

OBTENÇÃO DE LINHAGENS COM DUPLICAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM
Aspergillus nidulans (Eidam) Winter E SUA INSTABILIDADE

LINDALVA MOREIRA DE ALMEIDA

Farmacêutica e Bioquímica

Orientador: Prof. João Lúcio Azevedo

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universida-
de de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro, 1976

Ao

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Minha especial homenagem, ao
grande geneticista de micror-
nismos, ao eminente orienta-
dor e mestre e sobretudo ao
grande amigo que é .

Aos meus pais

Ao meu esposo, Suguio

À meu filho, Daniel

D E D I C O

A G R A D E C I M E N T O S

Sinceros agradecimentos as seguintes pessoas e instituições:

- Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, professor, orientador e amigo, pela paciência e segurança na sua valiosa orientação desse trabalho;
- Ao Prof. Dr. Ernesto Paterniani, pelas facilidades concedidas como Diretor do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo;
- Ao Meu esposo, Suguio Okino, pela segurança, estímulo e confiança que sempre me demonstrou;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro concedido, possibilitando a execução desse trabalho.
- A Aline A. Pizzirani, pela revisão cuidadosa do original e pelas valiosas sugestões apresentadas;
- Aos Funcionários do Instituto de Genética, pelos serviços prestados;
- Aos Sr.^s Antonio José Rocha Campos, Luiz Próspero e Salvador Pexe, pelos serviços técnicos prestados junto ao Laboratório de Genética de Microrganismos.

E, finalmente, a todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do presente trabalho.

Í N D I C E

	Página
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 - Instabilidade mitótica	4
2.1.1 - Instabilidade em organismos superiores	4
2.1.2 - Instabilidade em microrganismos de modo geral	7
2.1.3 - Instabilidade em <i>Aspergillus nidulans</i>	10
2.1.4 - Efeitos dos agentes químicos e físicos so- bre a instabilidade em linhagens duplica- das de <i>Aspergillus nidulans</i>	17
2.1.4.1 - Efeitos dos agentes químicos	17
2.1.4.2 - Efeitos dos agentes físicos	18
3 - MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 - Símbolos e genótipos das linhagens usadas no presente trabalho	19
3.2 - Linhagens utilizadas	20
3.2.1 - Linhagens haplóides	21
3.2.2 - Linhagem diplóide	23
3.3 - Meios de cultura e soluções usadas	23
3.3.1 - Meio mínimo	23
3.3.2 - Meio mínimo (4% de ágar)	24
3.3.3 - Meio mínimo mais galactose	24

	Página
3.3.4 - Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo	24
3.3.5 - Meio completo	24
3.3.6 - Meio de acetato de amônio	25
3.3.7 - Solução de vitaminas	25
3.3.8 - Ácido nucléico de leveduras hidrolizado	26
3.3.9 - Solução salina	26
3.3.10 - Solução de Tween 80	26
3.3.11 - Solução de p-fluorofenilalanina (pFA)	27
3.3.12 - Solução de 1,4-dicloro-2,5-dimetoxil-benzeno (Cloroneb)	27
3.3.13 - Suplementos adicionados ao meio mínimo	27
3.4 - Técnicas gerais empregadas	28
3.4.1 - Esterilização e temperatura usada	28
3.4.2 - Placas de análise	28
3.5 - Preparo das linhagens para irradiação	29
3.6 - Irradiação dos conídios em meio sólido e meio líquido com raios gama	30
3.7 - Curvas de sobrevivência	30
3.8 - Transferência de microcolônias monospóricas	31
3.9 - Técnicas de análise genética	31
3.9.1 - Obtenção de heterocáριο	31
3.9.2 - Análise mitótica	32
3.9.3 - Análise meiótica	34

	Página
3.9.4 - Seleção de colônias com duplicações cromossômicas	35
3.9.5 - Análise genética das linhagens com duplicação cromossômica	37
4 - RESULTADOS	38
4.1 - Número, porcentagem relativa e curva de sobrevivência dos conídios após irradiação com raios gama em meio sólido e meio líquido	38
4.2 - Análise genética de colônias da linhagem <u>pro</u> ₁ , <u>paba</u> ₆ , <u>y</u> e <u>bi</u> ₁ , <u>meth</u> ₁ , após irradiação com raios gama	44
4.2.1 - Análise mitótica de isolados da linhagem <u>pro</u> ₁ , <u>paba</u> ₆ , <u>y</u> após irradiação com raios gama	44
4.2.2 - Análise mitótica de isolados da linhagem <u>bi</u> ₁ , <u>meth</u> ₁ após irradiação com raios gama	51
4.2.3 - Análise meiótica	52
4.2.3.1 - Isolados da linhagem <u>pro</u> ₁ , <u>paba</u> ₆ , <u>y</u> portadores de translocações X MSE .	52
4.2.3.2 - Isolados da linhagem <u>bi</u> ₁ , <u>meth</u> ₁ , portadores de translocações X MSE ...	54
4.2.4 - Verificação da instabilidade mitótica, através da produção de setores e morfologia das colônias, para seleção de linhagens portadoras de duplicação cromossômica	55

	Página
4.2.4.1 - Verificação da instabilidade mitótica nos isolados provenientes da linhagem <u>pro</u> ₁ , <u>paba</u> ₆ , <u>y</u>	55
4.2.4.2 - Verificação da instabilidade mitótica nos isolados provenientes da linhagem <u>bi</u> ₁ , <u>meth</u> ₁	55
4.2.5 - Medida dos diâmetros das colônias e contagem de setores por colônia, dos isolados provenientes da linhagem <u>pro</u> ₁ , <u>paba</u> ₆ , <u>y</u> , que apresentaram setores característicos de instabilidade mitótica	58
4.2.6 - Medida dos diâmetros das colônias e contagem de setores por colônia, dos isolados provenientes da linhagem <u>bi</u> ₁ , <u>meth</u> ₁ , que apresentaram setores característicos de instabilidade mitótica	60
4.2.7 - Segregantes instáveis selecionados e determinação das deficiências nutricionais dos centros e setores dos mesmos	60
4.2.7.1 - Segregante 7 . <u>pro</u> , <u>paba</u> ; <u>w</u> ; <u>nic</u> .	62
4.2.7.2 - Segregante 11 . <u>bi</u> ₁ ; <u>meth</u> ; <u>w</u>	62
4.2.7.3 - Segregante 18 . <u>nic</u>	66
4.2.8 - Análise mitótica das linhagens selecionadas como portadoras de duplicação cromossômica	68
4.2.8.1 - Segregante 7 . <u>pro</u> , <u>paba</u> ; <u>w</u> ; <u>nic</u> .	68
4.2.8.2 - Segregante 11 . <u>bi</u> ; <u>meth</u> ; <u>w</u>	68

	Página
4.2.9 - Análise meiótica dos segregantes selecionados como portadores de duplicação cromossômicas	71
4.2.9.1 - Análise meiótica do segregante 7 . <u>pro</u> , <u>paba</u> ; <u>w</u> ; <u>nic</u>	71
4.2.9.2 - Análise meiótica do segregante 11 . <u>bi</u> ; <u>meth</u> ; <u>s</u> ; <u>w</u>	73
4.2.9.3 - Análise meiótica do segregante 18 . <u>nic</u>	75
5 - DISCUSSÃO	76
5.1 - Curvas de sobrevivência aos raios gama	76
5.2 - Análise mitótica de isolados de linhagens haplóides irradiados	78
5.3 - Análise meiótica dos isolados com translocações cromossômicas ; originado de linhagens haplóides originais	80
5.4 - Caracterização da instabilidade mitótica nos isolados selecionados	82
5.5 - Verificação da instabilidade mitótica nos isolados provenientes da linhagem <u>pro</u> ₁ , <u>paba</u> ₆ , <u>y</u> e <u>bi</u> ₁ ; <u>meth</u> ₁ e caracterização dos segregantes estudados	82

	Página
6 - RESUMO E CONCLUSÕES	89
7 - SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	91
8 - BIBLIOGRAFIA CITADA	93
9 - A P Ê N D I C E	104

1 - INTRODUÇÃO

Praticamente desde a redescoberta das leis mendelianas, o fenômeno da instabilidade mitótica em seres vivos, vem preocupando os geneticistas. Em alguns casos (DEMEREK, 1937) a instabilidade pode ser relacionada com genes mutadores. No entanto, a instabilidade genética mitótica ou somática já tem sido descrita em muitos organismos, como o milho, a *Drosophila*, o fumo, bactérias, fungos, etc., e suas causas nem sempre tem sido bem evidenciadas, embora uma característica comum em quase todos os casos tem sido a existência de material genético em excesso.

Os fungos constituem em excelente material para estudos de instabilidade, em especial o *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter, que é um fungo filamentosos homotático que apresenta uma série de vanta-

gens para estudos genéticos. Estas vantagens podem ser resumidas em: possui cópulos uninucleados haplóides, possui ciclo sexual, assexual e parassexual; seu ciclo vital é rápido e pode crescer tanto em meio mínimo como em meios mais complexos. As vantagens mencionadas acima estão melhor explicadas no clássico trabalho de PONTECORVO e Col. (1953).

O *A. nidulans* possui um número haplóide de $n = 8$ cromossomos. No entanto, há linhagens que apresentam duplicações cromossômicas; estas são instáveis, produzindo tanto setores melhorados como setores deteriorados (BAINBRIDGE e ROPER, 1966 ; NGA e ROPER, 1968 ; AZEVEDO e ROPER, 1970 ; AZEVEDO, 1971 e ZUCCHI, 1975).

Nestas linhagens, setores melhorados originam-se por deleções cromossômicas nos segmentos em duplicada (NGA e ROPER, 1968) e setores deteriorados originam-se, provavelmente por duplicações em tandem na região já duplicada. Isto conduz a uma maior instabilidade. Dessa maneira o *A. nidulans* tem se mostrado bastante adequado para estudos sobre o problema da instabilidade genética (AZEVEDO, 1972).

A finalidade do presente trabalho é a obtenção de novas linhagens duplicadas em *A. nidulans*, e o estudo da instabilidade mitótica nestas linhagens. Até a presente, somente três linhagens duplicadas foram analisadas com detalhes. Para se ter uma idéia da generalização do fenômeno da instabilidade, maior número destas linhagens tem que ser estudado.

Os estudos e resultados obtidos com o desenvolvimento deste trabalho poderão contribuir para uma melhor compreensão do fenômeno da instabilidade em *A. nidulans* e possivelmente para o melhor entendimento do fenômeno de instabilidade como um todo.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

Para uma maior facilidade, a presente revisão da literatura será dividida em dois ítems, que são Instabilidade mitótica e Efeitos dos agentes químicos e físicos na instabilidade. Para um melhor entendimento, estes ítems serão sub-divididos em sub-ítems. O primeiro ítem está sub-dividido em: instabilidade em organismos superiores ; instabilidade em microrganismos, de modo geral, e instabilidade em *A. nidulans* . O segundo ítem está subdividido em: efeitos dos agentes químicos e efeitos dos agentes físicos.

2.1 - Instabilidade Mitótica

2.1.1 - Instabilidade em organismos superiores

O primeiro autor a sugerir a existência de genes instáveis foi EMERSON (1914). Este pesquisador atribuiu a alteração da cor do pericarpo de milho e uma consequência de frequente mutação do gene \underline{P}^{WV} para pericarpo incolor (P).

Além dos estudos de DEMEREC (1937), que verificou esta instabilidade em *Drosophila* devido a presença de genes mutadores, este mesmo pesquisador em 1941, realizou em *Drosophila virilis*, estudos que permitiram concluir que a alta taxa de mutação dos genes instáveis era uma propriedade autônoma e inerente do próprio gene.

Também em *Portulaca*, BEALE (1941) verificou que a instabilidade dos genes para pigmento é marcadamente aumentada pelo aumento e diminuição da temperatura.

Um outro caso de instabilidade em milho foi descrito por RHOADES (1941), onde um gene \underline{a}_1 , estável, com baixa taxa de mutação se tornava altamente instável em presença de um outro gene controlador chamado "Dotted" (\underline{dt}), situado num cromossomo diferente do que estava o gene \underline{a}_1 . Foi sugerido que a ação mais provável de \underline{dt} seria a alteração no ambiente celular, de forma que o gene \underline{a}_1 se tornava mutável. O gene \underline{dt} tem ação específica não agindo sobre outros genes estáveis ou instáveis.

Entretanto estudos mais detalhados foram realizados por MCCLINTOCK (1951, 1953, 1956, 1965) e PETERSON (1960). Estes auto-

res demonstraram uma alta mutabilidade em genes de milho, verificando que esta era controlada por genes independentes. Quando presentes, esses elementos controladores desencadeiam o processo de instabilidade. Uma característica desse elemento é que, em si, eles não dão fenótipo próprio, mas atuam em outro gene desencadeando o processo. O primeiro sistema de elementos controladores identificados foi o Ac-Ds (Ac = ativador ; Ds = dissociador) , sendo que quando o Ac está presente ele induz quebras cromossômicas num outro local (Ds) . A perda do pedaço terminal do cromossomo causa então o aparecimento de um gene recessivo. Outra característica desses elementos controladores, é a sua capacidade de transposição de um local do cromossomo para outro, ou mesmo para outro cromossomo. Portanto estes elementos controladores seriam os responsáveis pelo mecanismo de transposição de material genético de um sítio doador para um sítio receptor, durante os processos de duplicação cromossômica na mitose. Foram também analisados alguns casos de loci autônomos ; estes, não requerem nenhum ativador para sofrer mutação. Os alelos que surgem podem também ser instáveis sofrendo novas mutações para níveis de expressão mais altos ou mais baixos, sendo que o grau de instabilidade genética é marcadamente influenciado pela temperatura.

Em relação ao mecanismo de transposição, GREENBLATT e BRINK (1962 , 1963) e GREENBLATT (1966) , sugeriram que o fenômeno deveria ocorrer durante a duplicação e ainda denominaram de "elementos movimentadores" aos elementos controladores descritos anteriormente. Basearam-se também no aparecimento de manchas gêmeas no grão de milho, utilizando o alelo variegado P_{VV} que possui o elemento transponível modulador (Mp).

Foi sugerido que "a transposição ocorre somente quando o cromossomo e o elemento transponível modulador (Mp) estão se replicando. Apenas a nova cópia de Mp sofre transposição ; o sítio receptor do Mp não pode ter se replicado durante a transposição e o Mp transposto pode replicar uma segunda vez". Portanto nos casos de instabilidade descritos em milho, transposição de material genético e duplicação cromossômicas parecem estar envolvidos. Provavelmente o mesmo ocorre em *Drosophila melanogaster*, pois, GREEN (1967) descreveu a instabilidade no loco "white" que apresentou mutação para diferentes estados alélicos, desde o selvagem até o branco. Este mesmo pesquisador (GREEN, 1969), estudou quatro tipos de transposições independentes de um segmento do gene "white" para o cromossomo III de *D. melanogaster*. Através de análises genéticas observou a reversão de w^c para w^t, e isso ocorria quando o elemento controlador era liberado. Portanto a instabilidade ocorria quando o elemento controlador era liberado ou transposto para outro cromossomo.

Um outro caso bem analisado foi o descrito por BURNS e GERTSEL (1967), que estudaram um caso de instabilidade em híbridos de *Nicotiana tabacum* x *Nicotiana otophora*. A instabilidade de um segmento heterocromático foi associada ao aparecimento de variegação nas flores e este segmento heterocromático estava ligado ao alelo Co^V para a coloração cermin, que por sua vez se localizava numa região eucromática. Nas divisões mitóticas poderiam ocorrer quebras do bloco de heterocromatina levando à perda de Co^V e conseqüentemente a produção de setores variegados.

Os fatores ambientais devem influir nos sistemas mutáveis, através da regulação gênica e não diretamente sobre os genes que apresen-

tam alta mutabilidade (FINDIANE, 1973).

Ainda em organismos superiores, RHOADES e DEMPSEY (1973) atribuíram a formação de mosaico nas sementes de milho à perda de segmentos cromossômicos da série A, induzida pelos cromossomos B. A perda de cromatina foi restrita aos cromossomos que possuíam "knobs", sendo causada por falha na replicação dos "knobs" heterocromáticos.

2.1.2 - Instabilidade em microrganismos de modo geral

Do mesmo modo como para os organismos superiores, casos de instabilidade mitótica tem sido descritos e analisados em vários microrganismos.

Também em microrganismos, encontram-se trabalhos que falam de elementos controladores, como responsáveis pela instabilidade. Um exemplo é o de NEWCOMBE (1953) que relata sobre um padrão complexo de radiação, induzindo instabilidade em *Streptomyces*, observando mutações instáveis e estáveis, como também alterações morfológicas.

Os estudos sobre genes mutadores em *Escherichia coli* começaram com os trabalhos de TREFFERS e Col. (1954) que registraram uma alta taxa de mutação para resistência a estreptomicina. Posteriormente GOLDSTEIN e SMOOT (1955), descreveram uma linhagem com alta taxa de mutação para auxotrofia. Para ambos os casos a alta taxa de mutação era devido a genes mutadores. Uma alta taxa de mutação para resistência a estreptomicina também foi observada por SKAAR em 1956, que identificou um

fator mutador (Mut⁺), ligado ao locus da leucina.

Revertantes de linhagens de *Salmonella typhimurium* dependentes de leucina (leu⁻) para leu⁺ numa alta taxa foram observados por SMITH-KEARY (1958). Posteriormente DAWSON e SMITH-KEARY (1963) verificaram que a causa da instabilidade estava ligada ao locus supressor de leucina (su leu^A). Eles observaram também que a diminuição da instabilidade era devido a perda desses elementos controladores ou quando estes se integravam de modo estável a algum sítio. Estes elementos controladores podiam também sofrer transposição para outros sítios afins provocando instabilidade deste locus e estabilização do locus original; propuseram então o termo "epissomos controladores" aos elementos responsáveis pela instabilidade, sendo os mesmos idênticos aos "elementos controladores" já descritos por McCLINTOCK, em milho.

Casos de instabilidade também foram observados em *Neurospora crassa*, sendo que o primeiro caso foi descrito por BARNETT e SERRES (1963). Para este caso o sítio instável existia sob a forma de dois alelos altamente mutáveis. Foi sugerido que a alta instabilidade era devido a mudanças de pares de base, do tipo transição.

Também em *N. crassa*, NEWMEYER (1965) e NEWMEYER e TAYLOR (1967) descreveram casos de instabilidade resultantes de uma inversão pericêntrica. As progênes inicialmente tinham crescimento reduzido e eram fortemente pigmentadas; posteriormente, nas mesmas condições de incubação produziam setores cujo crescimento era semelhante ao do tipo selvagem. Verificaram que quando ocorria permuta simples na região invertida, eram originados dois produtos, um duplicado e o outro deficiente

para o mesmo segmento, sendo que as progênies que apresentavam duplicações eram instáveis mitoticamente, produzindo setores que se assemelhavam ao tipo selvagem: os deficientes para o mesmo segmento, eram letais.

Estudos sobre genes mutadores foram feitos por COX e Col. (1972), em *Escherichia coli*. Foi feito um mapeamento dos genes observando-se que alterações no mecanismo de regulação gênica, tendo como resultado a formação do produto ou mesmo a ausência do mesmo, produziam mutações e estas eram causadas principalmente por alterações de bases. Foi também sugerido que grande parte dos mutadores conhecidos estão envolvidos nos processos de replicação, recombinação e reparação do DNA.

Estudos sobre a instabilidade vegetativa nos Ascomicetos foram realizados por LENHART (1973.a). Ele considerou como mecanismo da instabilidade: a mutação cromossômica, a aneuploidia, a heterocariose, os diplóides e seus segregantes e os fatores extranucleares. O mesmo pesquisador (1973.b) estudou a instabilidade mitótica induzida por luz ultravioleta no dermatófito *Microsporium gypseum*.

Genes mutadores foram também identificados em diversas linhagens de leveduras, sendo que como para *Escherichia coli*, provocavam alterações de bases, tais como transições, transversões e adições-deleções (von BORSTEL e Col., 1973).

2.1.3 - Instabilidade em *Aspergillus nidulans*

Estudos sobre instabilidade mitótica em *A. nidulans* vem sendo conduzidos há mais de duas décadas e a instabilidade pode, em muitos casos ser explicada pelos mecanismos clássicos da Genética. Já em 1952, ROPER explicou o aparecimento de instabilidade através de permutas mitóticas e não disjunção conduzindo a haploidização de linhagens diplóides. Estudos intensivos foram realizados por PONTECORVO e Col. (1953) sobre a genética de *A. nidulans*, e é baseado na metodologia e genética desse clássico trabalho que muitos dados foram obtidos em *A. nidulans*. Em 1954, PONTECORVO e Col. continuando os estudos sobre a genética de *A. nidulans*, propuzeram dois mecanismos como responsáveis pela instabilidade mitótica, sendo um deles a distribuição irregular dos cromossomos na mitose e o outro a permuta mitótica. Por outro lado, evidências de recombinação mitótica em *A. nidulans*, tem fornecido novos métodos genéticos não somente para mapeamento de marcadores, mas também para revelações de aberrações, especialmente, translocações (PONTECORVO e KAFER, 1958; KAFER, 1958).

Em linhagens diplóides, pode ocorrer o fenômeno de haploidização, onde há perdas cromossômicas sucessivas (KAFER; 1960). No ano seguinte KAFER (1961) explicava o fenômeno de aneuplóidia, onde, por não disjunção mitótica, há perdas cromossômicas sucessivas até que o estado haplóide normal seja alcançado.

Estudando a origem das translocações, KAFER (1965), verificou que é possível em *A. nidulans* detectar translocações por análises genéticas baseadas na segregação de marcadores em haplóides, produ -

zidos pelas recombinações mitóticas dos heterozigotos diplóides.

Um processo novo e espontâneo, dando instabilidade na mitose de *A. nidulans* foi primeiramente descrito por BAINBRIDGE e ROPER (1966), quando estes estudavam fatores genéticos que afetavam a morfologia do *A. nidulans*. Estudaram um variante que tinha como característica principal a morfologia "crinkled", e que se originou de cruzamento entre pais com morfologia normal. Este variante "crinkled" tinha taxa de crescimento reduzido e segregava em proporção constante. Os autores verificaram que esse novo variante carregava uma duplicação cromossômica, resultante de uma translocação não recíproca em um dos pais. Estas colônias "crinkled" mostraram instabilidade vegetativa, produzindo setores em graus variados e com crescimento e morfologia que se aproximavam da normal. Estes revertantes originavam-se provavelmente pela perda do segmento cromossômico em duplicata.

Estudando linhagens que haviam sofrido reversão para o gene meth₁, que condiciona deficiência nutricional para metionina, BALL (1966, 1967), verificou que as translocações cromossômicas causam muitas vezes instabilidade vegetativa, tendo como resultado tipos que não mais requeriam este aminoácido. A análise genética mostrou a presença de uma translocação não recíproca entre os cromossomos III e V.

JINKS (1966), explicou outros tipos de instabilidade devido a presença de fatores citoplasmáticos.

Para explicar o fenômeno da instabilidade, NGA e ROPER (1966) sugeriram vários outros mecanismos, entre eles: deleção terminal, mutação, permuta mitótica e permuta desigual entre cromátides ir

mãs durante a mitose, sugerindo que a causa mais provável da instabilidade fosse a permuta desigual entre cromátides irmãs. Trabalhando ainda com linhagens que apresentavam duplicações cromossômicas, de *A. nidulans*, NGA e ROPER (1968) utilizaram linhagens que tinham marcadores genéticos bem mais favoráveis para tal tipo de estudo. Estas linhagens tinham morfologia característica e taxa reduzida de crescimento, carregando uma duplicação de segmento do Grupo de Ligação I translocada para o Grupo de Ligação II. Esse segmento possuía três marcadores genéticos, sendo um para coloração de esporos, o que facilitava o estudo. Essa linhagem produz um certo número de tipos variantes, sendo que a maioria tem morfologia e taxa de crescimento semelhantes a da linhagem normal (setores melhorados), enquanto que outros tem morfologia alterada (setores deteriorados). A análise dos setores melhorados comprovou que eles ocorriam devido a perda preferencial do segmento duplicado translocado em vários graus, e que a perda era muitas vezes intersticial. Os setores deteriorados, que são altamente instáveis, surgem provavelmente devido a novas duplicações em tandem. A perda e aparente ganho de material genético ocorre provavelmente por um processo intra-cromossômico, desde que ambas as classes se originam sem evidência de permuta entre segmentos homólogos. Os autores ainda explicaram o aparecimento de setores melhorados e deteriorados, através de um processo de permuta mitótica entre os segmentos em duplicada podendo ocorrer, ou por permuta desigual entre cromátides irmãs, ou permuta em alça intra-cromossômica.

ROPER e NGA (1968) observaram, em trabalho posterior com *A. nidulans*, uma alta taxa de setores espontâneos vegetativos entre di-

plóides de uma linhagem com duplicação e uma linhagem haplóide normal.

Os efeitos exercidos pelas aberrações cromossômicas na não disjunção mitótica e meiótica foram realizados por POLLARD e Col. (1968). Verificaram estes pesquisadores que a taxa de não disjunção meiótica é muito baixa em cruzamentos entre linhagens normais, e que esta aumenta consideravelmente quando estão envolvidos linhagens com aberrações cromossômicas. Verificaram que o efeito da translocação foi mais pronunciado e tem um efeito sinérgico quando as duas linhagens cruzadas apresentam aberrações.

Através do estudo de várias linhagens haplóides e diplóides, com e sem translocação, com genomas balanceados e não balanceados, NGA e ROPER (1969), concluíram que a instabilidade era provocada por um desequilíbrio cromossômico e que as deleções cromossômicas produzidas eram restritas quase exclusivamente aos segmentos que provocavam instabilidade. Propuseram o termo de "não-conformidade mitótica" para este fenômeno de instabilidade.

Foi descrita e mapeada (BAINBRIDGE, 1970), uma linhagem de *A. nidulans* que apresentava uma translocação envolvendo os grupos de ligação III e VIII. A translocação das várias marcas foi do grupo de ligação III para o VIII.

O aparecimento de variantes melhoradas e deterioradas em linhagens duplicadas foi melhor estudado por AZEVEDO (1970, 1971) e AZEVEDO e ROPER (1970). A instabilidade das linhagens é variável segundo estes autores. A origem de deterioração morfológica e o grau de instabilidade foram atribuídos a novas duplicações em tandem no segmento duplica

do. A transposição desse material genético extra para outras regiões do genoma resultaria numa maior estabilidade. Analisaram diversos variantes deteriorados que foram localizados em todos os grupos de ligação de *A. nidulans*. Portanto todos os grupos de ligação podem conter mutações que determinam o caráter morfológico, havendo indicações de que há regiões de susceptibilidade particular a estas mudanças, principalmente nas regiões próximas ao centrômero. Uma revisão a respeito é a de ROOPER (1972) que afirma mais uma vez que linhagens de *A. nidulans* com o segmento cromossômico em duplicada (um em posição normal; um translocado para outro cromossomo) são instáveis na mitose.

Estudando derivativos de primeira e segunda ordem em *A. nidulans*, AZEVEDO (1973) descreve uma linhagem duplicada com maior instabilidade que apresentava uma translocação responsável pelo aumento da instabilidade. Observou ainda um derivativo mais estável que possuía um determinante de estabilização localizado no grupo de ligação VIII que reduz o número de variantes melhorados. ROSATO (1973), tentou obter derivativos com fenótipo melhorado em linhagens deterioradas de *A. nidulans*, através da eliminação de material genético extra. Analisou também derivativos deteriorados obtidos por agentes mutagênicos.

MENEZES (1974) analisando variantes deteriorados do fungo *A. nidulans*, verificou mais uma vez ser a duplicação cromossômica a responsável pela instabilidade mitótica, estudando casos de reversão do fenótipo deteriorado, devido a genes supressores. Verificou-se também que DNA exógeno aumentava a frequência de setores deteriorados.

Através de técnica especial de detecção de translocações, UPSHALL e KAFER (1974) detectaram algumas translocações e procuraram mostrar suas localizações em relação aos grupos de ligação. Esta técnica permite distinguir translocações recíprocas e não recíprocas.

Foi descrito por LEE e NGA (1974) uma linhagem com translocação VI - VIII e que apresenta um pequeno segmento do grupo de ligação VI em duplicata ; estes autores relatam que linhagens com duas duplicações atuam mutuamente no sentido da instabilidade mitótica.

O primeiro caso de translocação recíproca em *A. nidulans* (I ; VIII) foi descrito por GLORIA e KAFER (1974). O estudo mostrou ligações meióticas entre marcas de diferentes grupos de ligação.

PARAG e ROPER (1975); estudaram o controle da instabilidade cromossômica.

AZEVEDO (1975) através da análise genética mostrou que o aumento da instabilidade em variantes menos estáveis foi devida a uma translocação envolvendo os grupos de ligação V - VIII. O aumento da estabilidade em variantes mais estáveis foi devida a um fator recessivo (stf₁). Em condições homozigóticas esse fator também reduz o número de setores em uma linhagem diplóide.

Mutações aumentando não-disjunção em *A. nidulans*, foram estudadas por UPSHALL (1975).

ZUCCHI (1975), estudando a instabilidade de duas linhagens duplicadas, com duplicação III - VIII verificou mais uma vez ser a duplicação cromossômica a responsável pela instabilidade mitótica; através de estudos genéticos dos determinantes de deterioração obtidos,

a autora evidenciou uma alta frequência de recessivos letais e de permutas mitóticas envolvendo os segmentos em duplicata.

BIRKETT e ROPER (1975) relataram que a linhagem com duplicação III - VIII, carregando translocação VI - VII produz setores mais evidentes, mostrando uma pequena redução na conidiação e aparente aumento na taxa de crescimento como única variação fenotípica. Quando feitas sub-culturas desses conídios, alguns mostraram características de linhagens duplicadas.

CASE e ROPER (1975) verificaram que a instabilidade em diploides com duplicação cromossômica é devida a permuta mitótica em 50% dos casos.

LIEBER (1975 e 1976), em estudo sobre influência de fatores ambientais, diz que provavelmente a instabilidade de *A. nidulans*, ou a instabilidade ou a mutabilidade de outros organismos seja governado ou afetado por um fator ambiental, e que provavelmente a frequência de deleções no grupo de ligação III duplicado esteja relacionado com baixas temperaturas, enquanto que a frequência de deleções no cromossomo I duplicado é aumentada devido a altas temperaturas.

BALL e AZEVEDO (1976) mostraram em revisão a importância da instabilidade genética nos fungos industriais, visando obter linhagens mais produtivas e menos susceptíveis a degenerações. Estes autores relataram que os segregantes mais instáveis são os aneuploides ou os que carregam duplicações cromossômicas parciais. Eles ainda dizem que é possível estabilizar uma linhagem por meios genéticos ou pelo controle ambiental de crescimento, e dessa maneira, em casos apropriados é possível prevenir a produção de degeneração.

2.1.4 - Efeitos dos agentes químicos e físicos, sobre a instabilidade em linhagens duplicadas de *Aspergillus nidulans*

2.1.4.1 - Efeitos dos agentes químicos

COOKE e Col. (1970), realizaram estudos sobre a instabilidade em linhagens duplicadas de *A. nidulans*, utilizando o azul de tripan adicionado ao meio de cultura sólido. Foi verificado um aumento na instabilidade em linhagens duplicadas.

Os efeitos exercidos pela cafeína em linhagens duplicadas, foram descritas por ROPER e Col. (1972); verificaram eles que a cafeína aumenta a frequência de deleções nos segmentos duplicados.

Uma possível explicação para o fenômeno é que a cafeína estimula o mecanismo que em linhagens não balanceadas produz erros de replicação conduzindo a deleções.

Tratando uma linhagem duplicada (duplicação no grupo de ligação I) com o 7, 8, 12-trimetilbenzeno antraceno, LEE e NGA (1973) obtiveram uma linhagem que apresentava além da duplicação já existente, uma translocação VI - VIII. Essa linhagem produzia grande quantidade de peritécios quando cultivada em meio vegetativo. Através de análises mitóticas e meióticas, verificaram a presença de uma pequena duplicação na translocação VI - VIII, responsável pelo fenótipo alta produção de peritécios.

AZEVEDO e Col. (1975) mostraram que o brometo de etídio e o vitavax reduzem o número de setores melhorados, agindo como um agente estabilizante para linhagens duplicadas instáveis. Por outro lado, o fungicida cloroneb, aumenta a instabilidade.

2.1.4.2 - Efeitos dos agentes físicos

NGA (1968), verificou as mais variadas translocações em 35, dentre 58 isolados de *A. nidulans* após a irradiação dos conídios com raios gama. As linhagens haplóides translocadas eram morfológicamente normais e vegetativamente estáveis.

Realizando estudos com uma linhagem duplicada do *A. nidulans* que produzia em média 3,2 setores por colônia, AZEVEDO (1973), selecionou dois variantes após irradiação com luz ultravioleta, sendo um deles mais estável que a linhagem original e o outro mais instável. Analisando geneticamente esses variantes, o autor verificou que o mais instável apresentava uma translocação, que era responsável pelo aumento da instabilidade. O variante mais estável, apresentou um determinante de estabilidade localizado no grupo de ligação VIII, que reduzia o número de setores melhorados.

PARAG e ROPER (1975), trabalhando com linhagem de *A. nidulans* que carrega a duplicação I - II, observaram uma alta instabilidade por luz ultra-violeta.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Símbolos e fenótipos das linhagens usadas no presente trabalho

<u>Símbolos</u>	<u>Fenótipos</u>
<u>Acr</u> ₁	Resistência para acriflavina
<u>ad</u> ₂₀	Requisito para adenina
<u>bi</u> ₁	Requisito para biotina
<u>cha</u>	Conídios chartreuse
<u>facA</u> ₃₀₃	Incapaz de crescer em meio contendo acetato como única fonte de carbono
<u>gal</u> ₁	Incapaz de crescer em meio contendo galactose como única fonte de carbono

<u>Símbolos</u>	<u>Fenótipos</u>
<u>lys</u> ₅	Requisito para lisina
<u>meth</u> ₁	Requisito para metionina
<u>nic</u> ₈	Requisito para ácido nicotínico
<u>paba</u> ₆	Requisito para ácido <u>p</u> -aminobenzóico
<u>pro</u> ₁	Requisito para prolina
<u>pyro</u> ₄	Requisito para piridoxina
<u>ribo</u> ₂	Requisito para riboflavina
<u>s</u> ₃	Requisito para tiosulfato
<u>su</u> ₁ <u>ad</u> ₂₀	Supressor do mutante <u>ad</u> ₂₀
<u>y</u>	Conídios amarelos
<u>w</u> ₃	Conídios brancos

3.2 - Linhagens utilizadas

As linhagens usados no presente trabalho foram fornecidas pelo Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, do Instituto de Genética, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, SP. ; as mesmas são originárias dos estoques da Universidade de Glasgow, Escócia.

3.2.1 - Linhagens haplóides

a - Linhagem pro₁ , paba₆ , y

Esta linhagem apresenta conídios amarelos e é deficiente para a síntese de prolina e ácido p-aminobenzóico.

b - Linhagem bi₁ , meth₁

Esta linhagem apresenta conídios verdes e é deficiente para a síntese de biotina e metionina.

c - Linhagem su₁ ad₂₀ , y , ad₂₀ , paba₆ , Acr₁ , lys₅ , cha

Esta linhagem apresenta conídios chartreuse, é deficiente para a síntese de adenina, tendo também uma supressão para adenina, é resistente a acriflavina e deficiente para a síntese de lisina e ácido p-Aminobenzóico.

d - Linhagem MSE (Master Strain E de McCULLY e FORBES, 1965)

Esta linhagem apresenta marcadores genéticos em cada um dos oito grupos de ligação.

3.2.2 - Linhagem diplóide

a - Linhagem bi₁//MSE

Resultante do cruzamento entre a linhagem bi₁ deficiente para a síntese de biotina, e a linhagem MSE .

3.3 - Meios de cultura e soluções usadas

3.3.1 - Meio mínimo (PONTECORVO e Col., 1953)

NaNO ₃	6,0 gramas
KH ₂ PO ₄	1,5 gramas
KCl	0,5 grama
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 grama
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Glicose	10,0 gramas
Ágar	15,0 gramas
Água destilada	1,0 litro
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1 N	

3.3.2 - Meio mínimo à (4% de ágar)

Este meio é preparado da mesma maneira que o meio mínimo (PONTECORVO e Col., 1953) , sendo que a quantidade de ágar adicionada a um litro de meio é 40,0 gramas.

3.3.3 - Meio mínimo mais galactose

Prepara-se da mesma forma que o meio mínimo, (PONTECORVO e Col., 1953) , apenas substituindo-se a glicose por igual quantidade de galactose como fonte de carbono.

3.3.4 - Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo

Adiciona-se ao meio mínimo comum (sem ágar), 2% de meio completo, distribui-se em tubos (2,5 ml em cada) e após autoclavação conserva-se em refrigerador.

3.3.5 - Meio completo (PONTECORVO e Col., 1953)

Adiciona-se ao meio mínimo:

Peptona	2,0 gramas
Caseína hidrolizada	1,5 gramas
Extrato de leveduras	0,5 grama

Solução de vitaminas 1,0 mililitro
Ácido nucléico de leveduras 2,5 mililitros
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1 N

3.3.6 - Meio de acetato de amônio (APIRON, 1962)

Acetato de amônio 12,0 gramas
 KH_2PO_4 3,0 gramas
NaCl 2,0 gramas
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 grama
 FeSO_4 traços
 ZnSO_4 traços
Ágar 15,0 gramas
Água destilada 1,0 litro
pH ajustado para 6,1 com NaOH 4% ou HCl 1 N

3.3.7 - Solução de vitaminas

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

A solução é esterilizada em vapor fluente por três dias consecutivos e guardada em frasco escuro no refrigerador, sob clorofórmio.

3.3.8 - Ácido nucléico de leveduras hidrolizado

Colocou-se 2,0 gramas de ácido nucléico de leveduras em 15,0 ml de HCl 1 N e 2,0 gramas do mesmo ácido nucléico de leveduras em 15,0 ml de solução normal de hidróxido de sódio. As soluções foram aquecidas em banho-maria a (100°C) durante vinte minutos e, em seguida, misturadas. O pH foi ajustado a 6,0 e a solução restante foi filtrada a quente. O volume foi ajustado para 40 ml, e a preparação foi guardada no refrigerador sob clorofórmio.

3.3.9 - Solução salina

Prepara-se uma solução de cloreto de sódio 0,85%, dissolvendo-se o sal em água destilada. Coloca-se 9,0 ml da solução em frascos e autoclava-se

3.3.10 - Solução de Tween-80

Adiciona-se Tween-80 à água destilada numa concentração de 0,1% (v/v). Coloca-se 2,5 ml da solução em tubos de ensaio, autoclava-se e conserva-se em refrigerador.

3.3.11 - Solução de p-fluorofenilalanina (p-FA)

Prepara-se uma solução de p-fluorofenilalanina 1% , dissolvendo-se o mesmo em água destilada. Esteriliza-se a solução em banho-maria por quinze minutos e conserva-se em refrigerador a 4° C.

3.3.12 - Solução de 1,4-dicloro-2,5-dimetoxil-benzeno (Cloroneb)

Foi preparada uma solução de cloroneb a 1% , dissolvendo-se o mesmo em água destilada esterilizada. Agitou-se bem a solução, e leva-se ao banho-maria por alguns minutos para facilitar a dissolução do fungicida.

3.3.13 - Suplementos adicionados ao meio mínimo

Solução estoque (100 ml de H ₂ O)	Quantidade adicionada a 200,0 ml de meio de cultura	Concentração final no meio de cultura
Prolina 1,0 g	1,0 ml	50,0 µg/ml
Ácido p-aminobenzóico 140,0 mg	1,0 ml	7,0 µg/ml
Biotina 4,0 mg	1,0 ml	0,2 µg/ml
Adenina 1,4 g	1,0 ml	70,0 µg/ml
Pirodoxina 20,0 mg	1,0 ml	1,0 µg/ml
Tiossulfato de sódio 1,0 g	1,0 ml	50,0 µg/ml
Metionina 1,0 g	1,0 ml	50,0 µg/ml
Ácido nicotínico 0,1 g	1,0 ml	5,0 µg/ml
Riboflavina 0,1 g	1,0 ml	5,0 µg/ml
Lisina 1,0 g	1,0 ml	50,0 µg/ml

3.4 - Técnicas gerais empregadas

3.4.1 - Esterilização e temperatura usada

A esterilização dos meios e soluções foi sempre realizada em autoclave por quinze minutos, à pressão de 1 atmosfera e à temperatura de 120°C. Em todos os experimentos a temperatura de incubação foi de 37°C.

3.4.2 - Placas de análise

No decorrer do trabalho foram utilizadas placas de Petri comuns (9 cm de diâmetro por 2 cm de altura). A quantidade de meio foi sempre ao redor de 25 ml.

O tipo de meio utilizado sofreu variações dependendo da finalidade da análise.

Para a determinação dos requisitos nutricionais de segregantes mitóticos ou meióticos, foram utilizadas placas de Petri com Meio Completo (MC) com Meio Mínimo (MM), com meio mínimo mais todos os requerimentos envolvidos no cruzamento (MM + T) e com Meio Mínimo mais todos os requerimentos exceto o que estava sob análise. Foram utilizados ainda placas com Meio Mínimo mais todos os requisitos e Galactose (MM + T + Gal) e placas com meios acetato mais todos os requisitos (MM + T + Ac).

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

3.5 - Preparo das linhagens para irradiação

Conídios das linhagens bi₁, meth₁, pro₁, paba₆, y e b₁//MSE foram suspensos separadamente em Tween 80 (2,5 ml) e agitados por um minuto para que as cadeias de conídios fossem desagregadas; a seguir foi feita a contagem em hematómetro, para se ter uma idéia do número de conídios por ml e posteriormente feitas as diluições em salina de tal maneira que na última se tenha um número de conídios que varie de 30 a 300 colônias por placa (0,1 ml da suspensão).

O próximo passo foi semear 0,1 ml das duas últimas diluições em MC, espalhar com alça de "Drigalsky", e incubar por 24 a 48 horas. Após esse tempo colônias isoladas foram semeadas em tubos de MC inclinado e incubadas por 48 horas; além disso outras colônias foram suspensas em Tween 80, contadas em hematómetro de maneira a ter aproximadamente 10^7 conídios por ml; 1 ml da suspensão de conídios em Tween foi colocado em 9 ml de salina, obtendo-se assim suspensão de esporos a partir de uma só colônia (10^6 esporos/ml).

3.6 - Irradiação dos conídios em meio sólido e meio líquido com raios gama

Suspensões de esporos obtidas pelo processo descrito no ítem 3.5 , foram irradiadas com raios gama (fonte de ^{60}Co , do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA). A irradiação foi feita com 20 kr , 40 kr , 60 kr , 80 kr e 100 kr , em todas as três linhagens, ou seja, \underline{bi}_1 , \underline{meth}_1 , \underline{pro}_1 , \underline{paba}_6 , \underline{y} e $\underline{bi}_1//\text{MSE}$. Foi feito um controle, isto é, as mesmas linhagens foram utilizadas sem sofrer o processo de irradiação. Foram também irradiadas as mesmas linhagens, em MC inclinado

3.7 - Curvas de sobrevivência

Os conídios irradiados no meio completo sólido inclinado (MC) foram coletados e suspensos em Tween 80 , contados em hematómetro , realizando-se em seguida as diluições necessárias, bem como sua semeadura em placas de MC .

Para os conídios irradiados em meio líquido (salina) , foram feitas as diluições necessárias, bem como sua semeadura em placas de MC.

Em seguida todo o material foi incubado por 72 horas, e após decorrido esse tempo foram contadas as colônias por placa e estimada a porcentagem de sobrevivência relativa à suspensão não irradiada. O mesmo procedimento foi utilizado em linhagens sem irradiar (controle).

3.8 - Transferência de microcolônias monospóricas

Microcolônias monospóricas foram transferidas uma a uma, para o centro de placas de Petri contendo meio completo, as quais permaneceram incubadas por sete dias. Esta técnica foi utilizada para verificar a produção e número de setores por placa, bem como medir o diâmetro e observar a morfologia colonial.

3.9 - Técnicas de análise genética

3.9.1 - Obtenção de heterocário

Utilizou-se o mesmo método descrito por PONTECORVO e Col. (1953). Heterocários foram feitos para as linhagens haplóides em estudo, ou seja: pro₁, paba₆, y e bi₁; meth₁ irradiadas e linhagem MSE. Para a obtenção de heterocário foi colocado cerca de 10⁷ confídios/ml da linhagem MSE e cerca de mesma quantidade de cada linhagem separadamente (estas linhagens requerem diferentes fatores de crescimento), em 2,5 ml de MM líquido suplementado com 2% de MC líquido, o que permitiu apenas pequena germinação dos confídios. Após 72 a 96 horas de incubação, foi observado a formação do heterocário (película na superfície do meio), a qual foi transferida para placas contendo MM. Originaram-se setores heterocarióticas que continham núcleos geneticamente diferentes na mesma hifa, o que permitiu o crescimento. Foram

feitos dez cruzamentos para cada linhagem.

Para análise das linhagens duplicadas, obteve-se o heterocário como o mencionado acima, sendo que dependendo das deficiências nutricionais das linhagens usadas, o cruzamento foi feito com a linhagem MSE ou com a linhagem chartreuse.

3.9.2 - Análise mitótica

A análise mitótica foi efetuada através do ciclo parassexual, segundo o método descrito por ROPER (1952). Após ter-se obtido o heterocário este foi transferido para MM onde houve formação de setores heterocarióticos. Formaram-se conídios que, por serem na maioria haplóides, não se desenvolvem no MM. Entretanto, na hifa heterocariótica pode haver uma fusão de núcleos haplóides, formando-se núcleos diplóides heterozigotos, que são capazes de crescer em MM. Semeando-se grande quantidade de conídios (cerca de 10^7 conídios por ml) em placas com MM, foi possível o isolamento de colônias diplóides heterozigotas.

O reconhecimento dos diplóides foi feito através da coloração, pelo crescimento em MM e pelo tamanho dos conídios. A medição dos conídios foi feita ao microscópio com ocular graduada, tomando-se cadeias com cinco conídios, em lâminas com lisol a 1/10, que favorece a manutenção dos conídios em cadeia. (PONTECORVO e Col., 1954). Os diplóides obtidos foram purificados e amostras deles foram estocados em MM.

Os diplóides assim obtidos foram induzidos a haploidização, e esta foi realizada ou com p-flurofenilalanina (pFA) que inibe o crescimento de diplóides, permitindo o crescimento de setores haplóides (MORPURGO, 1961), ou com o fungicida Cloroneb, que age da mesma maneira (AZEVEDO e SANTANA, 1975). A técnica usada na indução de haploidização foi o de adicionar 1,5 ml de uma das soluções haploidizadoras a 200 ml de MC numa temperatura de cerca de 45°C, e a seguir o meio foi distribuído em placas de Petri. Nessas placas assim preparadas foram inoculados em quatro pontos os conídios diplóides e após oito dias de incubação surgiram os setores haplóides (brancos, amarelos ou verdes, dependendo da linhagem em estudo). Estes setores haplóides foram purificados em MC e incubados por 72 horas, e a seguir foram feitas as placas mestras com 25 pontos (1 + 5 x 5) em MC.

A seguir foram feitas análises para os requisitos nutricionais, sendo usadas placas de análise para cada requisito nutricional envolvido em cada cruzamento e mais três placas controle, sendo uma de MC outra de MM e a outra de MM + T. A réplica para todas as placas foi feita a partir de placa mestra utilizando-se um replicador de níquel-cromo.

As leituras para cada placa foram feitas após 24, 48 e 72 horas; anotando-se crescimento e o não crescimento das colônias, como também a coloração das mesmas.

3.9.3 - Análise meiótica

Esta análise baseia-se no ciclo sexual do fungo, através da análise de ascósporos produzidos em peritécios, segundo o método descrito por PONTECORVO e Col. (1953). Esta análise exige a ocorrência de peritécios híbridos contendo ascósporos segregantes, resultantes da meiose de zigotos formados pela cariogamia de núcleos geneticamente diferentes.

Os peritécios são obtidos após dez dias de incubação do heterocário obtido da mesma maneira que para a análise mitótica, porém as placas contendo heterocários são vedadas com fita celulósica e incubadas por dez dias.

Os peritécios assim obtidos são rolados em placas com meio contendo 4% de ágar com o auxílio de um fio de platina e lupa para libertá-los dos confídios e das células de Hülle aderentes. Cada peritécio é rompido na parede de um tubo de ensaio contendo 2,5 ml de solução de Tween 80 com o auxílio de uma pipeta, para que os ascósporos sejam libertados. Semeou-se com a mesma pipeta 0,1 ml de cada suspensão de ascósporos em placas contendo MC e espalhou-se com alça de "Drigalsky". As suspensões foram conservadas em refrigerador a 4°C. As placas foram incubadas por 48 horas e após este período de tempo determinou-se quais suspensões continham peritécios híbridos. Os não híbridos foram descartados.

Após obtenção desses peritécios foram escolhidos cinco de cada cruzamento e semeados em três concentrações (sem diluir 10^{-1} , 10^{-2}), em várias placas de MC. Após 72 horas de incuba -

ção contou-se as colônias tentando separar seus fenótipos observando-se a morfologia das mesmas. Colônias possivelmente com duplicações cromossômicas foram inoculadas em MC e após sete dias observou-se a presença ou não de setores morfológicos das colônias para verificação de fenótipo típico de duplicação cromossômica (BAINBRIDGE e ROPER, 1966 ; NGA e ROPER, 1968 ; AZEVEDO e ROPER, 1970 ; AZEVEDO, 1971) .

Continuando a análise meiótica, um desses cinco peritécios híbridos foi escolhido e os ascospóros foram semeados em cinco placas contendo MC . Após 72 horas de incubação, foram novamente contadas as colônias observando-se seu fenótipo.

Foram feitas placas mestras das colônias brancas, amarelas e verdes, conforme o cruzamento. Após 72 horas de incubação foram replicados para placas de análise (contendo os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento como já foi relatado anteriormente).

Após 24 , 48 e 72 horas de incubação, fez-se as leituras das placas de análise, anotando-se as colônias que cresceram e as que não cresceram.

3.9.4 - Seleção de colônias com duplicações cromossômicas

A seleção de colônias com duplicações cromossômicas foi feita da seguinte maneira: Colônias que após sete dias de incubação apresentaram setores e/ou morfologia típica, foram isoladas pela técnica de microcolônias monospóricas, e para tanto foi feita uma suspensão de confídios em solução de Tween 80 , do centro destas colônias que a-

presentaram setores bem como uma diluição adequada ; posteriormente foram semeadas em placas com MC e incubadas por doze horas ; destas placas foram retiradas as micro-colônias com o auxílio de fio de platina sob um estereomicroscópio e as mesmas foram inoculadas no centro de placas com MC e incubadas por sete dias. Foram feitas várias placas e foi considerada como colônias que produzem setores somente aquelas provenientes de micro-colônias. Das colônias que produziam setores, foram feitas dez inoculações em dez placas com MC a partir de cada derivado de micro-colônia que apresentou um ou mais setores por placa. As placas foram também incubadas por sete dias ; após esse período foi medido o diâmetro da colônia, observada a sua morfologia, cor e contagem de setores, observando também se estes eram setores melhorados ou deteriorados.

Selecionadas as colônias possivelmente portadoras de duplicações cromossômicas, cada uma destas foi inoculada em vinte placas com MC . Foi também feito um controle em vinte placas com MC utilizando-se linhagem haplóide normal de bi₁ , meth₁ , e em outras vinte placas com MC a linhagem normal pro₁ , paba₈ , y . Todas as placas foram incubadas por sete dias, sendo medido no final desse período o diâmetro bem como feita a contagem de setores por placa e calculada a média de crescimento e número de setores para cada linhagem em estudo.

3.9.5 - Análise genética das linhagens com duplicação cromossômica

Linhagens possivelmente contendo duplicações foram replicadas cada uma em dez placas com a finalidade de ser observado se era constante a produção de setores. Posteriormente, foi feita a determinação das deficiências nutricionais dos centros e dos setores destas colônias.

Tendo sido feita a determinação das deficiências nutricionais dessas linhagens, bem como a comprovação da sua instabilidade foi feita a análise mitótica e meiótica das mesmas. Para ser realizada esta análise se fez necessário a escolha ou obtenção (quando era o caso) de linhagens adequadas para o cruzamento.

As linhagens usadas para cruzamento foram, MSE, charreuse, ou linhagens obtidas no setor de microrganismos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP, Piracicaba, SP., originadas de segregantes meióticos da linhagem pro₁, paba₈, y x MSE.

A análise mitótica e meiótica foi feita usando as técnicas descritas nos itens 3.9.2 e 3.9.3, respectivamente.

4 - RESULTADOS

4.1 - Número, porcentagem relativa e curva de sobrevivência dos conídios após irradiação com raios gama em meio sólido e meio líquido

Os conídios das linhagens haplóides (bi₁, meth₁ e pro₁, paba₆, y), bem como os da linhagem diplóide bi₁//MSE, foram tratados com raios gama nas doses de 0, 20, 40, 60, 80 e 100 kr, em meio sólido e líquido. Assim foi possível calcular a porcentagem relativa de sobrevivência, bem como construir-se as curvas de sobrevivência das linhagens. Os Quadros 1, 2 e 3, mostram os resultados do número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes aos raios gama no meio sólido e no meio líquido para as três linhagens, respectivamente. Nas Figuras 2 e 3, estão representadas as curvas de sobrevivência em meio sólido e líquido, respectivamente, para as três linhagens em estudo.

QUADRO 1 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes aos raios gama

Linhagem bi₁ ; meth₁

Dose kr	Meio sólido (MC inclinado)				Meio líquido (salina)			
	Conídios viáveis/ml		Porcentagem re- lativa de sobre- vivência		Conídios viáveis/ml		Porcentagem re- lativa de sobre- vivência	
	1. ^a Repeti- ção	2. ^a Repeti- ção	1. ^a Re- petição	2. ^a Re- petição	1. ^a Repeti- ção	2. ^a Repeti- ção	1. ^a Re- petição	2. ^a Re- petição
0	$6,3 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$	100,0	100,0	$6,2 \times 10^6$	$9,0 \times 10^6$	100,0	100,0
20	$7,6 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5$	12,0	9,8	$9,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	11,3	22,2
40	$8,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	13,4	6,8	$1,5 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	1,8	2,7
60	$5,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	8,4	3,9	$5,4 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$	0,6	0,6
80	$2,4 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	3,8	0,5	$1,7 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$	0,2	0,4
100	$1,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	2,8	0,3	$1,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	0,2	0,2

QUADRO 2 - Número e porcentagem relativa de confídios sobreviventes aos raios gama
 Linhagem pro₁, paba₆, y

Dose kr	Meio sólido (MC inclinado)				Meio líquido (salina)				
	Confídios viáveis/ml		Porcentagem re- lativa de sobre- vivência		Confídios viáveis/ml		Porcentagem re- lativa de sobre- vivência		
	1. çao	2. çao	1. petição	2. petição	1. çao	2. çao	1. petição	2. petição	
0	7,0 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁷	100,0	100,0	1,8 x 10 ⁶	3,8 x 10 ⁶	100,0	100,0	100,0
20	1,9 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁶	2,7	10,0	9,4 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁶	52,0	44,7	48,3
40	1,6 x 10 ⁶	8,9 x 10 ⁵	2,3	8,9	8,1 x 10 ⁵	4,0 x 10 ⁵	45,0	10,5	27,7
60	1,3 x 10 ⁵	6,5 x 10 ⁶	1,5	6,5	1,8 x 10 ⁵	3,3 x 10 ⁵	10,0	8,6	9,3
80	1,8 x 10 ⁵	4,6 x 10 ⁵	0,2	4,6	2,2 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁵	12,0	5,2	8,6
100	5,6 x 10 ⁴	2,2 x 10 ⁵	0,1	2,2	1,2 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵	6,6	2,8	4,7

QUADRO 3 - Número e porcentagem relativa de confídios sobreviventes aos raios gama
Linhagem b_{11} /MSE

Dose	Meio sólido (MC inclinado)				Meio líquido (salina)					
	Confídios viáveis/ml		Porcentagem re- lativa de sobre- vivência		Confídios viáveis/ml		Porcentagem re- lativa de sobre- vivência			
	1. Repeti- ção	2. Repeti- ção	1. Re- petição	2. Re- petição	1. Repeti- ção	2. Repeti- ção	1. Re- petição	2. Re- petição		
0	$1,3 \times 10^7$	$7,7 \times 10^6$	100,0	100,0	$1,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	100,0	100,0	100,0	100,0
20	$6,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	46,1	38,9	$6,6 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5$	44,0	49,3	46,6	46,6
40	$3,1 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	23,8	2,9	$6,8 \times 10^4$	$3,3 \times 10^5$	4,5	20,6	12,5	12,5
60	$1,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	12,3	1,4	$5,4 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	3,6	6,2	4,9	4,9
80	$1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^4$	8,4	1,2	$4,0 \times 10^4$	$9,0 \times 10^4$	2,7	5,6	4,1	4,1
100	$6,0 \times 10^5$	$8,5 \times 10^4$	4,6	1,1	$1,5 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	1,0	3,1	2,1	2,1

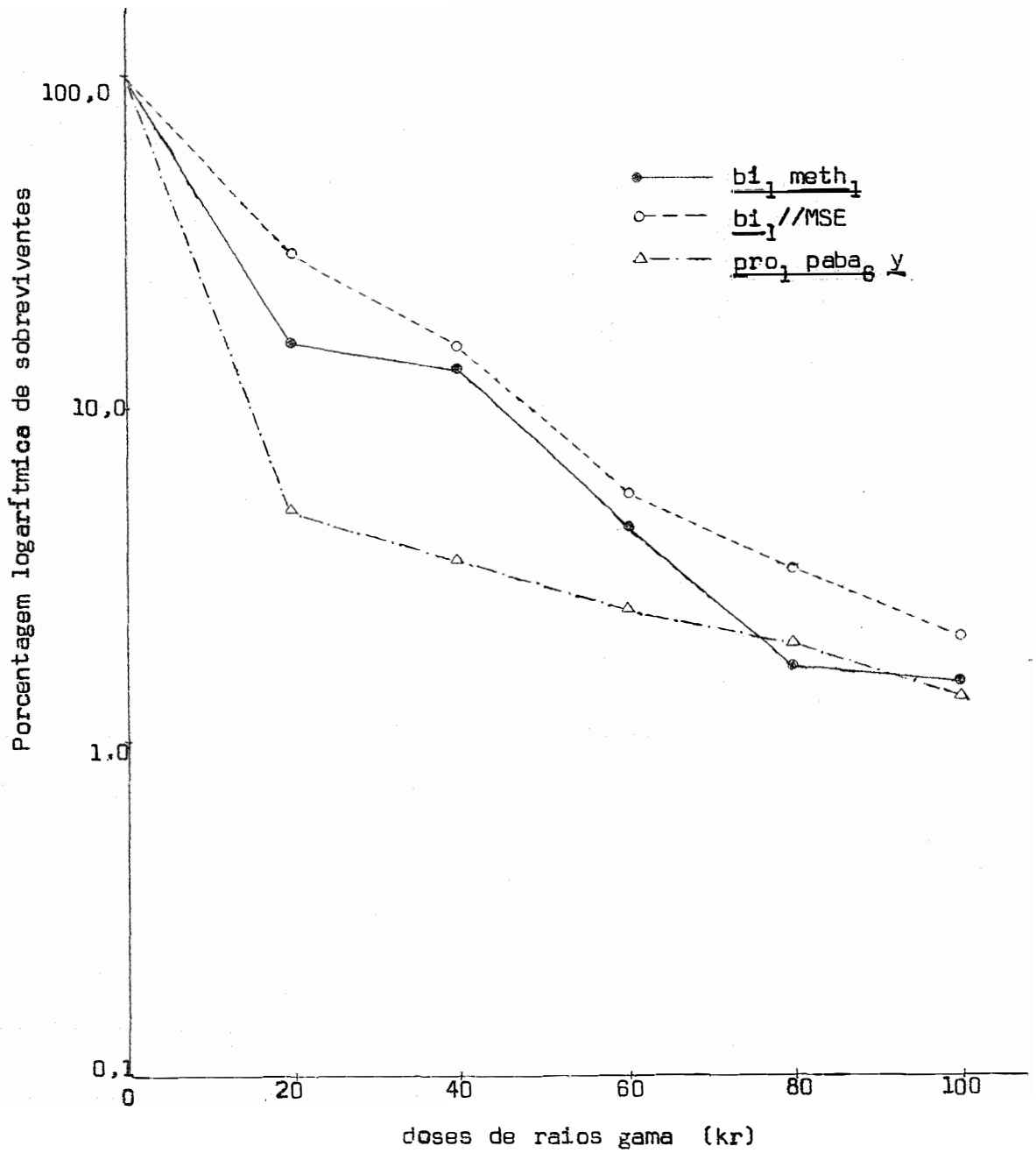


Fig. 2 - Curvas de sobrevivência à irradiação (raios gama)
Meio sólido
Linhagens: $bi_1 meth_1$; $bi_1 // MSE$; $pro_1 paba_6 y$

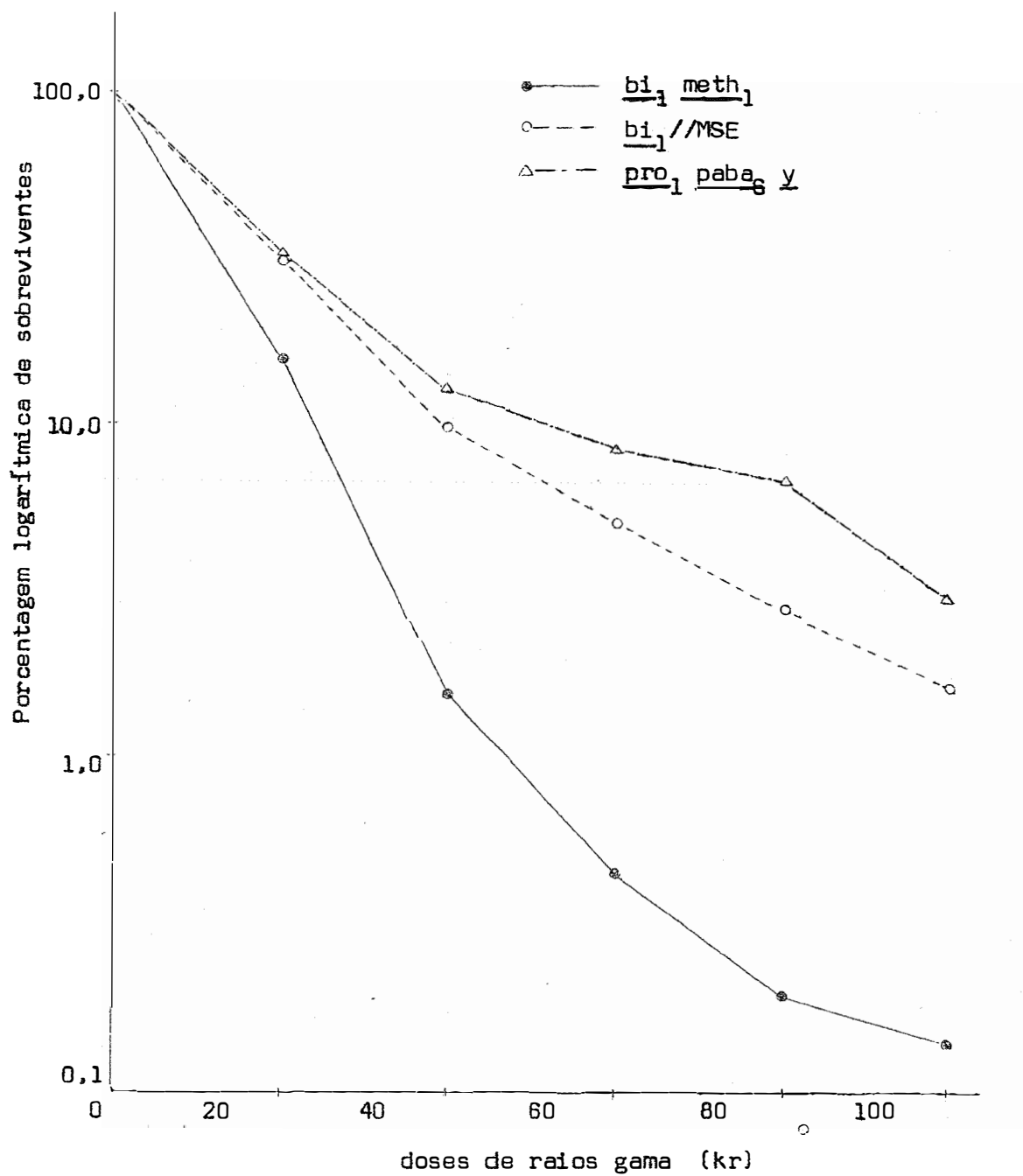


Fig. 3 - Curvas de sobrevivência à irradiação (raios gama)
Meio líquido

Linhagens: bi₁ meth₁ ; bi₁//MSE ; pro₁ paba₆ y

4.2 - Análise genética de colônias das linhagens pro₁ , paba₆ , y e bi₁ meth₁ após irradiação com raios gama

Colônias que cresceram após irradiação nas concentrações que produziram sobrevivência de 5% - 1% foram utilizadas para análise genética com a finalidade de verificar possíveis aberrações cromossômicas, provavelmente translocações.

4.2.1 - Análise mitótica de isolados da linhagem pro₁ , paba₆ , y após irradiação com raios gama

Dez isolados da linhagem pro₁ , paba₆ , y , após irradiação com raios gama e que foram escolhidas dentre as colônias sobreviventes à doses de irradiação que propiciam sobrevivência de 5% - 1% todas apresentando morfologia normal, foram submetidas a uma análise genética mitótica que permitiu verificar presença ou não de translocações cromossômicas nesses isolados. Esses isolados foram numerados de 1 até 10 e o resultado de uma típica análise mitótica realizada em um desses (isolado número 4) está apresentado no Quadro 4 . Os demais resultados da análise mitótica encontram-se nos Quadros A₁ a A₉ do Apêndice. Um resumo das diversas translocações detectadas nesses isolados estão no Quadro 5 .

QUADRO 4 - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 4//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos Nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	-Pro -Paba	+Gal	-Piro	+Ac	-s	-Nic	-Ribo
1	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
2	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
3	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
4	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
5	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
6	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
7	w	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
8	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
9	w	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
10	y	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
11	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
12	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
13	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
14	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
15	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
16	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
17	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
18	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
19	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
20	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
21	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
22	w	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
23	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
24	w	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
25	y	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
26	y	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+

Obs.: Legenda do Quadro 4 e subsequentes, consultar página 46 .

LEGENDA PARA TODOS OS QUADROS.

(+)	Crescimento positivo
(-)	Ausência de crescimento
y ⁺	Colônia com fenótipo verde
y	Colônia com fenótipo amarelo
w	Colônia com fenótipo branco
MC	Meio completo
MM	Meio Mínimo
MM + T	Meio mínimo mais todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento
-Pro-Paba	MM + T , menos prolina e ácido p-aminobenzóico
+ Gal	Meio mínimo galactose, mais todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento
- Piro	MM + T , menos piridoxina
+ Ac	Meio de acetato de amônio, mais todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento
- s	MM + T , menos tiosulfato de sódio
- Nic	MM + T , menos nicotinamida
- Ribo	MM + T , menos riboflavina
- Meth	MM + T , menos metionina
- sMeth	MM + T , menos tiosulfato de sódio e metionina
- Lis	MM + T , menos lisina
- Bi	MM + T , menos biotina

QUADRO 5 - Sumário das possíveis translocações nos isolados
1 a 10

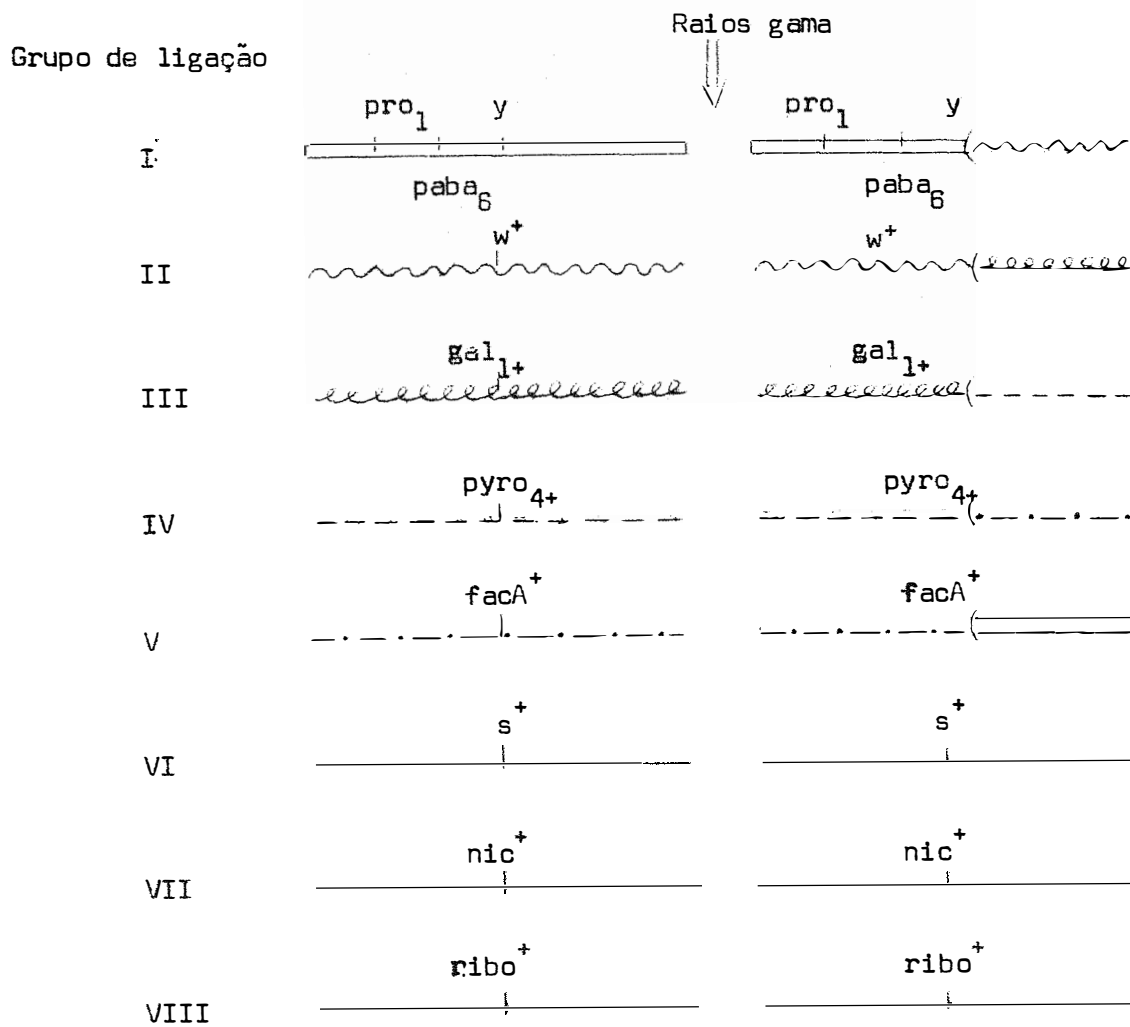
Cruzamento	Radiação gama Dose kr	Translocações
1	40	IV - V ; I - III - VII - VIII*
2	40	I - II - V - VIII
3	40	III - VI - (IV)* ; I - VIII* ; I - VII*
4	40	I - II - III - IV - V
5	40	I - II - III - IV (V - VI - VII - - VIII)*
6	60	I - IV - (II - III - V - VI - - VII - VIII)*
7	60	I - II - VIII*
8	60	III - V* ; VI - VII*
10	60	III - VI*

(*) Representam prováveis translocações, quando dos setores haplóides analisados, apenas um não foi conforme a translocação.

Pela observação do Quadro 4 , verifica-se que todos os setores amarelos haplóides são deficientes em prolina e ácido p-aminobenzóico, independente de piridoxina e utilizam galactose e acetato como fonte de carbono. Por outro lado todos os setores brancos haplóides são independnetes de prolina e ácido p-aminobenzóico, requerem piridoxina e não usam acetato e galactose como única fonte de carbono. Isso indica translocação envolvendo os grupos de ligação I , II , III , IV e V , conforme exemplificado na Figura 4 .

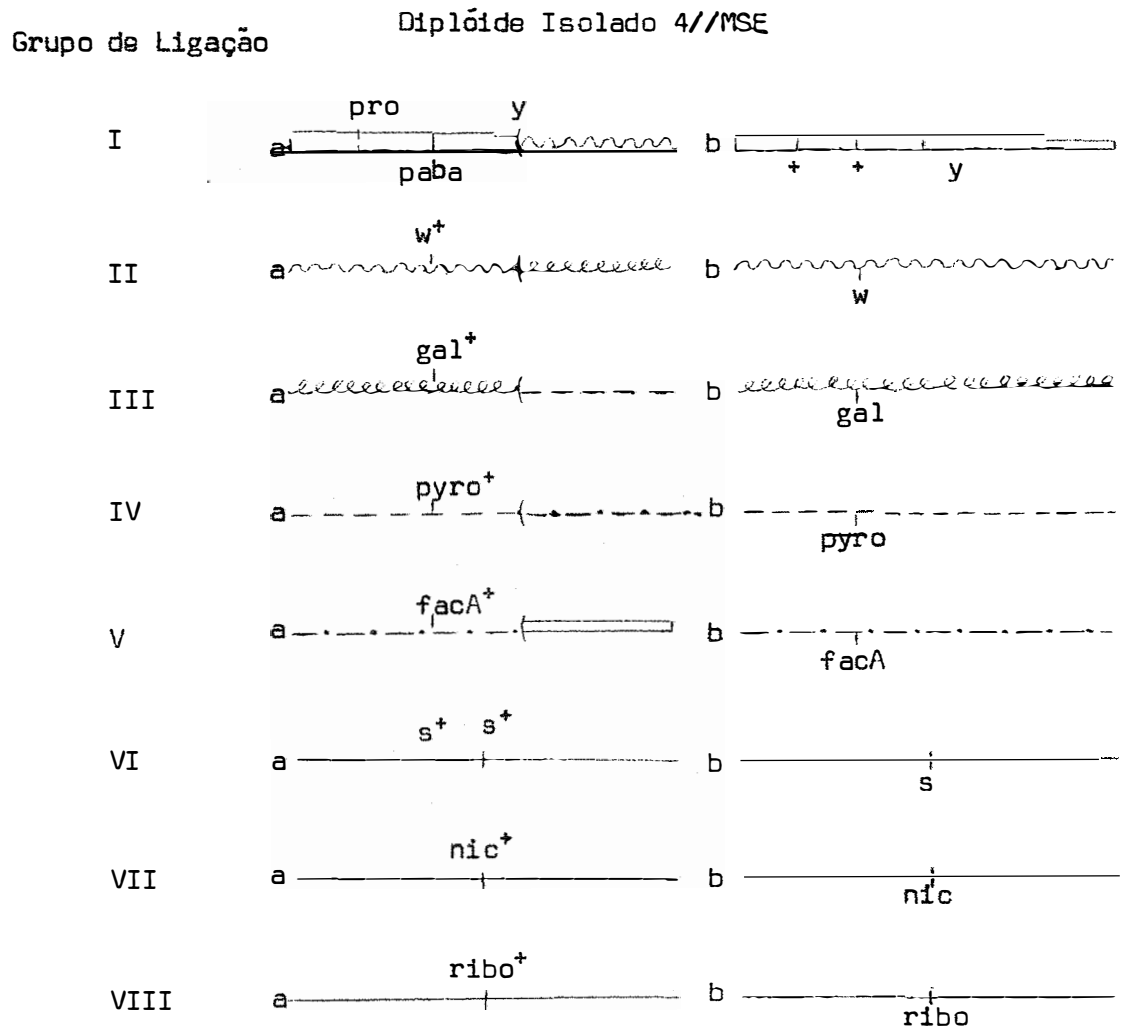
Conforme pode ser observado o número de translocações é relativamente grande para alguns cruzamentos. Foram feitas também análises mitóticas de colônias que sofreram irradiações nas doses de 80 e 100 kr , e verificou-se um número muito grande de translocações, de modo geral, envolvendo todos os grupos de ligação. Por esse motivo foram escolhidas doses menores, pois o alto índice de translocações veria a dificultar análises posteriores.

Fig. 4 - Translocações no isolado 4 , induzidas por raios gama.
Um possível modelo.

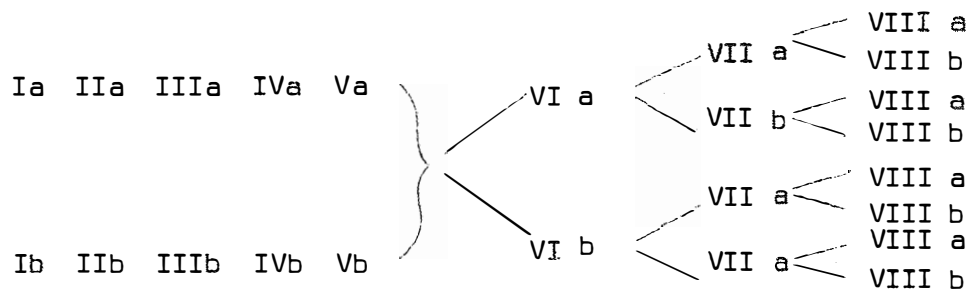


continua ...

Fig. 4 - Continuação



Haplóides viáveis em pFa



4.2.2 - Análise mitótica de isolados da linhagem bi₁ ;
meth₁ após irradiação com raios gama

Da mesma maneira como já explicado no item 4.2.1 , dez isolados da linhagem bi₁ ; meth₁ após irradiação com raios gama (5% - 1% de sobrevivência foram submetidos a uma análise mitótica para verificação de possíveis translocações envolvidas. Também no caso, dez co lônias morfológicamente normais foram utilizadas e numeradas de 11 a 20 . O resultado da análise de um desses isolados (isolado n° 11) está apresentado no Quadro 6 . Os demais resultados das análises mitóticas para os isolados 12 a 20 estão nos Quadros A-10 a A-18 do Apêndice. O Quadro 7 é um resumo das translocações obtidas nos isolados de 11 a 20 .

QUADRO 6 - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 11//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos Nutricionais										
	COR	MC	MM	MM+T	+Gal	-Meth	-Piro	+Ac	-sMeth	-Nic	-Ribo
1	w	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
2	y ⁺	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
3	w	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
4	w	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
5	w	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
6	y	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
7	y	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+

QUADRO 7 - Possíveis translocações nos isolados 11 a 20

Cruzamentos	Radiação gama Dose kr	Translocações
11	40	III - V
11	40	IV - V (I)*
18	60	IV - V - VII

(*) Representam prováveis translocações, quando dos setores haplóides analisados, apenas um não foi conforme a translocação.

Pelos resultados observados nos cruzamentos envolvendo a linhagem bi₁; meth₁, podemos verificar um número de translocações bem menor que para os isolados da linhagem pro₁, paba₆, y, pois apenas três dos dez isolados possuíam translocações envolvendo um ou mais grupos de ligação, usando a mesma faixa de radiações, ou seja, 40 a 60 kr.

4.2.3 - Análise meiótica

4.2.3.1 - Isolados da linhagem pro₁, paba₆, y portadores de translocações X MSE

Esta análise foi realizada seguindo a técnica já descrita no item 3.9.3. Ela teve como finalidade principal verificar anomalias na segregação para coloração entre linhagens translocadas cruzadas com normais, bem como, verificar o aparecimento ou não de colônias de

morfologia anormal que indicariam possíveis duplicações cromossômicas. Os resultados da análise de segregação meiótica isolados desta linhagem estão no Quadro 8 .

QUADRO 8 - Segregantes obtidos de isolados da linhagem

$pro_1 \times paba_6$, y X MSE

Número	Número e cor da colônia					X ² *
	Amarelas		Branças		Total de colônias contadas	
	Normal	Anormal	Normal	Anormal		
1	78	44	44	45	211	5,16
2	143	114	190	84	531	0,54
4	110	58	69	36	273	3,1
6	68	38	70	51	227	0,8
7	41	24	31	19	115	1,8
8	168	116	132	155	570	0,006
10	420		422		842	0,004

Obs.: No cruzamento 3 não houve formação de peritécios.

No cruzamento 5 não foram isolados peritécios híbridos.

No cruzamento 10 não foi possível distinguir o fenótipo das colônias.

Apareceram dois tons de branco e dois tons de amarelo.

(*) Para uma segregação de 1:1 , com relação a coloração.

Como pode ser verificado pelos resultados mostrados, em dois casos não foi possível a obtenção de peritécios híbridos, porém nos outros casos foi possível a realização da análise genética meiótica.

A análise estatística revelou que em todos os casos a segregação para coloração foi de 1:1 .

4.2.3.2 - Isolados da linhagem bi_1 ; $meth_1$ portadores de translocações X MSE

Esta análise também foi realizada seguindo a técnica descrita no ítem 3.9.3 . O objetivo principal é saber o tipo de segregação de alguns isolados selecionados, portadores de translocações cromossômicas após terem sofrido irradiações.

O resultado de segregação meiótica para esta linhagem encontra-se no Quadro 9 .

QUADRO 9 - Segregantes da linhagem bi_1 ; $meth_1$ X MSE

Número	Número e cor das colônias			Total	X ² *
	Branca	Verde	Amarela		
11	61	42	31	134	2,4
13	40	15	20	75	0,9
18	30	25	29	84	8,2

(*) Para uma relação de 1 : 2 : 1
Verde : Branco : Amarelo

Nos três isolados ensaiados, a análise estatística revelou que a segregação das marcas para coloração foi de 1:2:1 como esperado.

4.2.4 - Verificação da instabilidade mitótica através da produção de setores, e morfologia das colônias, para seleção de linhagens portadoras de duplicação cromossômica

Após ter sido feita uma triagem, observando o fenótipo, as colônias que apresentaram setores bem delimitados foram repicadas pela técnica de microcolônias monospóricas.

4.2.4.1 - Verificação da instabilidade mitótica nos isolados provenientes da linhagem pro₁, paba₆, y

No Quadro 10 estão os resultados das colônias suspeitas de terem duplicação cromossômica (segregantes meiótica de cruzamentos entre isolados da linhagem pro₁, paba₆, y X MSE).

Dos segregantes de isolados que apresentaram setores com maior frequência foram estocados as colônias para estudos posteriores. Assim, um segregante de cruzamento entre o isolado 6 X MSE ; e o outro do isolado 7 X MSE , foram escolhidos para estudos posteriores.

4.2.4.2 - Verificação da instabilidade mitótica nos isolados provenientes da linhagem bi₁ ; meth₁

No Quadro 11 estão os resultados das colônias suspeitas de terem duplicações cromossômicas (linhagem bi₁ ; meth₁) .

QUADRO 10 - Segregantes de isolados da linhagem pro₁ , paba₆ , y após cruzamento com a linhagem MSE , suspeitos de terem duplicação cromossômica

Segregantes do isolado número	Coloração do segregante	Setores		
		1. ^a Repetição	2. ^a Repetição	3. ^a Repetição
1	w	-	-	-
2	w	+	-	-
2	w	-	-	-
2	w	-	-	-
2	w	-	-	-
2	y	+	+	-
4	y	+	-	-
4	w	-	-	-
4	y	-	-	-
6	w	+	-	-
6	y	+	-	-
6	y	+	+	-
6	y	+	+	+
6	w	+	-	-
6	y	+	-	-
7	w	+	+	-
7	w	+	+	+
8	w	+	+	-
8	w	-	-	-
8	y	-	-	-
8	w	-	-	-
9	y	-	-	-
9	w	-	-	-
10	y	+	-	-
10	y	-	-	-

w = branca

+ = presença de setores

y = amarela

- = ausência de setores

QUADRO 11 - Segregantes de isolados da linhagem bi₁ ; meth₁ , após cruzamento com a linhagem MSE , suspeitos de terem duplicação cromossômica

Segregantes do isolado número	Coloração do segregante	Setores		
		1. ^a Repetição	2. ^a Repetição	3. ^a Repetição
11	w	-	-	+
11	w	-	-	-
11	y	-	-	-
11	w	+	-	-
11	y ⁺	+	+	+
13	w	-	-	-
13	w	+	+	+
13	w	+	-	-
13	w	-	-	-
13	w	-	-	-
13	y	+	-	-
13	y ⁺	-	-	-
18	y ⁺	-	-	-
18	y ⁺	-	-	-
18	y ⁺	+	-	-
18	y ⁺	+	+	+
18	y ⁺	+	+	+

w = branca

y = amarela

y⁺ = verde

+ = presença de setores

- = ausência de setores

Como nos três isolados (11, 13 e 18) foram verificados segregantes com setores, de todos foram estocados os segregantes mais instáveis para posterior estudo.

4.2.5 - Medida dos diâmetros das colônias e contagem de setores por colônia, dos isolados provenientes da linhagem pro₁, paba₆, y, que apresentaram setores característicos de instabilidade mitótica

Esta medida foi feita no quarto dia até o sétimo dia de incubação. Das 25 colônias ensaiadas anteriormente (Quadro 10) em doze delas foram feitas medidas do diâmetro e contados o número de setores por placa. O diâmetro destas colônias no quarto dia de incubação, variou de 4,5 a 7,0 cm; já no sétimo dia estas colônias estavam bastante desenvolvidas e o diâmetro variou de 6,8 a 8,7 cm.

Os setores foram observados e contados, porém alguns segregantes se destacaram pelo número de setores por placa. De fato dois segregantes, um do isolado 6 e outro do isolado 7 foram os mais instáveis, no que se refere ao número de setores produzidos.

O Quadro 12 mostra o diâmetro das colônias em cm e o número de setores produzidos por placa, após sete dias de incubação, nesses dois segregantes escolhidos.

Como pode ser verificado pelo Quadro 12 em ambos os isolados foi verificado instabilidade, sendo que o segregante do isolado 7 se destacou nesse sentido, sendo então escolhido para posterior estudo genético.

QUADRO 12 - Diâmetro das colônias e número de setores por placa após sete dias de incubação

Placa	Segregante do Iso lado 6		Segregante do Iso lado 7		Linhagem normal	
	$\frac{pro_1}{paba_6}, \frac{y}{X} MSE$	$\frac{pro_1}{paba_6}, \frac{y}{X} MSE$	$\frac{pro_1}{paba_6}, \frac{y}{X} MSE$	$\frac{pro_1}{paba_6}, \frac{y}{X} MSE$	$\frac{pro_1}{paba_6}, \frac{y}{X} MSE$	$\frac{pro_1}{paba_6}, \frac{y}{X} MSE$
Número	Colônia de cor branca		Colônia de cor branca		Colônia de cor amarela	
	Diâmetro (cm)	Número de setores	Diâmetro (cm)	Número de setores	Diâmetro (cm)	Número de setores
1	7,7	1	7,2	4	7,9	0
2	6,8	1	7,1	7	8,0	0
3	7,7	0	7,2	5	7,8	0
4	7,8	0	7,9	6	8,1	0
5	7,8	0	7,5	12	8,0	0
6	7,7	0	7,6	6	8,1	0
7	8,5	0	8,0	2	8,2	0
8	8,2	1	7,9	3	7,9	0
9	7,8	0	7,8	6	7,9	0
10	7,0	0	7,4	3	8,0	0
11	7,4	0	8,2	3	8,1	0
12	7,5	0	8,1	4	8,0	0
13	7,9	0	8,3	4	8,1	0
14	7,8	0	8,2	4	8,0	0
15	7,8	0	8,1	4	8,0	0
16	7,7	0	7,9	4	7,8	0
17	8,5	0	8,2	4	7,9	0
18	8,2	0	8,2	4	7,9	0
19	7,8	0	7,9	6	8,0	0
20	7,6	0	8,3	4	8,2	0
Médias	8,2	0,15	7,9	4,7	7,9	0

4.2.6 - Medidas dos diâmetros das colônias e contagem de setores por colônia dos isolados provenientes da linhagem bi₁ ; meth₁ , que apresentaram setores característicos de instabilidade mitótica

Esta medida foi feita a partir do quarto dia até o sétimo dia de incubação.

Os resultados foram semelhantes aos obtidos com a linhagem pro₁ , paba₈ , y , ou seja, o diâmetro variou da mesma forma que para essa linhagem. A partir do terceiro dia de incubação, algumas colônias começaram a produzir setores.

O Quadro 13 mostra o diâmetro das colônias em cm e o número de setores produzidos por placa após sete dias de incubação, nos dois segregantes mais instáveis obtidos.

Pelos resultados apresentados no Quadro 13 observa-se que em ambos os segregantes a instabilidade mitótica é muito grande.

4.2.7 - Segregantes instáveis selecionados e determinação das deficiências nutricionais dos centros e setores dos mesmos

Dos segregantes meióticos selecionados para posterior análise foram escolhidos três deles para estudos genéticos devido a sua grande instabilidade bem como a constância dessa instabilidade. Esses segregantes serão designados de 7 • pro , paba ; w ; nic ; 11 • bi ; meth ; w e 18 • nic .

QUADRO 13 - Diâmetro das colônias e número de setores por placa após sete dias de incubação

Placa	Segregantes do Iso lado 11 $\frac{bi_1}{meth_1}$ X MSE		Segregante do Iso lado 18 $\frac{bi_1}{meth_1}$ X MSE		Linhagem normal $\frac{bi_1}{meth_1}$	
	Colônia de cor branca		Colônia de cor verde		Colônia de cor verde	
Número	Diâmetro (cm)	Número de setores	Diâmetro (cm)	Número de setores	Diâmetro (cm)	Número de setores
1	6,9	1	7,8	6q	7,6	0
2	6,9	4	7,8	6	7,6	0
3	7,0	2	7,9	18	7,5	0
4	7,0	4	7,8	4	7,6	0
5	7,0	5	7,7	4	7,5	0
6	7,1	4	7,7	4	7,4	0
7	6,9	3	7,8	5	7,7	0
8	6,9	7	7,8	6	7,6	0
9	6,9	2	7,9	4	7,6	0
10	7,0	5	7,7	4	7,5	0
11	7,0	6	7,7	9	7,5	0
12	7,1	4	7,8	4	7,6	0
13	7,0	5	7,8	9	7,6	0
14	7,0	8	7,8	6	7,6	0
15	7,0	0	7,0	7	7,6	0
16	7,1	4	7,9	3	7,5	0
17	7,2	2	7,8	5	7,4	0
18	7,3	4	7,8	5	7,6	0
19	7,1	4	7,9	6	7,6	0
20	7,0	3	7,8	4	7,6	0
Médias	7,0	3,9	7,7	5,9	7,5	0

4.2.7.1 - Segregante 7 · pro₁ , paba₆ ; w ; nic

Iniciaremos pela apresentação e descrição do segregante proveniente da linhagem pro₁ , paba₆ , y (isolado nº 7). Como características morfológicas ele, apresenta coloração branca, tendo os setores também brancos mais claros (Figura 5) ; tem boa conidiação, portanto de fácil manuseio, o tempo e temperatura ótima de crescimento é semelhante ao da linhagem que lhe deu origem ; o centro dessas colônias apresentam as seguintes deficiências nutricionais: prolina, ácido p-aminobenzóico e ácido nicotínico e portanto sua constituição genotípica deve ser: pro₁ , paba₆ ; w ; nic₆ (Quadro 14). Pela observação do Quadro 14 , nota-se que embora o centro da colônia não tenha requisito para riboflavina, seus setores apresentam deficiências em alguns casos, para essa vitamina, o que permite supor que haja uma duplicação do grupo de ligação VIII , no caso.

4.2.7.2 - Segregante 11 · bi₁ ; meth₁ ; w

Este segregante foi obtido a partir da linhagem bi₁ ; meth₁ (isolado 11) , tendo centro branco, com setores brancos em tons diferentes e alguns setores deteriorados (Figura 6) tendo uma conidiação razoável, tempo e temperatura de crescimento semelhantes ao da linhagem que lhe deu origem : o centro dessas colônias apresentam as seguintes deficiências nutricionais: biotina e metionina, Como ele não cresce em meio sem metionina, não é possível dezer se o mesmo apresenta



Fig. 5 - Segregante 7 • pro , paba ;
w ; nic.



Fig. 6 - Segregante 11 • bi ;
meth ; w.

ou não deficiência para tiosulfato de modo que sua constituição genotípica é bi₁; meth₁; w (s ?) - (Quadro 15). Nesse caso tanto o centro como os setores não se diferenciam quanto à deficiências nutricionais.

QUADRO 14 - Determinação das deficiências nutricionais dos centros e setores do segregante 7 • pro / paba ; w ; nic

Centro ou Setor	Requisitos nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	-pro / -paba	+Gal	-piro	+Ac	-s	-Nic	-ribo
C	w	+	-	+	- / -	+	+	+	+	-	+
S	w	+	-	+	- / -	+	+	+	+	-	+
S	w	+	-	+	- / -	+	+	+	+	-	-
S	w	+	-	+	- / -	+	+	+	+	-	+
S	w	+	-	+	- / -	+	+	+	+	-	-
S	w	+	-	+	- / -	+	+	+	+	-	+
S	w	+	-	+	- / -	+	+	+	+	-	+

C = centro

S = setor

QUADRO 15 - Determinação das deficiências nutricionais dos centros e setores do segregante 11 - bi ; meth ; w

Centro ou Setor	Requisitos Nutricionais											
	Cor	MC	MM	MM+T	-Bi	+ Gal	-Meth	-Piro	+Ac	-Smeth	-Nic	-Ribo
C	w	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
S	w	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
S	w	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
S	w	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
S	w	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
S	dt	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
S	w	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
S	w	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+

C = centro S = setor dt = deteriorado

4.2.7.3 - Segregante 18 . nic ; y⁺

Possui centro verde, tendo setores verdes em tons diferentes (Figura 7) é de boa condição, tempo e temperatura de crescimento semelhantes ao da linhagem que lhe deu origem ; o centro dessas colônias requerem: ácido nicotínico, tem portanto constituição genotípica nic_B. Nesse caso, como no anterior, tanto o centro como os setores não se diferenciam quanto aos seus requisitos nutricionais (Quadro 16).

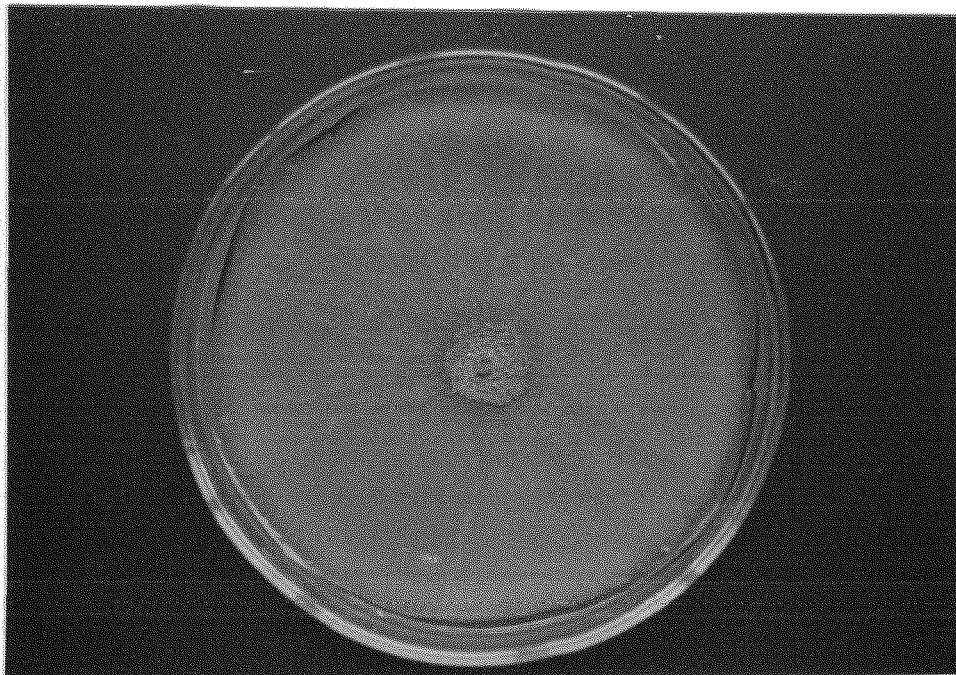


Fig. 7 - Segregante 18 . nic ; y⁺

QUADRO 16 -- Determinação das deficiências nutricionais dos centros e setores do segregante 18 - nic

Centro ou Setor	Requisitos Nutricionais											
	Cor	MC	MM	MM+T	-Bi	+ Gal	-Meth	-Piro	+AC	-Smeth	-Nic	-Ribo
C	y ⁺	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
S	y ⁺	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
S	y ⁺	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
S	y ⁺	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
S	y ⁺	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
S	y ⁺	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
S	y ⁺	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
S	y ⁺	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

C = centro

S = setor

4.2.8 - Análise mitótica das linhagens selecionadas como portadoras de duplicação cromossômica

Apenas dois dos três segregantes escolhidos foram analisados mitoticamente.

4.2.8.1 - Segregante 7 · pro , paba ; w ; nic

Um diplóide entre o segregante 7 · pro ; paba , ; w ; nic e a linhagem chartreuse (su₁ ad₂₀ ; y ; ad₂₀ ; Acr₁ ; paba₆ ; lys₅ ; cha) foi obtido. Após haploidização e análise dos setores haplóides observou-se que além dos setores ribo⁺ esperados, ocorreram setores ribo⁻ indicando que o gene ribo₂ está presente nesse segregante, em estado heterozigoto, confirmando aliás os dados anteriores que mostraram que o mesmo produzia setores dependentes de riboflavina. Os resultados dessa análise mitótica estão no Quadro 17 . Um segundo diplóide, entre o mesmo segregante instável e uma linhagem paba₆ , y ; gal₁ ; pyro₄ ; s₃ revelou após a haploidização, a presença de setores ribo⁺ e ribo⁻ confirmando novamente os dados anteriores.

4.2.8.2 - Segregante 11 , bi ; meth ; w

Um diplóide constituído entre esse segregante e a linhagem paba₆ , y ; gal₁ ; pyro₄ ; facA₃₀₃ ; nic₈ ; ribo₂ foi haploidizado e surgiram alguns setores que cresceram em meio mínimo mais todos os requisitos exceção de metionina, mas que não cresceram em

QUADRO 17 - Análise mitótica: diplóide entre o segregante:

7 . pro ; paba ; w : nic e a linhagem su₁ ad₂₀ ,
y , ad₂₀ ; paba₈ , Acr₁ ; lys₅ ; cha

Setor Haplóide Número	Cor	MC	MM	Requisitos nutricionais	
				MM+T	- Ribo
1	W	+	-	+	+
2	W	+	-	+	+
3	W	+	-	+	+
4	W	+	-	+	-
5	W	+	-	+	-
6	W	+	-	+	-
7	W	+	-	+	-
8	W	+	-	+	+
9	W	+	-	+	+
10	W	+	-	+	-
11	W	+	-	+	-
12	W	+	-	+	+
13	W	+	-	+	+
14	W	+	-	+	-
15	W	+	-	+	+
16	W	+	-	+	+
17	W	+	-	+	+
18	W	+	-	+	+
19	W	+	-	+	+
20	W	+	-	+	+
21	W	+	-	+	+
22	W	+	-	+	+
23	W	+	-	+	+
24	W	+	-	+	-
25	W	+	-	+	+
26	W	+	-	+	-
27	W	+	-	+	-
28	W	+	-	+	-
29	W	+	-	+	-

meio mínimo mais todos os requisitos menos metionina e tiosulfato. Esse resultado revelou que o segregante 11 • bi ; meth ; w é na realidade 11 • bi ; meth ; s ; w . Um segundo diploide entre o mesmo segregante e a linhagem MSE produziu com relação as marcas galactose e acetato os resultados apresentados no Quadro 18 .

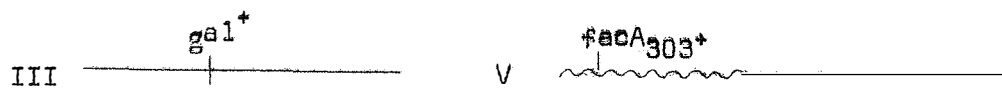
QUADRO 18 - Análise mitótica: segregantes haplóides do diplóide 11 • bi , meth . ; s ; w // MSE

Setor haplóide Número	Cor	MC	MM	MM + T	+ GAL	+ AC
1	w	+	-	+	-	-
2	w	+	-	+	+	-
3	w	+	-	+	+	-
4	w	+	-	+	-	-
5	w	+	-	+	-	-
6	w	+	-	+	-	-
7	w	+	-	+	-	-
8	w	+	-	+	-	-
9	w	+	-	+	-	-
10	w	+	-	+	-	-

Portanto não apareceram setores haplóides capazes de utilizar acetato como fonte de carbono. A análise do isolado 11 (Quadro 7) havia mostrado que uma translocação III - V estava envolvida. Possivelmente o segregante 11 • bi ; meth ; s ; w contém uma duplicação

cromossômica no grupo de ligação V conforme explicado na Figura 8 .

FIGURA 8 - Possível constituição do segregante $ll \cdot bi_1 ; s_3 ; w_3$



4.2.9 - Análise meiótica dos segregantes selecionados como portadores de duplicações cromossômicas

4.2.9.1 - Análise meiótica do segregante 7 pro , paba ; w ; nic

Esse segregante foi cruzado com a linhagem de coloração chartreuse e de constituição genotípica $\underline{su}_1 \underline{ad}_{20} , \underline{y} ; \underline{ad}_{20} ; \underline{paba}_6 , \underline{Acr}_1 , \underline{lys}_5 ; \underline{cha}$. Não foram obtidos peritécios híbridos. No entanto, um dos peritécios produziu colônias brancas de dois tipos: claras e escuras. Esse peritécio provavelmente era proveniente de uma auto-

fecundação entre dois núcleos do próprio segregante 7 pro, paba; w ; nic e possa ser explicado pela fusão de dois núcleos, um deles ainda portador da duplicação e outro que perdeu a duplicação. De fato, todos os segregantes desse peritácio ficam como esperado pro⁺ paba⁺ , nic⁺ e brancas mas segregavam para o fenótipo deficiência em riboflavina. Os resultados estão indicados nos Quadros 19 e 20 .

QUADRO 19 - Segregantes meióticos de peritácio autofecundado do segregante 7 pro , paba ; w , nic , com relação a cor de esporos

Número de esporos analisados	Cor dos esporos no MC	
	Branco normal	Branco mais escuro
143	78	65

χ^2 para segregação 1:1 = 1,18 n.s.

QUADRO 20 - Segregantes meióticos de peritécio autofecundado do segregante 7 pro , paba ; w , nic com relação a de ficiência em riboflavina

Cor	Número de segregantes	MC		MM		MM + T		- Ribo	
		+	-	+	-	+	-	+	-
Branco normal	134	134	0	0	134	134	0	93	41
Branco mais escuro	125	125	0	0	125	125	0	89	36
Total	259	259	0	0	259	259	0	182	77

χ^2 para segregação 3 ribo⁺ : 1 ribo⁻ = 3,73 n.s.

4.2.9.2 - Análise meiótica do segregante 11 · bi , meth ;
s ; w

Este, foi cruzado com a linhagem MSE . Um peritécio híbrido produziu os resultados indicados no Quadro 21.

QUADRO 21 - Análise meiótica do segregante 11 . bi ; meth ; w x MSE

Número de esporos analisados	42		
Cor dos esporos	w		
Requisitos Nutricionais:		+	-
MC	42	0	
MM	0	42	
MM + T	42	0	
+ Gal	22	20	
- Meth	22	20	
- Piro	19	23	
+ Ac	9	33	
- sMeth	15	27	
- Nic	18	24	
- Ribo	30	12	

Legenda: w = branco em tons diferentes
 + = crescimento
 - = ausência de crescimento

χ^2 para segregações:

1:1 gal⁺ : gal⁻ = 0,096 n.s.
 meth⁺ : meth⁻ = 0,096 n.s.
 pyro⁺ : pyro⁻ = 0,38 n.s.
 ac⁺ : ac⁻ = 13,71 **
 smeth⁺ : smeth⁻ = 3,428 n.s.
 nic⁺ : nic⁻ = 0,856
 ribo⁺ : ribo⁻ = 7,71 **

Os testes de X^2 revelaram um desvio significativo da proporção esperada, para a marca fac A, 303 localizada no grupo de ligação V. De fato os dados anteriores mostraram (Quadros 7 e 18) que grupo de ligação V está envolvido na translocação inicial e posterior duplicação cromossômica.

4.2.9.3 - Análise meiótica do segregante 18 · nic · v

Do cruzamento entre o segregante 18 · nic e a linhagem su₁ ad₂₀, y, ad₂₀, paba₆; Acr₁; lys₅; cha, todas as marcas segregaram como esperado, exceto a marca lys₅ onde houve um excesso de lys⁺ sobre lys⁻. De fato, o grupo de ligação V é um dos envolvidos na translocação inicial (Quadro 7) e isso pode ter causado o desvio observado.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Curvas de Sobrevivência aos Raios Gama

A irradiação com raios gama das duas linhagens haplóides (bi₁ ; meth₁ e pro₁ , paba₆ , y) e da linhagem de diplóide (bi₁//MSE), foi feito com o intuito de verificar a letalidade causada pela irradiação nas diferentes doses utilizadas e seu efeito nos confídios em meio sólido (MC inclinado) e meio líquido (salina).

Quando as linhagens foram irradiadas em meio sólido, a linhagem diplóide bi₁//MSE , se mostrou mais resistente à irradiação, do que as linhagens pro₁ , paba₆ , y e bi₁ ; meth₁ , ambas haplóides. (Quadros 1 , 2 , 3 e Figura 2).

Esses resultados são realmente esperados uma vez que recessivos letais induzidos na linhagem diplóide por raios gama não vão cau-

sar' morte de confídios, enquanto que as letais induzidas nas linhagens haplóides vão ocasionar letalidade. Maior sobrevivência de diplóides submetidos às mesmas doses que linhagens haplóides com relação à mutagênicos físicos e químicos já foi relatada por vários autores em *A. nidulans* (D'ARCE, 1972 ; PIZZIRANI, não publicado). Com relação à irradiação em salina, no entanto, (Quadros 1 , 2 , 3 e Figura 3) os dados revelaram que a linhagem haplóide bi₁ , meth₁ é bem mais sensível que linhagem diplóide bi₁//MSE como seria de se esperar, mas surpreendentemente a linhagem haplóide pro₁ , paba₆ , y , mostrou-se tão ou mais resistente que a linhagem diplóide utilizada. Entretanto, esses dados obtidos tanto em meio sólido como em meio líquido mostraram uma grande variação entre as duas repetições na maioria dos casos e portanto devem ser considerados apenas como tenuamente indicativos da letalidade quando comparados entre si. No entanto, dentro das linhagens e da mesma repetição pode-se mostrar que houve sempre queda de viabilidade com o aumento de dosagem de irradiação como seria de se esperar. Uma vez que no presente trabalho a irradiação foi utilizada simplesmente com o intuito de obtenção de aberrações cromossômicas, especialmente translocações, o que foi conseguido em muitos casos, estudos para verificar quais as causas dessa alta variabilidade não foram conduzidos. Para a finalidade do presente trabalho, tanto a irradiação em meio sólido, como em meio líquido pôde ser utilizada. Um estudo preliminar feito na linhagem diplóide diretamente e nas linhagens haplóides utilizadas revelou que o número de translocações nas doses de 80 kr é excessivamente grande, muitas vezes envolvendo todos os grupos de ligação ; assim, diplóides irradiados com 80 kr de irradia

ção gama não sofrem, na maioria dos casos, haploidização.

Já os diplóides e haplóides irradiados com 60 ou 40 kr apesar de produzirem grande número de translocações, não tem as mesmas, generalizadas para todos os grupos de ligação. Aliás, um bom ensaio para verificação dos efeitos de raios gama em produzir translocações é o do uso de uma linhagem diplóide submetida a várias dosagens de irradiação e sua posterior haploidização. Isso dá uma idéia de que dosagens podem ser usadas e o processo é muito menos trabalhoso do que o uso de haplóides diretamente, pois nesse caso, translocações só podem ser detectadas após cruzamento com linhagem haplóide normal, obtenção do diplóide e sua posterior haploidização. Isso nos levou a utilizar as doses de 40 kr e 60 kr para obtenção de linhagens com translocações cromossômicas.

Dosagens semelhantes foram utilizadas, no mesmo fungo por LACAVA (1973) para obtenção de mutantes morfológicos. Nessas dosagens a sobrevivência, em geral, caiu na faixa de 5 a 1%.

5.2 - Translocações Obtidas

Em vinte isolados irradiados, dez de cada linhagem haplóide utilizada, dezesseis deles apresentaram uma ou mais translocações (Quadros 5 e 7). Embora em alguns casos, após análise mitótica ainda persista alguma dúvida, sobre a indução de certas translocações, uma vez que entre os vários setores haplóides obtidos um não foi compatível com a existência

de translocação, essa pequena divergência pode ser explicada por permuta mitótica concomitante com haplodização ou ainda perda do segmento translocado nos casos de instabilidade mitótica (NGA e ROPER, 1968 ; BAINBRIDGE e ROPER, 1966). Assim, considerando-se todos os casos de translocações reais ou extremamente prováveis, verifica-se que todos os grupos de ligação foram envolvidos talvez com uma certa preferência para os grupos de ligação I que parece realmente ser o que corresponde a um dos maiores cromossomos de *A.nidulans* (DORN, 1967 ; D'ARCE, 1972) e V ; uma menor frequência de translocações envolveu os grupos de ligação II e VI , este último correspondendo possivelmente, na verdade a um dos menores cromossomos do fungo (DORN, 1967 ; D'ARCE, 1972).

Os resultados apresentados nos Quadros 4 e 6 e Quadros do Apêndice (A₁ até A₁₈) revelam que através de haploidização torna-se fácil a detecção de translocações ; assim, se apenas classes parentais e não recombinantes ocorrem entre dois ou mais grupos de ligação pode-se supor a existência de uma translocação envolvendo esses grupos de ligação. No caso da linhagem pro₁ , paba₉ , y a técnica é facilitada devido a existência de marcadores bem distintos ; no caso da linhagem bi₁ ; meth₁ cruzada com MSE , as marcas meth₁ e s₃ só podem ser evidenciadas e mesmo assim apenas em certos casos, pela inoculação em meio com todos os requisitos, menos metionina e meio mais todos os requisitos exceção de metionina e tiosulfato.

Setores que não crescem em meio sem metionina, evidentemente não crescem também em meio sem metionina e tiosulfato e esses poderão ser tanto metionina deficientes, como metionina e tiosulfato de-

ficientes. No entanto, setores que crescem em meio sem metionina e meio sem metionina e tiosulfato são independentes dos dois requisitos; finalmente setores que crescem em meio sem metionina, mas não crescem em meio desprovido de metionina e tiosulfato são meth₁₊, s₃₋ para as duas marcas envolvidas. Apesar dessa desvantagem na detecção dessas duas marcas, a linhagem bi₁; meth₁ apresenta uma vantagem quando cruzada com MSE; Nesse caso, todos os setores meth₁ serão pyro₄₊ e vice versa, pois as duas marcas estão no grupo de ligação IV e isso se constitui em um bom controle de haploidização.

5.3 - Análise Meiótica dos Isolados com Possíveis Translocações Cromossômicas

Observando os Quadros 8 e 9 verifica-se através do teste estatístico aplicado (χ^2) que todas as segregações para coloração ob tidas deram uma relação de (1:1) para os isolados da linhagem pro₁, paba₆, y, e segregação de 1:2:1 também com relação a coloração para isolados da linhagem bi₁; meth₁. Isso nos permite concluir que as marcas para coloração de confídios não devem estar envolvidas nas translocações.

Embora seis dos sete isolados da linhagem pro₁, paba₆, y apresentaram duas tonalidades de coloração dentro das colônias brancas e amarelas (Quadro 8), tanto nos isolados dessa linhagem como nos três isolados da linhagem bi₁; meth₁ analisados, não houve evi-

dências de morfologia "crinkled" característica de duplicação cromossômica. Até o presente momento, as linhagens com duplicações cromossômicas descritas apresentam características morfológicas e de crescimento típicas. Assim, estudos feitos por BAINBRIDGE e ROPER (1966) ; NGA e ROPER (1968 e 1969) ; AZEVEDO (1970 e 1971) ; AZEVEDO e ROPER (1970) e BAINBRIDGE (1970) mostraram que as duplicações envolvidas afetam a morfologia do *A. nidulans* , dando um fenótipo chamado de "crinkled" (cr); colônias com estas características originam-se de pais morfologicamente normais, e tem crescimento linear reduzido.

Estas colônias cr mostram instabilidade vegetativa originando setores variados, principalmente de dois tipos; o primeiro deteriorado e o segundo com crescimento e morfologia semelhantes ao tipo normal ou selvagem, chamado de setores melhorados. Estes revertantes (melhorados), segundo os autores originam-se, provavelmente por perdas da parte variável do segmento cromossômico que carregava a duplicações. As perdas ocorrem em um dos dois segmentos: o translocado ou o não translocado. Por sua vez, os variantes deteriorados originam-se provavelmente por novas duplicações em tandem (NGA e ROPER, 1968).

No presente trabalho não verificamos isolados analisados através de seus segregantes meióticos, a morfologia "crinkled" citada acima como característica, bem como o crescimento linear dos segregantes analisados foram semelhantes ao da linhagem normal. No entanto, a presença de translocações foi constatada, donde pode-se concluir que nem todas as translocações produzem morfologia tipo "crinkled" em *A. nidulans*.

No entanto, ainda com relação a morfologia "crinkled", foram no princípio do nosso trabalho selecionadas algumas amostras preferencialmente com essa morfologia, e em muita delas foi observado instabilidade (através da produção de setores) ; porém essas amostras ou eram pouco instáveis, produzindo pouco setores, ou perdiam a duplicação com facilidade o que levou-nos a continuar o trabalho com linhagens sem essa morfologia característica.

5.4 - Caracterização da Instabilidade Mitótica nos Isolados Selecionados

Três segregantes foram isolados como suspeitos de terem duplicação cromossômica, sendo que a escolha foi feita preferencialmente levando em consideração a constância de setores a partir de um mesmo isolado, bem como o número deles por placa, visto que isso nos diz de uma maior instabilidade.

5.5 - Verificação da Instabilidade Mitótica nos Isolados Provenientes da linhagem pro₁ , paba₆ , y e bi₁ ; meth₁ e Caracterização dos segregantes estudados

Pela observação dos Quadros 10 e 11 , pode-se verificar que muitos dos segregantes obtidos do cruzamento entre isolados das duas li-

nhagens haplóides usadas, possivelmente portadoras de translocações, foram instáveis. De fato, de todos isolados usados, foram obtidos segregantes instáveis que produziam setores. Alguns deles, que frequentemente produziam setores, foram utilizados para uma análise mais detalhada. Os resultados apresentados nos Quadros 12 e 13 revelaram que o diâmetro das colônias de segregantes instáveis, comparados com o diâmetro das colônias de controles constituídos por linhagens sem duplicação cromossômica, não diferiu confirmando o fato de que essas linhagens com instabilidade não apresentaram redução da taxa de crescimento, nem possuem morfologia "crinkled". Com relação à instabilidade, um dos segregantes analisados nesse sentido foi pouco instável (segregante do isolado 6, pro_1 , $paba_6$, y) mas os outros três foram bastante instáveis com número de setores por colônia que variou em média, de 3,9 até 5,9.

Comparando os nossos resultados isolados suspeitos de possuírem duplicações cromossômicas, com os da linhagem A duplicada descrita por NGA e ROPER (1968) que apresenta duplicação no grupo de ligação I, e os da linhagem duplicada III - VIII (com duplicação do grupo de ligação III, descrita por BAINBRIDGE, 1970) verifica-se maior instabilidade nos nossos isolados que nas linhagens descritas. Duas conclusões acerca da instabilidade mitótica podem ser tiradas dos estudos desses pesquisadores. Primeiramente, conclui-se que a instabilidade é provocada por um não balanceamento do material cromossômico; uma segunda conclusão seria de que a instabilidade é provocada pelos próprios segmentos envolvidos na duplicação.

Convém salientar que todo esse estudo de instabilidade foi realizado tendo sempre como controle as linhagens originais (sem sofrer irradiações), ou seja pro₁ , paba₆ , y e bi₁ ; meth₁ e que para essas linhagens não foi observada a produção de setores em placas inoculadas nas mesmas condições em que foram inoculados os nossos isolados (Quadros 12 e 13) o que concorda com os dados correntes em genética de *A. nidulans* onde linhagens haplóides não duplicadas são extremamente estáveis. A caracterização dos segregantes estudados, para seus requisitos nutricionais (Quadros 14 , 15 e 16). Revelou que os três segregantes tiveram as seguintes constituições genotípicas: segregante 7 . pro , paba ; w ; nic , originário da linhagem pro₁ paba₆ y ; segregante 11 . bi ; meth ; w e o segregante 18 . nic , ambos originados da linhagem bi₁ ; meth₁ . Todos apresentaram crescimento linear, semelhante ao da linhagem original, para cada caso, e os setores de modo geral foram melhorados, sendo que no isolado 11 . bi , meth , w apareceram cerca de 10% de setores deteriorados.

Dos três segregantes analisados, um deles, o 7 . pro , paba , w , nic , mesmo tendo centro da colônia independente de riboflavina, ou seja o centro sendo ribo⁺ , produz setores ribo⁺ e ribo⁻ ; essa deficiência para a vitamina riboflavina em alguns setores é indicação de que esse grupo de ligação está em duplicata, e, perdas cromossômicas de parte ou do segmento total induzem o aparecimento de setores diferentes do centro da colônia, que no caso apresenta a duplicação (Quadro 14).

Nos outros dois casos apesar da instabilidade ser muito grande, o que é indicação de uma duplicação, não devem existir marcadores genéticos envolvidos na duplicação, visto que os centros e setores não se diferenciam quanto as suas deficiências nutricionais.

Para os três isolados os setores sempre tiveram a mesma coloração do centro, porém com tonalidade diferente o que permite a sua pronta distinção. No caso do isolado 7 : pro , paba , w ; nic , existe até mesmo uma diferença quanto a conidiação, e nesse caso os setores, tem melhor conidiação que os centros da colônia.

A análise genética, mitótica dos segregantes instáveis positivamente mostrou novamente que o segregante 7 : pro , paba ; w ; nic era heterozigoto para o gene riboflavina. De fato (Quadro 17) setores ribo⁺ e ribo⁻ novamente foram obtidos a partir de um diplóide entre esse segregante e uma linhagem também independente de riboflavina. A análise inicial do isolado 7 (Quadro 5) revelou que os grupos de ligação I - II e VIII estavam possivelmente envolvidos. Assim a heterozigose para a marca ribo⁺ indica que de fato existe duplicação do grupo de ligação VIII onde se situa o gene ribo₂. Não foi possível distinguir, no entanto, se a duplicação do grupo de ligação VIII está translocada para o grupo de ligação I ou II, também envolvidos na translocação.

O segregante 11 bi ; meth ; w é na realidade, também deficiente em tiosulfato, pois essa marca é mascarada pelo gene meth₁. Através da haploidização do diplóide constituído por esse segregante e outra linhagem independente de tiosulfato, setores deficientes de

tiosulfato foram obtidas. Também a análise mitótica (Quadro 18) revelou que setores haplóides capazes de utilizar acetato não foram obtidos mostrando que o grupo de ligação V está envolvido na aberração cromossômica induzida por raios gama, o que aliás comprova os dados do Quadro 7, que havia mostrado uma translocação III - V na linhagem.

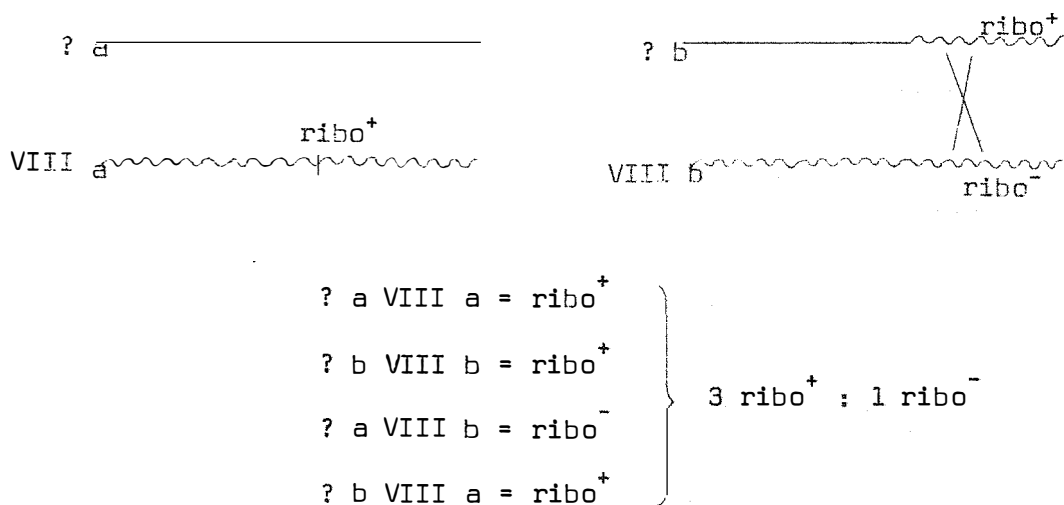
A análise meiótica dos três segregantes mostrou que no caso do segregante 7 . pro , paba , w , nic , quando este foi cruzado com uma linhagem de coloração "chartreuse", um peritécio deu apenas segregantes brancos de duas tonalidades: branco normal e branco mais escuro. De fato a análise meiótica para requisitos nutricionais revelou que esse peritécio foi o resultado do cruzamento de um núcleo do segregante duplicado original e um derivativo deste, ou seja, um setor melhorado que perdeu o segmento em duplicada. Os resultados demonstraram que a coloração branca mais escura deve ser característica de segregante duplicado e que a perda do segmento em duplicata resulta no genótipo branco normal. Considerando a deficiência em riboflavina, dos 259 segregantes analisados (Quadro 20), uma proporção de 3 ribo⁺ : 1 ribo⁻ foi encontrada.

Isso faz supor que o cruzamento ocorreu entre uma linhagem duplicada ribo⁺ / ribo⁻, com linhagem normal ribo⁻ conforme explicado na Figura 9.

A análise meiótica do segregante 11 . bi ; meth ; w x MSE (Quadro 21) mostrou uma segregação significativa ao nível de 1% para a marca facA₃₀₃ localizada no grupo de ligação V que também foi demonstrado pela análise inicial (Quadro 7) e pela análise mitótica

(Quadro 18) , estar envolvido na duplicação. Finalmente a análise meiótica do segregante 18 . nic ; y mostrou também uma segregação diferente da esperada (1:1) no caso da marca lys 5 localizada no grupo de ligação V que estava envolvido na translocação (Quadro 7). Desta maneira, pode-se concluir que os três segregantes instáveis estudados apresentam aberrações cromossômicas, muito possivelmente duplicações cromossômicas. Isso concorda com os dados da literatura onde linhagens portadoras de duplicações cromossômicas são instáveis em *A. nidulans* (NGA e ROPER, 1968 ; BAIBRIDGE e ROPER, 1966). Essas três novas linhagens instáveis poderão então se prestar a futuros estudos sobre instabilidade em *A. nidulans*.

FIGURA 9 - Possível explicação para a segregação 3:1 encontrada no cruzamento envolvendo o segregante 7 . pro , paba ; w ; nic



Até o momento somente três linhagens duplicadas foram analisadas com detalhes em *A. nidulans*. Para se ter uma idéia da generalização do fenômeno da instabilidade um maior número dessas linhagens precisam ser estudados.

Os estudos e resultados obtidos no presente trabalho poderão contribuir para uma melhor compreensão do fenômeno de instabilidade em *A. nidulans* e possivelmente para o melhor entendimento do fenômeno de instabilidade como um todo.

Esses três novos isolados instáveis obtidos deverão ser estudados mais profundamente quanto a sua instabilidade, como tem sido feito para as outras linhagens até o presente estudada. Isso permitirá conclusões mais sólidas sobre o fenômeno da instabilidade mitótica em *A. nidulans* em especial e da instabilidade em seres vivos de modo geral. Talvez desses estudos possa mesmo ser estabelecida uma relação entre os agentes (físicos ou químicos) que provocam alta instabilidade em *A. nidulans*, com distúrbios provocadas por esses mesmos agentes em plantas ou animais superiores, consequência provavelmente de uma instabilidade mitótica. Uma vez que é extremamente difícil o estudo dessa instabilidade em plantas e animais superiores, os fungos permitirão, um estudo muito mais e simplificado dos fenômenos de instabilidade em seres vivos.

6 - RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho teve como finalidade principal a obtenção de linhagens com duplicações cromossômicas em *A. nidulans*, bem como o estudo da instabilidade nessas linhagens.

Para isso, linhagens de *A. nidulans* foram irradiadas com raios gama (Fonte de Co^{60}) e diversos isolados foram estudados para a verificação de presença de aberrações cromossômicas. Foram utilizadas as técnicas usuais de análise mitótica e meiótica, através dos ciclos sexual e parassexual. De vinte isolados obtidos após irradiação, doze mostraram possuírem translocações induzidas por raios gama. Três desses isolados foram estudados em maiores detalhes e três segregantes meióticos, um de cada cruzamento dos isolados escolhidos com linhagens normais foram instáveis e portadores de duplicações cromossômicas.

Dos resultados obtidos as seguintes conclusões puderam ser tiradas:

- a - Irradiação com raios gama, nas doses de 40 - 60 kr , tanto em co
nfidios suspensos em salina, como em meio completo, induzem alta
frequência de translocações. Dosagem acima de 60 kr tem efei-
tos muito drásticos ocasionando translocações em praticamente to-
dos os cromossomos, o que dificulta uma posterior análise genéti-
ca. Todos os grupos de ligação foram envolvidos nas diversas
translocações obtidas, com uma certa preferência para os grupos
de ligação I e V .
- b - Os três segregantes estudados , obtidos de cruzamentos entre isola
dos possuidores de translocação com linhagens sem aberrações cro-
mossômicas não apresentaram morfologia "crinkled" mas eram instá
veis; assim, nem sempre essa morfologia e taxa de crescimento re-
duzida estão associados com duplicação cromossômica.
- c - Um dos segregantes instáveis obtidos, apresentava duplicação do
grupo de ligação VIII e era heterozigoto para o gene ribo 2 ; os
outros dois segregantes instáveis possuíam possivelmente duplica-
ções do grupo de ligação V , mas não houve marcadores genéticos
envolvidos na duplicação.
- d - Os três segregantes instáveis analisados produziram uma média de
setores por colônia que variou de 3,9 até 5,9 setores por pla-
ca . Eles podem portanto ser utilizados com vantagem no estudo
de fenômenos de instabilidade em *A. nidulans*.

7 - SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present work was carried out aiming the production of strains with chromosomal duplications in the fungus *Aspergillus nidulans* ; also a study of the instability of such strains was carried out.

For the obtention of chromosomal aberrations, mainly translocations, strains of *A. nidulans* were irradiated with gamma rays (Co^{60} source) and colonies derived from irradiated conidia were submitted to the usual techniques of genetic analysis throught the sexual and parasexual cycle. From 20 isolates obtained after irradiation, 12 presented translocations. Three of such isolates were studied and three meiotic segregants, one from each cross combining the studied isolates and normal strains were highly unstable and did present chromosomal duplications.

From the obtained results the following conclusions, could be drawn:

- a - Gamma ray irradiation (40 - 60 kr) both on conidia suspended into saline solution and complete solid medium, produce translocations in *A. nidulans*. Dosis above 60 kr did produce high frequencies of translocations involving all chromosomes which difficults the genetic analysis. All linkage groups were involved in the obtained translocations, preferentially linkage groups I and V .
- b - The ~~three~~ studied segregants obtained from crosses between the isolates with translocations and normal strains were highly unstable but did not present crinkled morphology. In this way, it can be said that not all unstable duplication strains have altered morphology and decreased growth rate.
- c - One unstable segregant obtained, presented a duplications of linkage groups VIII and was heterozigous for the ribo 2 gene. The other two unstable segregants did have probably a linkage group V duplication, but no genetic markers were presented in the duplication.
- d - The 3 unstable segregants analysed did produce on average 3,9 to 5,9 sectors per colony. They can, therefore, be used with advantages in the study of instability processes in *A. nidulans*.

8 - BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALMEIDA, A. C. S. e J. L. AZEVEDO, 1972. Efeitos da radiação gama em *Aspergillus nidulans*. Relatório Científico do Instituto de Genética. ESALQ/USP, Piracicaba, 6: 5-7.
- AZEVEDO, J. L., 1970. Mitotic non conformity in *Aspergillus nidulans*: Derivatives from deteriorated variants. Aspergillus News Letter, 11: 21.
- AZEVEDO, J. L., 1971. Mitotic non conformity in *Aspergillus nidulans*. England, University of Sheffield, 240 p. (Ph. D. Thesis).
- AZEVEDO, J. L., 1973. Instability at mitosis in *Aspergillus nidulans*. Genetics, 74: 514 (abstract).

- AZEVEDO, J. L., 1975. Altered instability due to genetic changes in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, Cambridge, 26: 55-61.
- AZEVEDO, J. L. e ROPER, J. A., 1970. Mitotic non conformity in *Aspergillus* : sucessive and transposable genetic changes. Genetical Research, Cambridge, 16: 79-93.
- AZEVEDO, J. L. e E. P. SANT'ANA, 1975. The use of chloroneb of obtain haploid segregantes from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. Aspergillus News Letter, 13: 6 .
- AZEVEDO, J. L. ; E. P. SANT'ANA e R. BONATELLI Jr., 1975. Effects of fungicides and ethidium bromide in a duplication strains of *Aspergillus nidulans* . Aspergillus News Letter, 13: 5 .
- BAINBRIDGE, B. W., 1970. Genetic analysis of an unequal chromosomal translocation in *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, Cambridge, 15: 317-326.
- BAINBRIDGE, B. W. e J. A. ROPER, 1966. Observations on the effects of a chromose duplication in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 42: 417-424.
- BALL, C., 1966. Instability associated with chromosome translocation in *Aspergillus nidulans*. Heredity, 21: 531.
- BALL, C., 1967. Chromose instability related to gene suppression in *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, Cambridge, 10: 173-183.
- BALL, C. e J. L. AZEVEDO, 1964. A "fluffy" mutant in *Aspergillus nidulans*. Aspergillus News Letter, 5: 9.

- BALL, C. e J. L. AZEVEDO, 1976. The applied significance of genetic instability in parasexual fungi. In: 2nd International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. Academic Press, N. Y.
- BARNETT, W. E. e F. J. de SERRES, 1963. Fixed genetic instability in *Neurospora crassa*. Genetics, 48: 717-723.
- BEALE, G. H. e A. C. FABERGE, 1941. Effect of temperature on the mutation rate of an unstable gene in *Portulaca grandiflora*. Nature, London, 147: 356.
- BIRKETT e J. A. ROPER, 1975. A temperature sensitive phenotype associated with the T VI - VII translocation. Aspergillus News Letter, 13: 7-8.
- BURNS, J. A. e D. V. GERSTEL, 1967. Flower color variegation and instability of block of heterochromatin in *Nicotiana*. Genetics, 57: 155-167.
- CASE, B. L. e J. A. ROPER, 1975. Genetic imbalance and mitotic non conformity in *Aspergillus nidulans*. Aspergillus News Letter, 13: 8-11.
- COOKE, P. ; J. A. ROPER e W. WATMOUGH, 1970. Trypan blue induced detetions in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. Nature, London, 226: 276-277.
- COX, E. C. ; G. E. DEGNEN e M. L. SCHEPPE, 1972. Mutator gene studies in *Escherichia coli* : the mut s gene. Genetics, 72: 551-567.

- D'ARCE, M. M. C. D., 1972. Contribuição ao estudo de aberrações cromossômicas numéricas em *Aspergillus nidulans*. Dissertação apresentada a ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre. Piracicaba, SP. 98 p.
- DAWSON, G. W. P. e SMITH-KEARY, P. F., 1963. Episomic control of mutation in *Salmonella typhimurium*. Heredity, 18: 1-20.
- DEMEREK, M., 1937. Frequency of spontaneous mutations in certain stocks of *Drosophila melanogaster*. Genetics, 22: 469-478.
- DEMEREK, M., 1941. Unstable genes in *Drosophila*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 9: 145-150. New York.
- EMERSON, R. A., 1914. The inheritance of somatic variation in variegated ear of maize. American Naturalist, 48: 87-115.
- FINCHAM, J. R. S., 1973. Localized instabilities in plants a review and some speculations. Genetics, Supplement, 73: 195-205.
- GLORIA, C. L. MA e E. KÄFER, 1974. Genetic analysis of the reciprocal translocation T_2 (I, VIII) of *Aspergillus* using the technique of mitotic mapping in homozygous translocations diploids. Genetics, 77: 11-23.
- GOLDSTEIN, A. e J. S. SMOOT, 1955. A strain of *Escherichia coli* with an unusually high rate of auxotrophic mutation. Journal of Bacteriology, 70: 588-595.
- GRANER, E. A., 1972. Elementos de Estatística. Ed. Melhoramentos, Piracicaba, SP.

- GREEN, M. M., 1967. The genetics of mutable gene at the white locus of *Drosophila melanogaster*. Genetics, 56: 467-482.
- GREEN, M. M., 1969. Controlling mediated transpositions of the white gene in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 61: 429-441.
- GREENBLATT, I. M., 1966. Transposition and replication of Modulator in Maize. Genetics, 58: 585-597.
- GREENBLATT, I. M. e R. A. BRINK, 1962. Twin mutations in medium variegated pericarp maize. Genetics, 47: 489-501.
- GREENBLATT, I. M. e R. A. BRINK, 1963. Transposition of Modulator in Maize into divided and individed chromosome segments. Nature, London, 197: 412-413.
- GROSE, S. e A. J. CLUTTERBUCK, 1975. "Fluffy" colonies obtained from *Aspergillus* conidia after ageing and other treatments. Aspergillus News Letter, 13: 17-18.
- HYNES, M. J., 1975. Benzamide inhibited mutants of *A. nidulans*. Aspergillus News Letter, 12: 16-17.
- JINKS, J. L., 1966. Extranuclear inheritance. The fungi, Vol. II (Ainsworth, G. C. e Sussman, A. S., Edts.): 619-660.
- KÄFER, E., 1958. An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, 9: 105-145.
- KÄFER, E., 1960. High frequency of heterozygous diploids in filamentous fungi. Experientia, 8: 14-15.

- KÄFER, E., 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. Genetics, 46: 1581-1609.
- KÄFER, E., 1965. Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. Genetics, 52: 217-232.
- LACAVA, P. M., 1973. Mutantes morfológicos induzidos por Raios Gama em *Aspergillus nidulans*. Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Veterinária e Agronomia de Jaboticabal, para obtenção do título de Doutor em Ciências, 85 p. Jaboticabal, SP.
- LEE, Y. T. e B. H. NGA, 1973. Meiotic segregation behavior of translocations haploids in *Aspergillus nidulans*. Genetics, Supplement, 74: 153-154 (Abstract).
- LEE, Y. T. e B. H. NGA, 1974. Mitotic stability of a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. Genetics, 77: 38 (Abstract).
- LENHART, K., 1973. Vegetative instability in fungi. I. The mechanisms of vegetative instability in *Ascomycetes*. Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, 65: 75-81.
- LENHART, K., 1973.b. Vegetative instability in fungi. II. Vegetative instability in mutants of *Macrosporium gypseum*. Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, 65: 83-98.
- LIEBER, M. M., 1975. Environmental and genetic factors affecting instability at mitosis in *Aspergillus nidulans*. Aspergillus News Letter, 12: 26-27.

- LIEBER, M. M., 1976. The effects of temperature on instability in *Aspergillus nidulans*. Mutation Research, 34: 93-122.
- McCLINTOCK, B., 1951. Chromosome organization and genic expression. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 16: 13-47.
- McCLINTOCK, B., 1953. Induction of instability at selected loci in maize. Genetics, 38: 579-599.
- McCLINTOCK, B., 1955. Intranuclear systems controlling gene action and mutation. Brookhaven Symposia Biology, 8: 58-71
- McCLINTOCK, B., 1956. Controlling elements and gene. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 21: 197-216.
- McCLINTOCK, B., 1965. The control of gene action in maize. Brookhaven Symposia on Biology, 18: 162-182.
- McCULLY, K. S. e E. FORBES, 1965. The use of p-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. Genetical Research, Cambridge, 6: 352-359.
- MENEZES, E. M., 1974. Análise genética de variantes deteriorados e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre, 114 p. Piracicaba, SP.
- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregation induced by p-fluorophenylalanine. Aspergillus News Letter, 2: 10.

- NGA, B. H., 1966. Quantitative introchromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. Ph. D. Thesis. University of Sheffield, Great Britain.
- NGA, B. H., 1968. Production and analysis of new translocations in *A. nidulans*. Aspergillus News Letter, 9: 16-17.
- NGA, B. H., 1968. High rate of spontaneous vegetative sectoring of diploids between a duplication strain and normal haploid. Strains in *A. nidulans* : lethal deletion. Aspergillus News Letter, 9: 17-18.
- NGA, B. H. e J. A. ROPER. 1966. A chromosomal process giving rise to vegetative instability in *Aspergillus nidulans*. Heredity, 21: 530-531.
- NGA, B. H. e J. A. ROPER, 1968. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. Genetics, 58: 193-209.
- NGA, B. H. e J. A. ROPER, 1969. A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, Cambridge, 14: 63-70.
- NEWCOMBE, H. B., 1953. Radiation induced instabilities in *Streptomyces*. Journal of General Microbiology, 9: 30-36.
- NEWMAYER, D., 1965. Somatic instability in *Neurospora* resulting from a pericentric inversion. Genetics, 52: 462-463.
- NEWMAYER, D. e C. W. TAYLOR, 1967. A pericentric inversion in *Neurospora* with unstable duplication progeny. Genetics, 56: 771-791.

- PARAG, Y. e J. A. ROPER, 1975. Genetic control of chromosome instability in *Aspergillus nidulans* as a mean for gene. Amplification in Eukaryotic microorganisms. Molecular and General Genetics, 140: 275-287.
- PETERSON, P. A., 1960. The pale green mutable system in maize. Genetics, 45: 115.
- POLLARD, D. R. ; E. KÄFER e M. T. JOHNSTON, 1970. Influence of chromosomal aberrations on meiotic and mitotic non disjunction in *Aspergillus nidulans*. Genetics, 60: 743-757.
- PONTECORVO, G. e E. KÄFER, 1958. Genetic analysis based on mitotic recombination. Advances in Genetics, 9: 71-104.
- PONTECORVO, G. ; J. A. ROPER ; L. M. HEMMONS ; K. D. McDONALD e A. W. J. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, 5: 141-238.
- PONTECORVO, G. ; E. TARR GLOOR e E. FORBER, 1954. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. Journal of Genetics, 52: 226-237.
- RHOADES, M. M., 1941. The genetic control of mutability in maize. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 9: 138-144.
- RHOADES, M. M. e E. DEMPSEY, 1973. Chromatin elimination induced by the B. chromosome of maize. Journal of Heredity, 64: 13-18.
- ROPER, J. A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. Experientia, 8: 14-15.

- ROPER, J. A. ; H. M. PALMER e W. A. WATMOUGH, 1972. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. The effects of caffeine. Molecular and General Genetics, 118: 125-133.
- ROSATO, Y. B., 1972. Efeitos do Etil-metano-sulfonato e Acriflavina na instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre, 74 p. Piracicaba, SP.
- SKAAR, P. D., 1956. A binary mutability system in *Escherichia coli*. Proceedings of National Academy of Sciences. USA, 42: 245-249.
- SMITH-KEARY, P. F., 1958. An unstable mutation in *Salmonella typhimurium*. Nature, London, 181: 1672.
- TECTOR, M. A. e E. KÄFER, 1962. Radiation induced chromosomal aberrations and lethals in *Aspergillus nidulans*. Science, 136: 1056-1057.
- TREFFERS, H. P. ; V. SPINELLI e N. O. BELSER, 1954. A factor or mutator gene influencing mutation rates in *Escherichia coli*. Proceedings of National Academy of Sciences, USA, 40: 1064-1071.
- UPSHALL, A., 1975. Mutation increasing non-disjunction in *Aspergillus nidulans*. Aspergillus News Letter, 12: 29-30
- UPSHALL, A. e E. KÄFER, 1974. Detection and identification of translocations by increased specific non-disjunction in *Aspergillus nidulans*. Genetics, 76: 19-31.

Von BORSTEL, R. C. ; S. K. QUAH ; C. M. STEINBERG ; F. FLURY e O. J. C. GOTTIEB, 1973. Mutants of yeast with enhanced spontaneous mutation rates. Genetics Supplement, 73: 141-151.

ZUCCHI, T. M. A. DOMINGUES, 1975. Instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, para obtenção do título de Doutor em Genética, 96 p. Ribeirão Preto, SP.

9 - A P Ê N D I C E

QUADRO A₁ - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 1//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos Nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	-Pro/ -Paba	+Gal	-Piro	+Ac	-s	-Nic	-Ribo
1	w	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
2	w	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
3	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
4	y	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
5	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
6	w	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
7	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
8	w	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
9	w	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
10	w	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
11	w	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+

QUADRO A₂ - Análise mitótica: setor haplóide do diplóide:
isolado 2//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos Nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	-Pro/ -Paba	+Gal	-Piro	+Ac	-s	-Nic	-Ribo
1	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
2	w	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
3	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
4	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
5	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
6	w	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
7	w	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
8	w	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
9	w	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
10	w	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
11	w	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
12	w	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
13	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
14	w	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
15	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
16	w	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
17	w	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-

QUADRO A₄ - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 5/MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	-Pro/ -Paba	+Gal	-Piro	+Ac	-s	-Nic	-Ribo
1	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
2	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
3	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
4	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
5	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
6	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
7	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
8	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
9	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
10	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
11	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
12	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
13	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
14	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
15	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
16	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
17	w	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
18	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
19	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
20	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
21	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
22	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
23	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
24	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
25	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+

QUADRO A₅ - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 6//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos Nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	-Pro/ -Paba	+Gal	-Piro	+Ac	-s	-Nic	-Ribo
1	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
2	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
3	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
4	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
5	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
6	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
7	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
8	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
9	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
10	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
11	w	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
12	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
13	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
14	y	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
15	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-

QUADRO A₈ - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 7//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos Nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	-Pro/ -Paba	+Gal	-Piro	+Ac	-s	-Nic	-Ribo
1	w	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	w	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
3	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
4	y	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
5	w	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
6	w	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
7	w	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
8	w	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
9	w	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
10	w	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
11	w	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-

QUADRO A₈ - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 9//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos Nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	-Pro/ -Paba	+Gal	-Piro	+Ac	-s	-Nic	-Ribo
1	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
2	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
3	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
4	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
5	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
6	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
7	w	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
8	w	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
9	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
10	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
11	y	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+
12	y	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
13	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
14	w	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
15	w	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
16	w	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
17	w	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
18	w	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
19	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
20	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
21	w	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
22	w	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
23	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
24	y	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
25	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
26	w	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-

QUADRO A₉ - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 10//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos Nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	-Pro/ -Paba	+Gal	-Piro	+Ac	-s	-Nic	-Ribo
1	w	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
2	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
3	w	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
4	w	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
5	w	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
6	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
7	y	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
8	w	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
9	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
10	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
11	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
12	y	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
13	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
14	w	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
15	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
16	y	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
17	w	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
18	w	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
19	w	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
20	y	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
21	w	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+

QUADRO A₁₀ - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 12//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	-Gal	-Meth	-Piro	+Ac	-Smeth	-Nic	-Ribo
1	y	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
2	w	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
3	w	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
4	w	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
5	y	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
6	y	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
7	y ⁺	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
8	w	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
9	w	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
10	y	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
11	y	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
12	w	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
13	w	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
14	y ⁺	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+

QUADRO A₁₁ - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 13//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos Nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	-Gal	-Meth	-Piro	+Ac	-Smeth	-Nic	-Ribo
1	y	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
2	y	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
3	y	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
4	y	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
5	w	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
6	y	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
7	y	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
8	y	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
9	y	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
10	w	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
11	y	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+

QUADRO A₁₂ - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 14//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	+Gal	-Meth	-Piro	+Ac	-Smeth	-Nic	-Ribo
1	w	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2	y	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
3	w	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
4	w	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
5	y	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
6	y	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
7	y	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
8	y ⁺	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
9	y	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
10	w	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
11	y	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
12	y	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
13	w	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+

QUADRO A₁₃ - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 15//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	+Gal	-Meth	-Piro	+Ac	-Smeth	-Nic	-Ribo
1	y	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
2	w	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
3	w	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
4	y	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
5	w	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
6	w	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
7	y	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
8	y	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
9	y	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
10	w	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+

QUADRO A₁₄ - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 16//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	+Gal	-Meth	-Piro	+Ac	-Smeth	-Nic	-Ribo
1	y	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
2	w	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
3	y	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
4	y	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
5	w	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
6	y	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
7	w	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
8	w	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
9	y	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
10	y	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-

QUADRO A₁₅ - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 17//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos Nutricionais										
	Cor	ME	MM	MM+T	+Gal	-Meth	-Piro	+Ac	-Smeth	-Nic	-Ribo
1	w	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
2	w	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
3	y	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
4	y	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
5	w	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
6	w	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
7	y	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
8	w	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
9	w	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
10	w	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
11	w	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
12	y	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
13	y	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
14	y	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
15	w	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
16	y	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
17	y	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
18	w	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
19	y	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
20	y	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-

QUADRO A₁₆ - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 18//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos Nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	+Gal	-Meth	-Piro	+Ac	-Smeth	-Nic	-Ribo
1	w	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
2	w	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
3	y	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
4	w	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
5	w	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
6	w	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
7	w	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
8	w	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
9	w	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
10	w	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
11	w	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
12	w	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
13	w	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-

QUADRO A₁₇ - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 19//MSE

Setor haplóide, de Número	Requisitos Nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	+Gal	-Meth	-Piro	+Ac	-Smeth	-Nic	-Ribo
1	y	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
2	w	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
3	w	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
4	y	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
5	y	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
6	y	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
7	y	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
8	w	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
9	y	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
10	y	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
11	y	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
12	y	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
13	y	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
14	y	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
15	w	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
16	w	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
17	w	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
18	y	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+

QUADRO A₁₈ - Análise mitótica: Setores haplóides do diplóide:
isolado 20//MSE

Setor haplóide de Número	Requisitos Nutricionais										
	Cor	MC	MM	MM+T	+Gal	-Meth	-Piro	+Ac	-Smeth	-Nic	-Ribo
1	y	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
2	w	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
3	y	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
4	w	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
5	w	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
6	w	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
7	w	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
8	w	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
9	y	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-
10	w	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
11	w	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+