. e MITCHELL, H.K. (1952). A case of "maternal" inheritance in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, 38:442-449.
- MITCHELL, M.B. e MITCHELL, H.K. e TISSIERES, A. (1953). Mendelian and non-mendelian factors affecting cytochrome system in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, 39:606-613.
- MORPURGO, G. (1961). Somatic segregation induced by p-fluorophenylalanine. *Aspergillus News Letter*, 2:10.
- NGA, B.H. e ROPER, J.A. (1968). Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 58:193-209.
- NEVERS, P. e SAEDLER, H. (1977). Transposable genetic elements as agent of gene instability and chromosomal rearrangements. *Nature, London*, 268: 109-115.
- PAGNOCCA, F.C. (1976). Alguns aspectos do metabolismo do *Cladosporium carrioni*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais. 46pp. Belo Horizonte, MG.

- NGA, B.H. e ROPER, J.A. (1969). A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, Cambridge, 14:63-70.
- PONTECORVO, G. e KÄFER, E. (1958). Genetical analysis based on mitotic recombination. *Advances in Genetics*, 9:71-104.
- PONTECORVO, G., ROPER, J.A., HEMMONS, L.M., McDONALD, R.D. e BUFTON, A.W.J. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.
- RIFKIN, M.R. e LUCK, D.J.L. (1971). Defective production of mitochondrial ribosomes in the "poky" mutant of *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Science*, U.S.A., 68:287-290.
- ROBINOW, C.F. e CATEN, C.E. (1969). Mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science*, 5:403-431.
- PIMENTAL GOMES, F. (1966). Curso de Estatística Experimental. Gráfica Benetti Ltda. São Paulo. 404pp.
- ROMANO, A.H. e KORNBERG, H.L. (1968). Regulation of sugar utilization by *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 158:491-493.
- ROMANO, A.H. e KONBERG, H.L. (1969). Regulation of sugar uptake by *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the Royal Society of London*, 173:475-490.
- ROPER, J.A. (1952). Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8:14-15.
- RUSSEL, P.J. e SRB, A.M. (1974). A study of L-glutamine: D-fructose-6-phosphate amidotransferase in certain developmental mutants of *Neurospora crassa*. *Molecular General Genetics*, 129:77-86.
- SAGER, R. (1972). Cytoplasmic genes and organelles. Academic Press, Inc., U.S.A. 405pp.

- SANT'ANA, E.P. (1974). Alteração na frequência de recombinação mitótica e mutantes resistentes a fungicidas em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Dissertação de Mestrado, ESALQ-USP., 63pp. Piracicaba, SP.
- SCOTT, W.A. (1976). Biochemical genetics of morphogenesis in *Neurospora*. *Annual Review of Microbiology*, 30:85-104.
- SCOTT, W.A. e ABRAMSKY, T. (1973). *Neurospora* 6-phosphogluconato dehidrogenase. Properties of two purified mutant enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 248:3542-3545.
- SCOTT, W.A. e TATUM, E.L. (1970). Glucose-6-phosphate dehidrogenase and *Neurospora* morphology. *Proceedings of the National Academy of Science*, 66:515-522.
- SNEDECOR, G.W. (1956). Statistical methods. The Iowa State University Press, pp.160-193.
- SWANSON, C.P. (1957). Cytogenetics. Prentice-Hall, Inc., pp.154-176.
- TATUM, E.L., BARRAT, R.W. e CUTTER, V.M. Jr. (1949). Chemical induction of colonial paramorphs in *Neurospora* and *Syncephalastrum*. *Science*, 109: 509-511.
- Tempest, D.W. e HERBERT, D. (1965). Effect of dilution rates and growth limiting substrate on the metabolic activity of *Torula utilis* cultures. *Journal of General Microbiology*, 41:143-150.
- TERRA, N. e TATUM, E.L. (1961). Colonial growth of *Neurospora*. *Science*, 134:1066-1068.
- TERRA, N. e TATUM, E.L. (1963). A relationship between cell wall structure and colonial growth in *Neurospora*. *American Journal of Botany*, 50: 669-677.
- THOMAS, D.Y. e WILKIE, D. (1968). Recombination of mitochondrial drug resistance factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 30:368-372.

- TOMASZ, A. e BOREK, E. (1960). The mechanism of bacterial fragility produced by 5-fluorouracil: the accumulation of cell wall precursors. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, 46:324-327.
- TRINCI, A.P.J. (1969). A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *Journal of General Microbiology*, 57:11-24.
- UMBREITT, W.W.; BURRIS, R.H. e STAUFFER, J.F. (1964). *Manometric Biochemical Techniques*. Burgess Publishing Company, 387pp.
- UPSHALL, A. e KÄFER, E. (1974). Detection and identification of translocations by increased specific non-disjunction in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 76:19-31.
- VERBINA, N.M. (1960). Respiration of greatly modified *Aspergillus nidulans* variants obtained by ultraviolet irradiation. *Mikrobiologiya*, 29:190-194.
- YOTSUYANAGI, Y. (1962). Étude sur le chondriome de la levure. *Journal of Ultrastructural Research*, 7:121-141.
- ZUCCHI, T.M.A.D. (1975). Instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - U.S.P. 96pp. Ribeirão Preto, SP.

9. APENDICE

Tabela A-1 - Diâmetro médio das colônias após 7 dias de incubação.

| Isolado   | Repetições |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Somas |
|---|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| 1   | 0,9        | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,2 | 10,4  |
| 2   | 1,2        | 1,2 | 1,2 | 1,3 | 1,3 | 1,3 | 1,4 | 1,5 | 1,8 | 1,8 | 14,0  |
| 3   | 1,2        | 1,2 | 1,3 | 1,3 | 1,4 | 1,4 | 1,5 | 1,5 | 1,6 | 1,6 | 14,0  |
| 4   | 1,0        | 1,0 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,5 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,9 | 14,4  |
| 5   | 1,5        | 1,6 | 1,7 | 1,8 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 18,6  |
| 6   | 1,8        | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 19,8  |
| 7   | 1,7        | 1,8 | 1,8 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,2 | 2,4 | 19,9  |
| 8   | 1,8        | 1,9 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,3 | 20,0  |
| 9   | 1,8        | 1,8 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,1 | 2,2 | 2,2 | 20,1  |
| 10  | 1,8        | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,2 | 2,2 | 20,2  |
| 11  | 1,9        | 1,9 | 2,0 | 2,0 | 2,1 | 2,1 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,3 | 20,9  |
| 12  | 1,3        | 1,3 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,6 | 1,6 | 14,2  |
| 13  | 1,4        | 1,4 | 1,4 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,6 | 1,6 | 1,7 | 1,7 | 15,3  |
| 14  | 1,4        | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,7 | 15,4  |
| 15  | 1,5        | 1,5 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,7 | 1,7 | 1,7 | 1,7 | 2,0 | 16,6  |
| 16  | 1,5        | 1,7 | 1,7 | 1,7 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,9 | 1,9 | 17,6  |
| 17  | 1,5        | 1,6 | 1,6 | 1,7 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 2,0 | 2,0 | 17,6  |
| 18  | 1,6        | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,1 | 2,1 | 2,1 | 2,2 | 2,2 | 20,3  |
| 19  | 1,9        | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,1 | 2,1 | 2,1 | 2,2 | 20,4  |
| 20  | 2,0        | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,1 | 2,1 | 2,2 | 20,4  |
| <i>bi A<sub>1</sub>;<br/>meth G<sub>1</sub></i> | 8,2        | 8,2 | 8,3 | 8,3 | 8,4 | 8,4 | 8,4 | 8,4 | 8,5 | 8,5 | 83,6  |

Tabela A-2 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado I.

| Tempo<br>(minutos) | TB  |     | Conjunto 145-14 |    |    |      | Conjunto 135-32 |     |    |       | Conjunto 199-37 |    |    |       | Conjunto 192-39 |     |    |       |     |
|--------------------|-----|-----|-----------------|----|----|------|-----------------|-----|----|-------|-----------------|----|----|-------|-----------------|-----|----|-------|-----|
|                    | L   | V   | 1               | 2  | 3  | 4    | 1               | 2   | 3  | 4     | 1               | 2  | 3  | 4     | 1               | 2   | 3  | 4     |     |
| 0                  | 196 | 199 |                 |    |    |      | 199             |     |    |       |                 |    |    |       | 200             |     |    |       | 200 |
| 60                 | 196 | 0   | 199             | 0  | 0  | 0    | 198             | -1  | 1  | 1,41  | 198             | -2 | 2  | 2,70  | 195             | -5  | 5  | 6,90  |     |
| 120                | 196 | 0   | 198             | -1 | 1  | 1,4  | 197             | -2  | 2  | 2,82  | 198             | -2 | 2  | 2,70  | 195             | -5  | 5  | 6,90  |     |
| 180                | 209 | 13  | 208             | 9  | 4  | 5,6  | 202             | 3   | 10 | 14,10 | 208             | 8  | 5  | 6,75  | 199             | -1  | 14 | 19,32 |     |
| 240                | 223 | 27  | 220             | 21 | 6  | 8,4  | 208             | 9   | 18 | 25,38 | 214             | 14 | 13 | 17,55 | 202             | 2   | 25 | 34,50 |     |
| 300                | 229 | 33  | 225             | 26 | 7  | 9,8  | 208             | 9   | 24 | 33,84 | 215             | 15 | 18 | 24,30 | 199             | -1  | 34 | 46,92 |     |
| 360                | 230 | 34  | 224             | 25 | 9  | 12,6 | 198             | -1  | 35 | 49,35 | 208             | 8  | 26 | 35,10 | 186             | -14 | 48 | 66,24 |     |
| 420                | 233 | 37  | 221             | 22 | 15 | 21,0 | 188             | -11 | 48 | 67,68 | 200             | 0  | 37 | 49,95 | 170             | -30 | 67 | 92,46 |     |

Tabela A-3 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 2.

| Tempo<br>(minutos) | Conjunto 145-14 |     |     |    | Conjunto 135-32 |       |     |     | Conjunto 199-37 |       |     |    | Conjunto 192-39 |       |     |     |    |        |
|--------------------|-----------------|-----|-----|----|-----------------|-------|-----|-----|-----------------|-------|-----|----|-----------------|-------|-----|-----|----|--------|
|                    | L               | V   | 1   | 2  | 3               | 4     | 1   | 2   | 3               | 4     | 1   | 2  | 3               | 4     | 1   | 2   | 3  | 4      |
| 0                  | 195             | 197 |     |    |                 |       | 194 |     |                 |       | 199 |    |                 |       | 191 |     |    |        |
| 60                 | 207             | 12  | 201 | 4  | 8               | 11,20 | 197 | 3   | 9               | 12,69 | 201 | 2  | 10              | 13,50 | 188 | -3  | 15 | 20,70  |
| 120                | 216             | 21  | 204 | 7  | 14              | 19,60 | 197 | 3   | 18              | 25,38 | 201 | 2  | 19              | 25,65 | 181 | -10 | 31 | 42,78  |
| 180                | 223             | 28  | 210 | 13 | 15              | 21,00 | 200 | 6   | 22              | 31,02 | 205 | 6  | 22              | 29,70 | 179 | -12 | 40 | 55,20  |
| 240                | 239             | 44  | 218 | 21 | 23              | 32,20 | 207 | 13  | 31              | 43,71 | 221 | 22 | 22              | 29,70 | 182 | -9  | 53 | 73,14  |
| 300                | 242             | 47  | 221 | 24 | 23              | 32,20 | 201 | 7   | 40              | 56,40 | 219 | 20 | 27              | 36,45 | 171 | -20 | 67 | 92,46  |
| 360                | 244             | 49  | 222 | 25 | 24              | 33,60 | 190 | -4  | 53              | 74,73 | 214 | 15 | 34              | 45,90 | 159 | -32 | 81 | 111,78 |
| 420                | 241             | 46  | 218 | 21 | 25              | 35,00 | 180 | -14 | 60              | 84,60 | 208 | 9  | 37              | 49,95 | 143 | -48 | 94 | 129,72 |



Tabela A-4 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 3.

| Tempo<br>(minutos) | TB  |     | Conjunto 145-14 |    |    |       | Conjunto 135-32 |    |    |       | Conjunt• 199-37 |     |     |        | Conjunto 192-39 |      |     |        |
|--------------------|-----|-----|-----------------|----|----|-------|-----------------|----|----|-------|-----------------|-----|-----|--------|-----------------|------|-----|--------|
|                    | L   | V   | 1               | 2  | 3  | 4     | 1               | 2  | 3  | 4     | 1               | 2   | 3   | 4      | 1               | 2    | 3   | 4      |
| 0                  | 192 | 192 |                 |    |    |       | 188             |    |    |       |                 | 189 |     |        | 190             |      |     |        |
| 60                 | 197 | 5   | 192             | 0  | 5  | 7,00  | 193             | 5  | 0  | 0,00  | 183             | - 6 | 11  | 14,85  | 177             | -13  | 18  | 24,84  |
| 120                | 202 | 10  | 192             | 0  | 10 | 14,00 | 194             | 6  | 4  | 5,64  | 174             | -15 | 25  | 33,75  | 163             | -27  | 37  | 51,06  |
| 180                | 215 | 23  | 201             | 9  | 14 | 19,60 | 205             | 17 | 6  | 8,46  | 161             | -28 | 51  | 68,85  | 139             | -51  | 74  | 102,12 |
| 240                | 217 | 25  | 201             | 9  | 16 | 22,40 | 200             | 12 | 13 | 18,33 | 148             | -41 | 66  | 89,10  | 110             | -80  | 105 | 144,90 |
| 300                | 229 | 37  | 209             | 17 | 20 | 28,00 | 209             | 21 | 16 | 22,56 | 136             | -53 | 90  | 121,50 | 98              | -92  | 129 | 178,02 |
| 360                | 231 | 39  | 209             | 17 | 22 | 30,80 | 205             | 17 | 22 | 31,02 | 121             | -68 | 107 | 144,45 | 87              | -103 | 142 | 195,96 |
| 420                | 231 | 39  | 207             | 15 | 24 | 33,60 | 201             | 13 | 26 | 36,66 | 105             | -84 | 123 | 166,05 | 73              | -117 | 156 | 215,28 |

Tabela A-5 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 4.

| Tempo<br>(minutos) | TB  |     | Conjunto 145-14 |    |       |     | Conjunto 135-32 |     |        |     | Conjunto 199-37 |    |        |     | Conjunto 192-39 |     |                  |   |
|--------------------|-----|-----|-----------------|----|-------|-----|-----------------|-----|--------|-----|-----------------|----|--------|-----|-----------------|-----|------------------|---|
|                    | L   | V   | 1               | 2  | 3     | 4   | 1               | 2   | 3      | 4   | 1               | 2  | 3      | 4   | 1               | 2   | 3                | 4 |
| 0                  | 195 | 196 |                 |    |       |     | 192             |     |        |     | 212             |    |        |     | 195             |     |                  |   |
| 60                 | 201 | 194 | - 2             | 8  | 11,20 | 187 | - 5             | 11  | 15,51  | 208 | - 4             | 10 | 13,50  | 188 | - 7             | 13  | 17,94            |   |
| 120                | 210 | 195 | - 1             | 16 | 22,40 | 182 | -10             | 25  | 35,25  | 203 | - 9             | 24 | 32,40  | 182 | -13             | 28  | 38,64            |   |
| 180                | 217 | 196 | 0               | 22 | 30,80 | 173 | -19             | 41  | 57,81  | 207 | - 5             | 27 | 36,45  | 177 | -18             | 40  | 55,20<br>49,82   |   |
| 240                | 226 | 198 | 2               | 29 | 40,60 | 161 | -31             | 62  | 87,42  | 204 | - 8             | 39 | 52,65  | 164 | -31             | 62  | 85,56<br>75,21   |   |
| 300                | 247 | 203 | 7               | 45 | 63,00 | 148 | -44             | 96  | 135,36 | 201 | -11             | 63 | 85,05  | 153 | -42             | 94  | 129,72<br>116,71 |   |
| 360                | 247 | 190 | - 6             | 58 | 81,20 | 130 | -62             | 114 | 160,74 | 189 | -23             | 75 | 101,25 | 136 | -59             | 111 | 153,18<br>138,39 |   |
| 420                | 247 | 181 | -15             | 67 | 93,80 | 107 | -85             | 137 | 193,17 | 170 | -42             | 94 | 126,90 | 111 | -84             | 136 | 187,68<br>169,25 |   |

Tabela A-6 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 5.

| Tempo<br>(minutos) | TB  |     | Conjunto 145-14 |    |    |       | Conjunto 135-32 |    |    |       | Conjunto 199-37 |     |    |       | Conjunto 192-39 |    |    |       |
|--------------------|-----|-----|-----------------|----|----|-------|-----------------|----|----|-------|-----------------|-----|----|-------|-----------------|----|----|-------|
|                    | L   | V   | 1               | 2  | 3  | 4     | 1               | 2  | 3  | 4     | 1               | 2   | 3  | 4     | 1               | 2  | 3  | 4     |
| 0                  | 188 | 190 |                 |    |    |       | 188             |    |    |       |                 | 187 |    |       |                 |    |    | 190   |
| 60                 | 190 | 2   | 190             | 0  | 2  | 2,80  | 188             | 0  | 2  | 2,82  | 187             | 0   | 2  | 2,70  | 190             | 0  | 2  | 2,76  |
| 120                | 190 | 2   | 187             | -3 | 5  | 7,00  | 187             | -1 | 3  | 4,23  | 187             | 0   | 2  | 2,70  | 189             | -1 | 3  | 4,14  |
| 180                | 198 | 10  | 187             | -3 | 13 | 18,20 | 187             | -1 | 11 | 15,51 | 187             | 0   | 10 | 13,50 | 190             | 0  | 10 | 13,80 |
| 240                | 206 | 18  | 189             | -1 | 19 | 26,60 | 189             | 1  | 17 | 23,97 | 192             | 5   | 13 | 17,55 | 193             | 3  | 15 | 20,70 |
| 300                | 213 | 25  | 189             | -1 | 26 | 36,40 | 188             | 0  | 25 | 35,25 | 192             | 5   | 20 | 27,00 | 192             | 2  | 23 | 31,74 |
| 360                | 220 | 32  | 192             | 2  | 30 | 42,00 | 188             | 0  | 32 | 45,12 | 192             | 5   | 27 | 36,45 | 192             | 2  | 30 | 41,40 |
| 420                | 226 | 38  | 195             | 5  | 33 | 46,20 | 186             | -2 | 40 | 56,40 | 191             | 4   | 34 | 45,90 | 191             | 1  | 37 | 51,06 |

Tabela A-7 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 6.

| Tempo<br>(minutos) | TB  |     | Conjunto 145-14 |    |       |     | Conjunto 135-32 |    |       |     | Conjunto 199-37 |    |       |     | Conjunto 192-39 |    |       |   |     |
|--------------------|-----|-----|-----------------|----|-------|-----|-----------------|----|-------|-----|-----------------|----|-------|-----|-----------------|----|-------|---|-----|
|                    | L   | V   | 1               | 2  | 3     | 4   | 1               | 2  | 3     | 4   | 1               | 2  | 3     | 4   | 1               | 2  | 3     | 4 |     |
| 0                  | 182 | 197 |                 |    |       |     | 189             |    |       |     |                 |    |       |     | 194             |    |       |   | 196 |
| 60                 | 183 | 198 | 1               | 0  | 0,00  | 186 | - 3             | 4  | 5,64  | 190 | - 4             | 5  | 6,75  | 191 | - 5             | 6  | 8,28  |   |     |
| 120                | 186 | 198 | 1               | 3  | 4,20  | 184 | - 5             | 9  | 12,69 | 189 | - 5             | 9  | 12,15 | 188 | - 8             | 12 | 16,56 |   |     |
| 180                | 188 | 196 | -1              | 7  | 9,80  | 173 | -16             | 22 | 31,02 | 181 | -13             | 19 | 25,65 | 177 | -19             | 25 | 34,50 |   |     |
| 240                | 197 | 198 | 1               | 14 | 19,60 | 163 | -26             | 41 | 57,81 | 173 | -21             | 36 | 48,60 | 169 | -27             | 42 | 57,96 |   |     |
| 300                | 197 | 198 | 1               | 14 | 19,60 | 160 | -29             | 44 | 62,04 | 171 | -23             | 38 | 51,30 | 163 | -33             | 48 | 66,24 |   |     |
| 360                | 197 | 196 | -1              | 16 | 22,40 | 154 | -35             | 50 | 70,50 | 167 | -27             | 42 | 56,70 | 158 | -38             | 53 | 73,14 |   |     |
| 420                | 198 | 195 | -2              | 18 | 25,20 | 148 | -41             | 57 | 80,37 | 161 | -33             | 49 | 66,15 | 151 | -45             | 61 | 84,18 |   |     |

Tabela A-8 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 7.

| Tempo<br>(minutos) | TB  |     | Conjunto 145-14 |    |    |       | Conjunto 135-32 |     |     |        | Conjunto 199-37 |     |    |       | Conjunto 192-39 |     |     |        |
|--------------------|-----|-----|-----------------|----|----|-------|-----------------|-----|-----|--------|-----------------|-----|----|-------|-----------------|-----|-----|--------|
|                    | L   | V   | 1               | 2  | 3  | 4     | 1               | 2   | 3   | 4      | 1               | 2   | 3  | 4     | 1               | 2   | 3   | 4      |
| 0                  | 201 | 198 |                 |    |    |       | 191             |     |     |        |                 | 194 |    |       |                 |     |     | 187    |
| 60                 | 215 | 14  | 205             | 7  | 7  | 9,80  | 192             | 1   | 13  | 18,33  | 195             | 1   | 13 | 17,55 | 187             | 0   | 14  | 19,32  |
| 120                | 231 | 30  | 215             | 17 | 13 | 18,20 | 192             | 1   | 29  | 40,89  | 195             | 1   | 29 | 39,15 | 181             | -6  | 36  | 49,68  |
| 180                | 238 | 37  | 221             | 23 | 14 | 19,60 | 184             | -7  | 44  | 62,04  | 197             | 3   | 34 | 45,90 | 172             | -15 | 52  | 71,76  |
| 240                | 246 | 45  | 221             | 23 | 22 | 30,80 | 171             | -20 | 65  | 91,65  | 194             | 0   | 45 | 60,75 | 161             | -26 | 71  | 97,98  |
| 300                | 252 | 51  | 222             | 24 | 27 | 37,80 | 162             | -29 | 80  | 112,80 | 193             | -1  | 52 | 70,20 | 149             | -38 | 89  | 122,82 |
| 360                | 259 | 58  | 226             | 28 | 30 | 42,00 | 152             | -39 | 97  | 136,77 | 191             | -3  | 61 | 82,35 | 141             | -46 | 104 | 143,52 |
| 420                | 263 | 62  | 225             | 27 | 35 | 49,00 | 132             | -59 | 121 | 170,61 | 182             | -12 | 74 | 99,90 | 127             | -60 | 122 | 168,36 |

Tabela A-9 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 8.

| Tempo<br>(minutos) | TB  |     | Conjunto 145-14 |     |    |       | Conjunto 135-32 |      |     |        | Conjunto 199-37 |     |     |        | Conjunto 192-39 |      |     |        |
|--------------------|-----|-----|-----------------|-----|----|-------|-----------------|------|-----|--------|-----------------|-----|-----|--------|-----------------|------|-----|--------|
|                    | L   | V   | 1               | 2   | 3  | 4     | 1               | 2    | 3   | 4      | 1               | 2   | 3   | 4      | 1               | 2    | 3   | 4      |
| 0                  | 189 | 188 |                 |     |    |       | 186             |      |     |        |                 | 189 |     |        |                 |      |     | 190    |
| 60                 | 189 | 0   | 8               | - 8 | 8  | 11,20 | 175             | -11  | 11  | 15,51  | 183             | - 6 | 6   | 8,10   | 177             | -13  | 13  | 17,94  |
| 120                | 190 | 1   | 15              | -14 | 15 | 21,00 | 162             | -24  | 25  | 35,25  | 174             | -15 | 16  | 21,60  | 163             | -27  | 28  | 38,64  |
| 180                | 196 | 7   | 25              | -18 | 25 | 35,00 | 144             | -42  | 49  | 69,09  | 161             | -28 | 35  | 47,25  | 139             | -51  | 58  | 80,04  |
| 240                | 206 | 17  | 34              | -17 | 34 | 47,60 | 125             | -61  | 78  | 109,98 | 148             | -41 | 58  | 78,30  | 110             | -80  | 97  | 133,86 |
| 300                | 213 | 24  | 41              | -17 | 41 | 57,40 | 108             | -78  | 102 | 143,82 | 136             | -53 | 77  | 103,95 | 88              | -102 | 126 | 173,88 |
| 360                | 224 | 35  | 50              | -15 | 50 | 70,00 | 94              | -92  | 127 | 179,07 | 121             | -68 | 103 | 139,05 | 77              | -113 | 148 | 204,24 |
| 420                | 224 | 35  | 53              | -18 | 53 | 74,20 | 77              | -109 | 144 | 203,04 | 105             | -84 | 119 | 160,65 | 63              | -127 | 162 | 223,56 |

Tabela A-10 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 9.

| Tempo<br>(minutos) | TB      |     | Conjunto 145-14 |    |       |     | Conjunto 135-32 |     |        |     | Conjunto 199-37 |    |        |     | Conjunto 192-39 |     |        |   |
|--------------------|---------|-----|-----------------|----|-------|-----|-----------------|-----|--------|-----|-----------------|----|--------|-----|-----------------|-----|--------|---|
|                    | L       | V   | 1               | 2  | 3     | 4   | 1               | 2   | 3      | 4   | 1               | 2  | 3      | 4   | 1               | 2   | 3      | 4 |
| 0                  | 173     | 194 |                 |    |       | 190 |                 |     |        |     | 187             |    |        |     | 187             |     |        |   |
| 60                 | 183     | 193 | -1              | 11 | 15,40 | 179 | -11             | 21  | 29,61  | 185 | -2              | 12 | 16,20  | 178 | -9              | 19  | 26,22  |   |
| 120                | 188     | 195 | 1               | 14 | 19,60 | 164 | -26             | 41  | 57,81  | 181 | -6              | 21 | 28,35  | 165 | -22             | 37  | 51,06  |   |
| 180                | 194/181 | 195 | 1               | 20 | 28,00 | 144 | -46             | 67  | 94,47  | 172 | -15             | 36 | 48,60  | 151 | -36             | 57  | 78,66  |   |
| 240                | 182     | 196 | 2               | 20 | 28,00 | 129 | -61             | 83  | 117,03 | 162 | -25             | 47 | 63,45  | 133 | -54             | 76  | 104,88 |   |
| 300                | 195/187 | 200 | 6               | 29 | 40,60 | 121 | -69             | 104 | 146,64 | 154 | -33             | 68 | 91,80  | 128 | -59             | 94  | 129,72 |   |
| 360                | 193     | 202 | 8               | 33 | 46,20 | 113 | -77             | 118 | 166,38 | 147 | -40             | 81 | 109,35 | 121 | -66             | 107 | 147,66 |   |
| 420                | 195     | 200 | 6               | 37 | 51,80 | 103 | -87             | 130 | 183,30 | 136 | -51             | 94 | 126,90 | 109 | -78             | 121 | 166,98 |   |

Tabela A-11 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 10.

| Tempo<br>(minutos) | TB<br>L V | Conjunto 145-14 |     |     |     | Conjunto 135-32 |     |      |     | Conjunto 199-37 |     |     |     | Conjunto 192-39 |     |      |     |        |
|--------------------|-----------|-----------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|------|-----|-----------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|------|-----|--------|
|                    |           | 1               | 2   | 3   | 4   | 1               | 2   | 3    | 4   | 1               | 2   | 3   | 4   | 1               | 2   | 3    | 4   |        |
| 0                  | 199       | 195             |     |     | 186 |                 |     |      | 192 |                 |     |     | 195 |                 |     |      |     |        |
| 60                 | 199       | 0               | 187 | -8  | 8   | 11,20           | 174 | -12  | 12  | 16,92           | 185 | -7  | 7   | 9,45            | 181 | -14  | 14  | 19,32  |
| 120                | 202       | 3               | 179 | -16 | 19  | 26,60           | 148 | -38  | 41  | 57,81           | 176 | -16 | 19  | 25,65           | 161 | -34  | 37  | 51,06  |
| 180                | 207       | 8               | 174 | -21 | 29  | 40,70           | 126 | -60  | 68  | 95,88           | 167 | -25 | 33  | 44,55           | 144 | -51  | 59  | 81,42  |
| 240                | 214       | 15              | 176 | -19 | 34  | 47,70           | 116 | -70  | 85  | 119,85          | 163 | -29 | 44  | 59,40           | 134 | -61  | 76  | 104,88 |
| 300                | 222       | 23              | 176 | -19 | 42  | 58,90           | 102 | -84  | 107 | 150,87          | 154 | -38 | 61  | 82,35           | 121 | -74  | 97  | 133,86 |
| 360                | 222       | 23              | 169 | -26 | 49  | 68,70           | 81  | -105 | 128 | 180,48          | 137 | -55 | 78  | 105,30          | 104 | -91  | 114 | 157,32 |
| 420                | 217       | 18              | 159 | -36 | 54  | 75,70           | 65  | -121 | 139 | 195,99          | 124 | -68 | 86  | 116,10          | 88  | -107 | 125 | 172,50 |



Tabela A-12 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 11.

| Tempo<br>(minutos) | Conjunto 145-14 |     |     |     | Conjunto 135-32 |        |     |      | Conjunto 199-37 |        |     |      | Conjunto 192-39 |        |     |      |     |        |  |
|--------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----------------|--------|-----|------|-----------------|--------|-----|------|-----------------|--------|-----|------|-----|--------|--|
|                    | L               | V   | 1   | 2   | 3               | 4      | 1   | 2    | 3               | 4      | 1   | 2    | 3               | 4      | 1   | 2    | 3   | 4      |  |
| 0                  | 187             | 191 |     |     |                 |        | 179 |      |                 |        |     | 186  |                 |        |     |      | 177 |        |  |
| 60                 | 195             | 8   | 185 | -6  | 14              | 19,60  | 173 | -6   | 14              | 19,74  | 177 | -9   | 17              | 22,95  | 173 | -4   | 12  | 16,56  |  |
| 120                | 196             | 9   | 171 | -20 | 29              | 40,60  | 162 | -17  | 26              | 36,66  | 154 | -32  | 41              | 55,35  | 158 | -19  | 28  | 38,64  |  |
| 180                | 199             | 12  | 155 | -36 | 48              | 67,20  | 137 | -32  | 54              | 76,14  | 127 | -59  | 71              | 95,85  | 143 | -34  | 46  | 63,48  |  |
| 240                | 208             | 21  | 146 | -45 | 66              | 92,40  | 113 | -66  | 87              | 122,67 | 97  | -89  | 110             | 148,50 | 125 | -52  | 73  | 100,74 |  |
| 300                | 214             | 27  | 135 | -56 | 83              | 116,20 | 81  | -98  | 125             | 176,25 | 63  | -123 | 150             | 202,50 | 98  | -79  | 106 | 146,28 |  |
| 360                | 223             | 36  | 132 | -59 | 95              | 133,00 | 73  | -106 | 142             | 200,22 | 43  | -143 | 179             | 241,65 | 77  | -100 | 136 | 187,68 |  |
| 420                | 225             | 38  | 121 | -70 | 108             | 151,20 | 55  | -124 | 162             | 228,42 | 19  | -167 | 205             | 276,75 | 56  | -121 | 159 | 219,42 |  |

Tabela A-13 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 12.

| Tempo<br>(minutos) | TB  |     | Conjunto 145-14 |     |      |       | Conjunto 135-32 |     |      |       | Conjunto 199-37 |    |      |       | Conjunto 192-39 |    |      |       |
|--------------------|-----|-----|-----------------|-----|------|-------|-----------------|-----|------|-------|-----------------|----|------|-------|-----------------|----|------|-------|
|                    | L   | V   | 1               | 2   | 3    | 4     | 1               | 2   | 3    | 4     | 1               | 2  | 3    | 4     | 1               | 2  | 3    | 4     |
| 0                  | 195 | 195 | 195             | 197 | 199  | 188   |                 |     |      |       |                 |    |      |       |                 |    |      |       |
| 60                 | 195 | 0   | 195             | 0   | 0,00 | 192   | -5              | 5   | 7,05 | 199   | 0               | 0  | 0,00 | 187   | -1              | 1  | 1,38 |       |
| 120                | 202 | 7   | 198             | 3   | 4    | 5,60  | 193             | -4  | 11   | 15,51 | 203             | 4  | 3    | 4,05  | 189             | 1  | 6    | 8,28  |
| 180                | 214 | 19  | 199             | 4   | 15   | 21,00 | 193             | -4  | 23   | 32,43 | 207             | 8  | 11   | 14,85 | 196             | 8  | 11   | 15,18 |
| 240                | 221 | 26  | 196             | 1   | 25   | 35,00 | 192             | -5  | 31   | 43,71 | 209             | 10 | 16   | 21,60 | 198             | 10 | 16   | 22,08 |
| 300                | 224 | 29  | 193             | -2  | 31   | 43,40 | 184             | -13 | 42   | 59,22 | 208             | 9  | 20   | 27,00 | 195             | 7  | 22   | 30,36 |
| 360                | 227 | 32  | 191             | -4  | 36   | 50,40 | 178             | -19 | 51   | 71,91 | 205             | 6  | 26   | 35,10 | 189             | 1  | 31   | 42,78 |
| 420                | 229 | 34  | 189             | -6  | 40   | 56,00 | 170             | -27 | 61   | 86,01 | 200             | 1  | 33   | 44,55 | 184             | -4 | 38   | 52,44 |

Tabela A-14 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 13.

| Tempo<br>(minutos) | Conjunto 145-14 |     |     |    | Conjunto 135-32 |       |     |      | Conjunto 199-37 |        |     |     | Conjunto 192-39 |        |     |     |     |        |
|--------------------|-----------------|-----|-----|----|-----------------|-------|-----|------|-----------------|--------|-----|-----|-----------------|--------|-----|-----|-----|--------|
|                    | L               | V   | 1   | 2  | 3               | 4     | 1   | 2    | 3               | 4      | 1   | 2   | 3               | 4      | 1   | 2   | 3   | 4      |
| 0                  | 195             | 193 |     |    |                 |       | 193 | 200  |                 |        |     |     |                 |        | 195 |     |     |        |
| 60                 | 213             | 18  | 197 | 4  | 14              | 19,60 | 199 | 6    | 12              | 16,92  | 207 | 7   | 11              | 14,85  | 195 | 0   | 18  | 24,84  |
| 120                | 223             | 28  | 196 | 3  | 25              | 35,00 | 189 | -4   | 32              | 45,12  | 204 | 4   | 24              | 32,40  | 190 | -5  | 33  | 45,54  |
| 180                | 228             | 33  | 190 | -3 | 36              | 50,40 | 160 | -33  | 66              | 93,06  | 189 | -11 | 44              | 59,40  | 182 | -13 | 46  | 63,48  |
| 240                | 238             | 43  | 191 | -2 | 45              | 63,00 | 119 | -74  | 117             | 164,97 | 162 | -38 | 81              | 109,35 | 165 | -30 | 73  | 100,74 |
| 300                | 253             | 58  | 194 | 1  | 57              | 79,80 | 101 | -92  | 150             | 211,50 | 139 | -61 | 119             | 160,65 | 147 | -48 | 106 | 146,28 |
| 360                | 256             | 61  | 192 | -1 | 62              | 86,80 | 81  | -112 | 173             | 243,93 | 119 | -81 | 142             | 191,70 | 126 | -69 | 130 | 179,40 |
| 420                | 260             | 65  | 190 | -3 | 68              | 95,20 | 70  | -123 | 188             | 265,08 | 106 | -94 | 159             | 214,65 | 109 | -86 | 151 | 208,38 |

Tabela A-15 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 14.

| Tempo<br>(minutos) | TB      |            | Conjunto 145-14 |    |       |     | Conjunto 135-32 |    |        |     | Conjunto 199-37 |     |        |     | Conjunto 192-39 |     |        |   |     |
|--------------------|---------|------------|-----------------|----|-------|-----|-----------------|----|--------|-----|-----------------|-----|--------|-----|-----------------|-----|--------|---|-----|
|                    | L       | V          | 1               | 2  | 3     | 4   | 1               | 2  | 3      | 4   | 1               | 2   | 3      | 4   | 1               | 2   | 3      | 4 |     |
| 0                  | 195     | 212        |                 |    |       |     | 203             |    |        |     |                 | 206 |        |     |                 |     |        |   | 202 |
| 60                 | 219     | 24 235/148 | 23              | 1  | 1,40  | 215 | 12              | 12 | 16,92  | 214 | 8               | 16  | 21,60  | 194 | 8               | 32  | 44,16  |   |     |
| 120                | 231     | 36 158     | 33              | 3  | 4,20  | 212 | 9               | 27 | 38,07  | 210 | 4               | 32  | 43,20  | 185 | -17             | 53  | 73,14  |   |     |
| 180                | 239     | 44 159     | 34              | 10 | 14,00 | 205 | 2               | 42 | 59,22  | 203 | -3              | 47  | 63,45  | 181 | -21             | 65  | 89,70  |   |     |
| 240                | 246     | 51 161     | 36              | 15 | 21,00 | 201 | -2              | 53 | 74,73  | 195 | -11             | 62  | 83,70  | 176 | -26             | 77  | 106,26 |   |     |
| 300                | 258     | 63 162     | 37              | 26 | 36,40 | 200 | -3              | 66 | 93,06  | 193 | -13             | 76  | 102,60 | 175 | -27             | 90  | 124,20 |   |     |
| 360                | 263/150 | 68 160     | 35              | 33 | 46,20 | 192 | -11             | 79 | 111,39 | 185 | -21             | 89  | 120,15 | 168 | -34             | 102 | 140,76 |   |     |
| 420                | 154     | 72 157     | 32              | 40 | 56,00 | 189 | -14             | 86 | 121,26 | 177 | -29             | 101 | 136,35 | 161 | -41             | 113 | 155,94 |   |     |

Tabela A-16 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 15.

| Tempo<br>(minutos) | TB  |     | Conjunto 145-14 |    |    |       | Conjunto 135-32 |     |    |       | Conjunto 199-37 |     |     |        | Conjunto 192-39 |     |     |        |  |
|--------------------|-----|-----|-----------------|----|----|-------|-----------------|-----|----|-------|-----------------|-----|-----|--------|-----------------|-----|-----|--------|--|
|                    | L   | V   | 1               | 2  | 3  | 4     | 1               | 2   | 3  | 4     | 1               | 2   | 3   | 4      | 1               | 2   | 3   | 4      |  |
| 0                  | 192 | 195 |                 |    |    |       | 186             |     |    |       |                 | 197 |     |        |                 |     | 193 |        |  |
| 60                 | 195 | 194 | 3               | -1 | 4  | 5,60  | 186             | 0   | 3  | 4,23  | 193             | -4  | 7   | 9,45   | 187             | -6  | 9   | 12,42  |  |
| 120                | 202 | 195 | 10              | 0  | 10 | 14,00 | 186             | 0   | 10 | 14,10 | 189             | -8  | 18  | 24,30  | 183             | -10 | 20  | 27,60  |  |
| 180                | 208 | 197 | 16              | 2  | 14 | 19,60 | 185             | -1  | 17 | 23,97 | 175             | -22 | 38  | 51,30  | 173             | -20 | 36  | 49,68  |  |
| 240                | 217 | 201 | 25              | 6  | 19 | 26,60 | 184             | -2  | 27 | 38,07 | 165             | -32 | 57  | 76,95  | 163             | -30 | 55  | 75,90  |  |
| 300                | 229 | 213 | 37              | 18 | 19 | 26,60 | 184             | -2  | 39 | 54,99 | 156             | -41 | 78  | 105,30 | 157             | -36 | 73  | 100,74 |  |
| 360                | 237 | 211 | 45              | 16 | 29 | 40,60 | 182             | -4  | 49 | 69,09 | 148             | -49 | 94  | 126,90 | 149             | -44 | 89  | 122,82 |  |
| 420                | 244 | 211 | 52              | 16 | 36 | 50,40 | 171             | -15 | 67 | 94,47 | 139             | -58 | 110 | 148,50 | 137             | -56 | 108 | 149,04 |  |

Tabela A-17 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 16.

| Tempo<br>(minutos) | TB  |     | Conjunto 145-14 |    |       |     | Conjunto 135-32 |    |       |     | Conjunto 199-37 |    |        |     | Conjunto 192-39 |     |        |   |
|--------------------|-----|-----|-----------------|----|-------|-----|-----------------|----|-------|-----|-----------------|----|--------|-----|-----------------|-----|--------|---|
|                    | L   | V   | 1               | 2  | 3     | 4   | 1               | 2  | 3     | 4   | 1               | 2  | 3      | 4   | 1               | 2   | 3      | 4 |
| 0                  | 188 | 185 | 185             |    |       |     | 185             |    |       |     | 188             |    |        |     | 188             |     |        |   |
| 60                 | 193 | 188 | 3               | 2  | 2,80  | 189 | 4               | 1  | 1,41  | 189 | 1               | 4  | 5,40   | 186 | -2              | 7   | 9,66   |   |
| 120                | 200 | 190 | 5               | 7  | 9,80  | 189 | 4               | 8  | 11,28 | 188 | 0               | 12 | 16,20  | 184 | -4              | 16  | 22,08  |   |
| 180                | 204 | 193 | 8               | 8  | 11,20 | 189 | 4               | 12 | 16,92 | 185 | -3              | 19 | 25,65  | 178 | -10             | 26  | 35,88  |   |
| 240                | 218 | 196 | 11              | 19 | 23,80 | 190 | 5               | 25 | 35,25 | 179 | -9              | 39 | 52,65  | 169 | -19             | 49  | 67,62  |   |
| 300                | 235 | 206 | 21              | 26 | 33,60 | 191 | 6               | 41 | 57,81 | 179 | -9              | 56 | 75,60  | 165 | -23             | 70  | 96,60  |   |
| 360                | 236 | 204 | 19              | 29 | 37,80 | 188 | 3               | 45 | 63,45 | 162 | -26             | 74 | 99,90  | 145 | -43             | 91  | 125,58 |   |
| 420                | 234 | 197 | 12              | 34 | 44,80 | 170 | -15             | 61 | 86,01 | 136 | -52             | 98 | 132,30 | 122 | -66             | 112 | 154,56 |   |

Tabela A-18 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 17.

| Tempo<br>(minutos) | TB  |     | Conjunto 145-14 |     |    |       | Conjunto 135-32 |     |     |        | Conjunto 199-37 |     |     |        | Conjunto 192-39 |     |     |        |     |
|--------------------|-----|-----|-----------------|-----|----|-------|-----------------|-----|-----|--------|-----------------|-----|-----|--------|-----------------|-----|-----|--------|-----|
|                    | L   | V   | 1               | 2   | 3  | 4     | 1               | 2   | 3   | 4      | 1               | 2   | 3   | 4      | 1               | 2   | 3   | 4      |     |
| 0                  | 188 | 189 |                 |     |    |       | 189             |     |     |        |                 |     |     |        | 190             |     |     |        | 191 |
| 60                 | 194 | 6   | 180             | -9  | 15 | 21,00 | 170             | -19 | 25  | 35,25  | 175             | -15 | 21  | 28,35  | 176             | -15 | 21  | 28,98  |     |
| 120                | 199 | 11  | 175             | -14 | 25 | 35,00 | 150             | -39 | 50  | 70,50  | 163             | -27 | 38  | 51,30  | 159             | -32 | 43  | 59,34  |     |
| 180                | 207 | 19  | 175             | -14 | 33 | 46,20 | 132             | -57 | 76  | 107,16 | 151             | -39 | 58  | 78,30  | 141             | -50 | 69  | 95,22  |     |
| 240                | 221 | 33  | 180             | -9  | 42 | 58,80 | 122             | -67 | 100 | 141,00 | 145             | -45 | 78  | 105,30 | 134             | -57 | 90  | 124,20 |     |
| 300                | 223 | 33  | 177             | -12 | 47 | 65,80 | 108             | -81 | 116 | 163,56 | 131             | -59 | 94  | 126,90 | 123             | -68 | 103 | 142,14 |     |
| 360                | 229 | 41  | 176             | -13 | 54 | 75,60 | 101             | -88 | 129 | 181,89 | 125             | -65 | 106 | 143,10 | 119             | -72 | 113 | 155,94 |     |
| 420                | 229 | 41  | 170             | -19 | 60 | 84,00 | 91              | -98 | 139 | 195,99 | 115             | -75 | 116 | 156,60 | 111             | -80 | 121 | 166,98 |     |

Tabela A-19 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 18.

| Tempo<br>(minutos) | TB  |     | Conjunto 145-14 |    |       |     | Conjunto 135-32 |     |        |     | Conjunto 199-37 |     |        |     | Conjunto 192-39 |    |        |     |
|--------------------|-----|-----|-----------------|----|-------|-----|-----------------|-----|--------|-----|-----------------|-----|--------|-----|-----------------|----|--------|-----|
|                    | L   | V   | 1               | 2  | 3     | 4   | 1               | 2   | 3      | 4   | 1               | 2   | 3      | 4   | 1               | 2  | 3      | 4   |
| 0                  | 188 | 189 |                 |    |       |     | 187             |     |        |     |                 | 192 |        |     |                 |    |        | 194 |
| 60                 | 201 | 197 | 8               | 5  | 7,00  | 188 | 1               | 12  | 16,92  | 200 | 8               | 5   | 6,75   | 200 | 6               | 7  | 9,66   |     |
| 120                | 208 | 201 | 12              | 8  | 11,20 | 186 | -1              | 21  | 29,61  | 200 | 8               | 12  | 16,20  | 202 | 8               | 12 | 16,56  |     |
| 180                | 211 | 200 | 11              | 12 | 16,80 | 178 | -9              | 32  | 45,12  | 200 | 8               | 15  | 20,25  | 202 | 8               | 15 | 20,70  |     |
| 240                | 218 | 194 | 5               | 25 | 35,00 | 163 | -24             | 54  | 76,14  | 193 | 1               | 29  | 39,15  | 195 | 1               | 29 | 40,02  |     |
| 300                | 240 | 202 | 13              | 39 | 54,60 | 160 | -27             | 79  | 111,39 | 193 | 1               | 51  | 68,85  | 193 | -1              | 53 | 73,14  |     |
| 360                | 251 | 207 | 18              | 45 | 63,00 | 145 | -42             | 105 | 148,05 | 183 | -9              | 72  | 97,20  | 180 | -14             | 77 | 106,26 |     |
| 420                | 264 | 217 | 28              | 48 | 67,20 | 139 | -48             | 124 | 174,84 | 175 | -17             | 93  | 125,55 | 174 | -20             | 96 | 132,48 |     |





Tabela A-21 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Isolado 20.

| Tempo<br>(minutos) | TB  |     | Conjunto 145-14 |     |       |       | Conjunto 135-32 |     |       |        | Conjunto 199-37 |     |       |       | Conjunto 192-39 |     |       |                  |
|--------------------|-----|-----|-----------------|-----|-------|-------|-----------------|-----|-------|--------|-----------------|-----|-------|-------|-----------------|-----|-------|------------------|
|                    | L   | V   | 1               | 2   | 3     | 4     | 1               | 2   | 3     | 4      | 1               | 2   | 3     | 4     | 1               | 2   | 3     | 4                |
| 0                  | 193 | 186 |                 |     |       |       | 189             |     |       |        |                 | 190 |       |       |                 |     |       | 191              |
| 60                 | 200 | 7   | -2              | 9   | 12,60 | 186   | -3              | 10  | 14,10 | 189    | -1              | 8   | 10,80 | 187   | -4              | 11  | 15,18 |                  |
| 120                | 204 | 11  | 178             | -8  | 19    | 26,60 | 174             | -15 | 26    | 36,66  | 185             | -5  | 16    | 21,16 | 176             | -15 | 26    | 35,88<br>31,23   |
| 180                | 207 | 14  | 174             | -12 | 26    | 36,40 | 164             | -25 | 39    | 54,99  | 182             | -8  | 22    | 29,70 | 165             | -26 | 40    | 55,20<br>46,63   |
| 240                | 222 | 29  | 182             | -4  | 33    | 46,20 | 164             | -25 | 54    | 76,14  | 189             | -1  | 30    | 40,50 | 164             | -27 | 56    | 77,28<br>64,64   |
| 300                | 235 | 42  | 189             | 3   | 39    | 54,60 | 164             | -25 | 67    | 94,47  | 193             | 3   | 39    | 52,65 | 164             | -27 | 69    | 95,22<br>80,88   |
| 360                | 238 | 45  | 192             | 6   | 39    | 54,60 | 157             | -32 | 77    | 108,57 | 193             | 3   | 42    | 56,70 | 158             | -33 | 78    | 107,64<br>90,97  |
| 420                | 240 | 47  | 190             | 4   | 43    | 60,20 | 145             | -44 | 91    | 128,31 | 187             | -3  | 50    | 67,50 | 149             | -42 | 89    | 122,82<br>106,21 |

Tabela A-22 - Leitura no respirômetro de Warburg e cálculo do consumo de O<sub>2</sub>. Linhagem b<sub>41</sub>; meth<sub>1</sub> (normal).

| Tempo<br>(minutos) | TB      |     | Conjunto 145-14 |      |     |        | Conjunto 135-32 |      |     |        | Conjunto 199-37 |      |     |        | Conjunto 192-39 |      |     |                  |     |
|--------------------|---------|-----|-----------------|------|-----|--------|-----------------|------|-----|--------|-----------------|------|-----|--------|-----------------|------|-----|------------------|-----|
|                    | L       | V   | 1               | 2    | 3   | 4      | 1               | 2    | 3   | 4      | 1               | 2    | 3   | 4      | 1               | 2    | 3   | 4                |     |
| 0                  | 181     | 176 |                 |      |     |        | 201             |      |     |        |                 | 183  |     |        |                 |      |     |                  | 189 |
| 60                 | 189     | 152 | 8               | -24  | 32  | 44,80  | 185             | -16  | 24  | 33,84  | 158             | -25  | 33  | 44,55  | 160             | -29  | 37  | 51,06            |     |
| 120                | 199     | 141 | 18              | -35  | 53  | 74,20  | 169             | -32  | 50  | 70,50  | 142             | -41  | 59  | 79,65  | 138             | -51  | 69  | 95,22            |     |
| 180                | 205     | 129 | 24              | -47  | 71  | 99,40  | 132             | -69  | 93  | 131,13 | 116             | -67  | 91  | 122,85 | 109             | -80  | 104 | 143,52           |     |
| 240                | 209/176 | 116 | 28              | -60  | 88  | 123,20 | 100             | -101 | 129 | 181,89 | 83              | -100 | 128 | 172,80 | 78              | -111 | 139 | 191,82           |     |
| 300                | 181     | 110 | 33              | -66  | 99  | 138,60 | 80              | -121 | 154 | 217,14 | 66              | -117 | 150 | 202,50 | 62              | -127 | 160 | 220,80           |     |
| 360                | 183     | 82  | 35              | -94  | 129 | 180,60 | 62              | -139 | 174 | 245,34 | 49              | -134 | 169 | 228,15 | 46              | -143 | 178 | 245,64           |     |
| 420                | 181     | 70  | 33              | -106 | 139 | 194,60 | 38              | -163 | 196 | 276,36 | 30              | -153 | 186 | 251,10 | 27              | -162 | 195 | 269,10<br>265,52 |     |

Tabela A-23 - Dosagem da glicose residual.

| Isolado                                | Endógeno | Repetições |      |      | Média   | Média Endógeno | D.O.  | Glicose residual (µg) |
|--|----------|------------|------|------|---------|----------------|-------|-----------------------|
| 1                                      | 124      | 475        | 600  | 500  | 525     | 401            | 0,802 | 34                    |
| 2                                      | 183      | 415        | 600  | 450  | 488,33  | 305,33         | 0,610 | 26                    |
| 3                                      | 50       | 555        | 520  | 450  | 508,33  | 458,33         | 0,917 | 39                    |
| 4                                      | 365      | 750        | 600  | 720  | 690,0   | 325,00         | 0,650 | 27,5                  |
| 5                                      | 95       | 460        | 460  | 510  | 476,67  | 381,67         | 0,763 | 32                    |
| 6                                      | 130      | 260        | 425  | 475  | 386,67  | 256,67         | 0,513 | 21,5                  |
| 7                                      | 363      | 495        | 375  | 325  | 398,33  | 35,33          | 0,071 | 3,0                   |
| 8                                      | 630      | 530        | 630  | 1000 | 720,00  | 90,00          | 0,180 | 8,0                   |
| 9                                      | 435      | 485        | 400  | 520  | 468,33  | 33,33          | 0,067 | 2,5                   |
| 10                                     | 420      | 425        | 400  | 465  | 430,00  | 10,00          | 0,020 | 1,0                   |
| 11                                     | 341      | 510        | 580  | 550  | 610,00  | 269,00         | 0,538 | 23,0                  |
| 12                                     | 275      | 1000       | 1000 | 950  | 983,33  | 708,33         | 1,417 | 59,5                  |
| 13                                     | 50       | 750        | 1000 | 1000 | 916,77  | 866,67         | 1,733 | 78,0                  |
| 14                                     | 544      | 1000       | 1000 | 1000 | 1000,00 | 456            | 0,912 | 38,5                  |
| 15                                     | 163      | 1000       | 1000 | 1000 | 1000,00 | 837            | 1,674 | 70,5                  |
| 16                                     | 215      | 1000       | 1000 | 1000 | 1000,00 | 785            | 1,570 | 66,0                  |
| 17                                     | 245      | 460        | 650  | 560  | 556,67  | 311,67         | 0,623 | 26,5                  |
| 18                                     | 54       | 800        | 720  | 980  | 833,33  | 779,33         | 1,559 | 65,5                  |
| 19                                     | 58       | 900        | 650  | 750  | 766,67  | 708,67         | 1,417 | 60,0                  |
| 20                                     | 245      | 750        | 550  | 880  | 726,77  | 481,77         | 0,963 | 40,5                  |
| bi A <sub>1</sub> ;meth G <sub>1</sub> | 720      | 800        | 800  | 780  | 793,33  | 73,33          | 0,147 | 6,0                   |