

IVANHOÉ RODRIGUES BARACHO
Engenheiro-Agrônomo

ESTUDOS SOBRE CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO EM
Aspergillus nidulans (Eidam) Winter

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz" da Uni-
versidade de São Paulo, para a obten-
ção do título de Magister Scientiae.

PIRACICABA - 1968
Estado de São Paulo - Brasil

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

O autor deseja apresentar seus mais sinceros agradecimentos a todos aquêles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a execução dêste trabalho. E de maneira especial quer agradecer:

Ao Prof. João Lúcio de Azevedo, conselheiro principal, sem cuja orientação, ensinamentos e estímulo, êste trabalho não teria sido rea-
lizado;

Ao Prof. J.T. do Amaral Gurgel e ao Dr. M. Goodman, pelas su-
gestões no tocante à análise estatística;

Ao Prof. F.G. Brieger e ao Prof. Almiro Blumenschein, pelas
facilidades concedidas;

À Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
e Fundação Ford, pela bolsa de estudo recebida durante todo o transcurso
do curso de pós-graduação.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. Ciclo sexual	2
2.2. O heterotalismo relativo	2
2.3. A produção de peritécios	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1. Símbolos usados	7
3.2. Linhagens usadas	7
3.3. Meios de cultura e soluções usadas	12
3.4. Métodos usados	13
3.4.1. Análise da produção de peritécios	13
3.4.2. Cruzamentos	14
3.4.3. Análise de peritécios	15
3.4.4. Frequência de peritécios e conídios	15
3.4.5. Teste de heterocário.....	16
3.4.6. Perda de umidade do meio de cultura a 37°C	16
3.4.7. Auxanografia	16
4. RESULTADOS OBTIDOS	17
4.1. Produção de peritécios	17
4.1.1. Linhagens em meio completo sólido	17
4.1.2. Linhagens em meio mínimo sólido suplementado com 2% de meio completo sólido	18
4.1.3. Observações sôbre a linhagem C inoculada sôbre a linhagem A	19
4.2. Resultados dos cruzamentos	19
4.3. Perda de umidade do meio de cultura a 37°C	43
5. DISCUSSÃO	44
5.1. Análise da produção de peritécios pelas linhagens isoladas • em cruzamentos	44
5.2. Sôbre o heterotalismo relativo	45
5.3. Relação entre o tamanho do peritécio e hibridação	49
6. RESUMO E CONCLUSÕES	53
7. SUMMARY	55
8. RESUMETO	56
9. BIBLIOGRAFIA CITADA	57

1. INTRODUÇÃO

O fungo filamentoso Aspergillus nidulans (Eidam) Winter, vem desempenhando um papel de importância em Genética. As vantagens que esse Ascomiceto oferece para as pesquisas genéticas já foram assinaladas no clássico trabalho de PONTECORVO, ROPER, HEMMONS, MACDONALD e BUFTON (1953). Os estudos genéticos em A.nidulans vêm abordando os mais diversos aspectos. Dentre esses, têm merecido atenção de alguns pesquisadores os corpos de frutificação, que recebem a denominação de peritécios.

O A.nidulans é um fungo homotálico. Ele é capaz, portanto, de completar o seu ciclo sexual, sem cariogamia entre núcleos de diferentes origens. Entretanto, em estudos micológicos e genéticos, tem sido observada, nesse fungo, uma certa variação na produção de peritécios, produção essa que se mostra irregular e incerta. As observações sobre produção de peritécios em A.nidulans vieram mostrar que, enquanto algumas linhagens produzem somente conídios, outras são regularmente sexuais, e ainda outras podem permanecer produzindo conídios durante uma série de culturas e, de repente, começar a produzir peritécios. Também, apesar de ser um fungo homotálico, foi observado em A.nidulans um cruzamento cariogâmico preferencial que se denominou de "heterotalismo relativo".

Com relação aos corpos de frutificação em A.nidulans não havia, até agora, estudos que procurassem verificar a possível existência de uma correlação entre o tamanho do peritécio e uma condição de híbrido ou não híbrido. O presente trabalho teve por finalidade, preferencial, verificar essa correlação. Mas procurou-se, também estudar o comportamento de algumas linhagens com referência à produção de peritécio e com referência ao fenômeno do heterotalismo relativo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Na revisão da literatura há três pontos a serem considerados: O ciclo sexual do A.nidulans, o heterotalismo relativo e a produção de peritécios.

2.1. O ciclo sexual

A respeito do ciclo sexual em A.nidulans faremos um breve resumo baseado no trabalho de PONTECORVO, ROPER, HEMMONS, MACDONALD e BUFTON (1953).

O ciclo sexual do A.nidulans se realiza concomitantemente com o ciclo vegetativo. A germinação de um esporo vegetativo haplóide (conídio) dá origem a um micélio constituído por células multinucleadas. Algumas dessas células se diferenciam (células podais) e delas emergem os conidióforos. Estes terminam por uma visícula globosa e multinucleada da superfície da qual saem os esterigmas primários. Por sua vez cada esterigma primário vai dar origem a dois ou mais esterigmas secundários e cada um desses esterigmas secundários produz, então, uma cadeia de conídios uninucleados. Tanto os esterigmas primários como os esterigmas secundários são também uninucleados. Todos os conídios de uma cadeia, tendo seus núcleos derivados do núcleo do esterigma, possuem apenas uma espécie de núcleo.

É frequente ocorrer anastomoses de hifas do mesmo micélio. Mas pode haver também fusão de hifas de linhagens diferentes, dando origem aos heterocários.

Depois de oito a dez dias de incubação da cultura a 37°C, surgem os peritécios maduros. Eles são redondos, têm coloração escura e contêm, no seu interior, cerca de 10⁵ ascos. No interior de cada asco estão os ascosporos, em número de oito. Os ascosporos são binucleados e têm coloração avermelhada. Eles surgem de um processo cariogâmico, com a formação do zigoto e posterior divisão meiótica, que produz quatro células haplóides. Cada uma dessas células, por sua vez, sofre uma divisão mitótica e disso resulta a formação de oito células dentro de cada asco.

Quando os peritécios se formam em heterocários, eles podem conter núcleos das diferentes linhagens, e são chamados de peritécios híbridos.

2.2. O heterotalismo relativo

O homotalismo tem sido definido como a capacidade que tem uma linhagem, cujos núcleos são derivados de um simples núcleo haplóide, de a-

tingir o ciclo sexual completo, enquanto o heterotalismo seria a incapacidade de completar o ciclo sexual sem cariogamia entre núcleos de diferentes origens (PONTECORVO e col., 1953).

Dentro desse conceito o A.nidulans é um fungo homotático. Já SCHWARTZ, em 1928, assinalava o homotalismo desse fungo. Posteriormente, HENRARD (1934) demonstrou de maneira concludente que A.nidulans é um fungo homotático.

Mas apesar de ser um fungo homotático, em A.nidulans foi verificado um fenômeno que apresenta uma certa relação com o heterotalismo.

HENRARD (1934) descobriu entre seu material, duas diferentes linhagens de A.nidulans que, quando juntas, produziam um pigmento vermelho, ao longo da linha de contacto. Apesar das linhagens serem autoférteis, os peritécios, colhidos nessa zona de contacto, eram híbridos. A esse fenômeno ele chamou de "heterotalismo fisiológico".

PONTECORVO, FORBES e ADAM (1949), em experimentos com mutantes nutricionais e morfológicos, conseguiram a formação de heterocário de culturas que diferiam em inúmeros caracteres. A análise dos peritécios revelou que uns eram híbridos e outros não.

HEMMONS, PONTECORVO e BUFTON (1952) estudando vinte e duas diferentes linhagens mutantes de A.nidulans não só confirmaram a experiência de PONTECORVO, FORBES e ADAM (1949), mas descobriram que em dez dos vinte e dois cruzamentos as proporções mostravam cruzamento cariogâmico de aproximadamente 100%. Como as linhagens usadas eram autoférteis, verificava-se assim, um cruzamento cariogâmico preferencial, que esses autores denominaram de "heterotalismo relativo", definido como o aparecimento de ascos híbridos, numa proporção acima de 50%, em certas combinações de linhagens.

PONTECORVO et al. (1953) analisando vinte e sete cruzamentos de vinte e uma diferentes linhagens, observaram que em dezesseis desses cruzamentos, a proporção de peritécios híbridos era superior a 50%, e em determinado cruzamento, a análise de trinta peritécios mostrou que todos eles continham ascos híbridos.

OLIVE (1954) assinalando que o comportamento que indica a existência de uma tendência homotática e heterotática numa mesma espécie, não é próprio apenas de Aspergillaceae, mas foi descrito também em certos fermentos, em Hypomyces solani, Glomerella cingulata, Ophiostoma fimbriata, Sordaria fimicola e outros, considerou que, talvez, a definição do termo "anfitalismo", proposto por LANQUE para certos Basidiomicetos, pudesse ser ampliada para incluir também esses fungos.

OLIVE (1958) considerou ser o termo "heterotalismo relativo" de valor duvidoso, na ausência de informações mais detalhadas sobre a natureza dos fatores genéticos envolvidos e assinalou não ter sido observado esse cruzamento cariogâmico preferencial em Sordaria fimicola, no qual esse fenômeno foi posteriormente verificado (CARR e OLIVE, 1959).

BAINBRIDGE (1964), usando linhagens de A.nidulans deficientes para a síntese de arginina, em cruzamentos em meio completo, obteve seis cruzamentos que apresentaram peritécios híbridos, numa proporção de 100%, sendo de 25% a mais baixa frequência de peritécios híbridos encontrada.

2.3. A produção de peritécios

Como já foi dito, anteriormente, tem sido observada em A.nidulans uma certa variação na produção de peritécios.

HENRARD (1934) estudando a sexualidade desse fungo, teve oportunidade de observar que linhagens que não formavam peritécios, em certo meio de cultura, puderam formar em outro meio, que ele considerou mais favorável. Constatou também que ligeiras diferenças do meio de cultura influíam na formação de peritécios. Segundo o mesmo autor, essas ligeiras diferenças poderiam influir para que os peritécios aparecessem mais cedo ou mais tarde, e em menor ou maior número.

JINKS (1954) notou que depois de algumas transferências, por meio de conídios, a formação de peritécios era progressivamente menor, até que depois de certo número de transferências nenhum peritécio era produzido, e que esse estado não-peritecual permanecia por mais de um ano. Quando se usava a propagação por meio de ascosporos, a formação de peritécios ia aumentando até atingir o nível da cultura normal, mas havia um decréscimo na produção de conídios.

SMITH (1957) assinalou que ocasionalmente aparecem linhagens puramente conidiais ou que podem permanecer assim durante uma série de culturas e repentinamente começar a produzir peritécios.

MAHONEY e WILKIE (1958) observaram que linhagens selvagens segregavam linhagens periteciais e não-periteciais e que a frequência de colonias não periteciais era mais alta a 37°C do que a 25°C. Verificaram também que a linhagem assexual, que denominaram linhagem alba, apresentava uma certa taxa de reversão para formas periteciais. Estudando o fenômeno do ponto-de-vista genético, tais autores, consideraram que o fator que atuava, nesse caso, não estava diretamente associado com o núcleo da linhagem peritecual, mas com o seu citoplasma.

ARLETT (1960) assinalou, apoiado em outros autores, que a produção de peritécios pelo A.nidulans, era incerta e que havia linhagens puramente conidiais e linhagens regularmente sexuais, e ainda outras que só davam formas imperfeitas durante uma série de culturas, mas que, de repente, produziam abundantes peritécios. Aplicando pressão de seleção para modificar a densidade de peritécios, não conseguiu, através de propagação por conídio, diminuir a produção, e considerou não ser possível estabelecer, desse modo, a assexualidade. Cruzando uma linhagem estéril, deficiente em arginina, com uma linhagem fértil, deficiente em ácido p-aminobenzóico, verificou que o grau de esterilidade variou na descendência proveniente de conídios, e concluiu que a expressão do gene mutante responsável pela esterilidade, na linhagem deficiente em arginina, era capaz de ser modificado pelo citoplasma.

MAHONEY e WILKIE (1962) desenvolvendo os estudos sobre quatro linhagens selvagens que segregavam o mutante espontâneo e não-peritecival alba, concluíram que a frequência de alba era controlada por um gene f. Como esse mutante alba apresentava uma taxa de reversão para formas periteciais e a análise do mesmo demonstrava claramente uma herança não mendeliana, sugeriram que a produção de peritécios poderia depender de uma unidade ou partícula citoplasmática interagindo com o gene f. A perda dessa partícula determinaria o aparecimento do mutante alba estável, enquanto um número baixo, de partículas, produziria os mutantes alba, capazes de reverter às formas periteciais; essas formas periteciais somente seriam possíveis quando o número de partículas estivesse acima de determinado limite.

Em outra interpretação esses autores consideraram que essa herança citoplasmática poderia ser explicada também por um ciclo de reações, no qual a ação heterocatalítica de cada membro do ciclo permitisse a reprodução de cada um deles, num sistema pseudo-autocatalítico. A perda de uma unidade constituinte poderia causar a quebra do sistema e isso refletiria na produção do mutante alba.

CLUTTERBUCK, em 1963 (em trabalho não publicado, citado por BANBRIDGE, 1964) observou que, em meio completo, ao qual não fosse adicionado suplementarmente arginina, grandes peritécios se desenvolviam na junção de colônias com requerimento em arginina, com colônias de outras linhagens, e que os peritécios produzidos, nessa junção, eram predominantemente híbridos.

BAINBRIDGE (1964) partindo das observações de CLUTTERBUCK, para desenvolver uma técnica de obter peritécios híbridos, chegou à conclusão preliminar de que o efeito peritecival era devido à presença do alelo arginina

ou a efeitos muito associados com êle, e que a ausência do efeito quando se adicionava suplementarmente arginina, ao meio completo, sugeria que isso poderia ser devido a uma inibição parcial da linhagem com deficiência em arginina, em meio contendo arginina e lisina balanceados em certos limites.

CROFT (1966) constatou que linhagens selvagens segregavam linhagens periteciais e não-periteciais, e que essa segregação ocorria em proporções não mendelianas. Admitiu que a variação de formas periteciais até não-periteciais, que apareciam nessa segregação, estava sob um controle multifatorial. Testes de heterocários indicaram a participação de um fator extracromossômico no controle da diferença entre o estado peritecial e não-peritecial.

AZEVEDO (1966) assinalando que o procedimento de vedar com fita celulósica as placas de petri, favorecia a produção de peritécios, considerou que isso possivelmente era devido a uma anaerobiose parcial, Segundo informação pessoal, apoiou-se em trabalho não publicado de BALL e BAINBRIDGE.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Símbolos usados.

Para facilitar a exposição, os fenótipos dos mutantes referidos, no presente trabalho, serão indicados pelos símbolos seguintes, comumente utilizados em trabalhos de Genética de fungos:

<u>Símbolos</u>	<u>Fenótipo</u>
<u>Acr 1</u>	resistência à acriflavina
<u>ad 1, ad 2, ad 14, ad 20</u>	requerimento para adenina
<u>an 1</u>	requerimento para aneurina
<u>bi 1</u>	requerimento para biotina
<u>cha</u>	conídios de coloração chartreuse (verde limão)
<u>cho</u>	requerimento para colina
<u>co</u>	colônia compacta
<u>fl 1</u>	micélio aéreo de aparência cotonosa (fluffy)
<u>lys 5</u>	requerimento para lisina
<u>meth 1</u>	requerimento para metionina
<u>nic 2</u>	requerimento para ácido nicotínico
<u>paba 1 e paba 6</u>	requerimento para ácido p-aminobenzóico
<u>phen 2</u>	requerimento para fenilalanina
<u>pro 1</u>	requerimento para prolina
<u>pyro 4</u>	requerimento para piridoxina
<u>ribo 1, ribo 2, ribo 5</u>	requerimento para riboflavina
<u>s 3 e s 12</u>	requerimento para tiosulfato
<u>su 1 ad 20</u>	supressor do mutante <u>ad 20</u>
<u>w 2 e w 3</u>	conídios brancos
<u>y</u>	conídios amarelos
<u>ve</u>	forma conidial aveludada (velvet)
<u>(ve +)</u>	forma selvagem de <u>ve</u>

3.2. Linhagens usadas

No presente trabalho foram utilizadas linhagens haplóides de A. nidulans do Instituto de Genética da E.S.A.L.Q., que por sua vez foram derivadas do estoque de Glasgow, Grã-Bretanha. Essas linhagens depois de purificadas e caracterizadas, foram mantidas em estoque, em meio completo, em agar inclinado, à temperatura ambiente. As linhagens utilizadas foram as seguintes:

- (1) y; nic 2, ribo 5 (linhagem A)
- (2) y; w 2; s 12; pyro 4 (linhagem B)
- (3) an 1, bi 1 (linhagem C)
- (4) bi 1; meth 1; fl 1 (linhagem D)
- (5) y, ad 14; co (linhagem E)
- (6) su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1;
Acr 1; lys 5; cha (linhagem F)
- (7) pro 1, paba 6, y; w 3 (linhagem G)

A denominação das linhagens que vem entre parêntesis, foi dada, por nós, para facilitar a exposição, e é usada sempre que conveniente. Essas linhagens foram escolhidas com base em seus fenótipos, uma vez que elas apresentam características visuais que permitem distinguir umas das outras em cruzamentos.

As linhas de ascendência dessas linhagens podem ser encontradas nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Essas linhas de ascendência foram estabelecidas com base nos trabalhos de KAFER (1965) e de BARRATT, JOHNSON e OGATA (1965). Não é dada a linha de ascendência da linhagem y; nic 2; ribo 5 por não se dispor de informação, quer publicada ou pessoal.

A Figura 7, apresenta o mapa genético do A.nidulans, contendo os genes usados no presente trabalho.

FIGURA 1

Ascendência da linhagem B

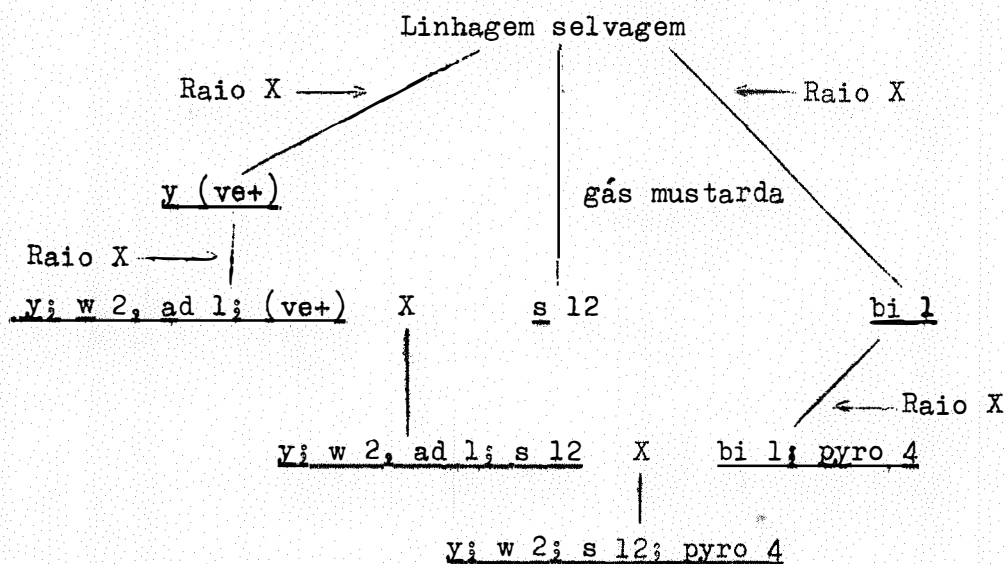


FIGURA 2

Ascendência da linhagem C.

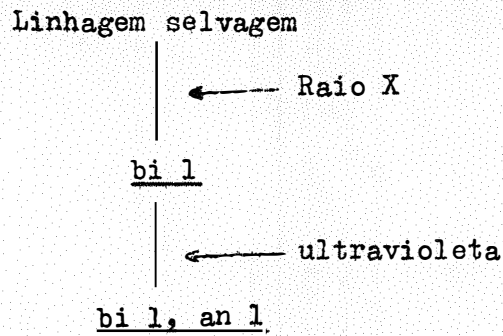


FIGURA 3

Ascendência da linhagem D

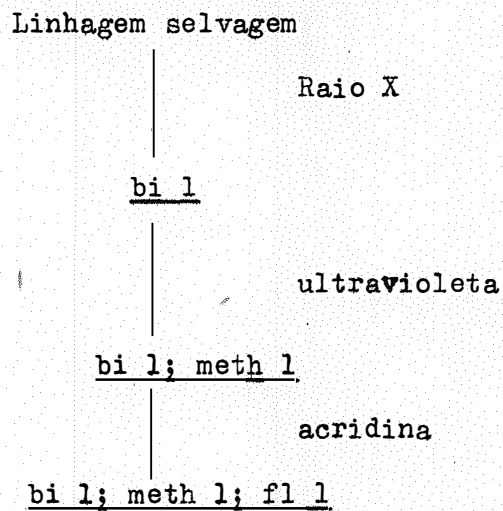


FIGURA 4

Ascendência da linhagem E

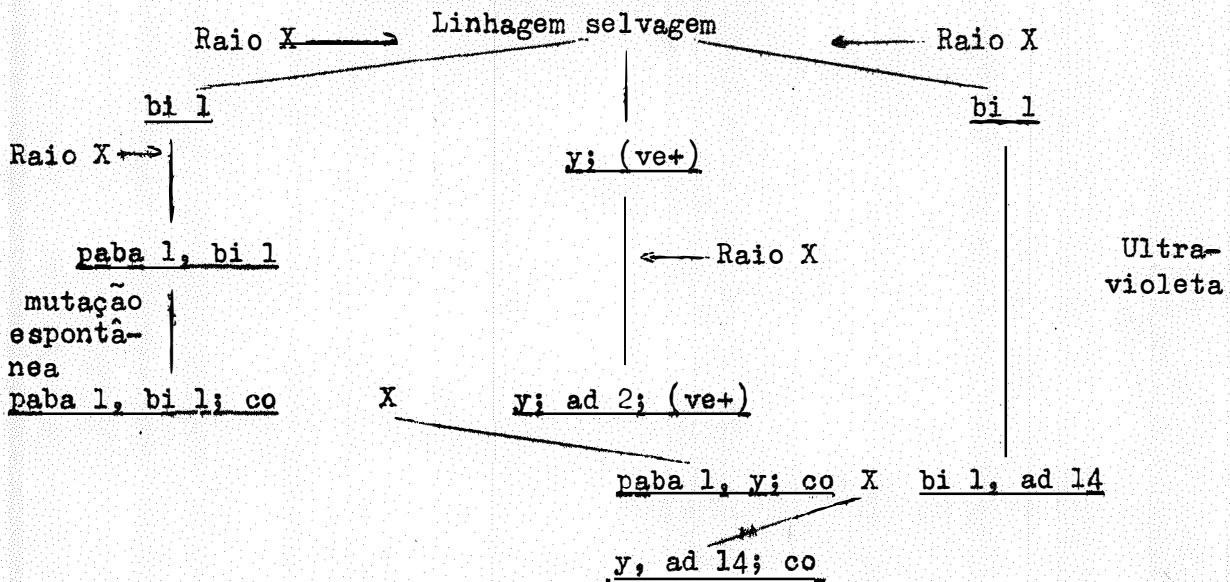


FIGURA 5

Ascendência da linhagem F

A linha de ascendência dessa linhagem poderá ser vista com detalhes em KMFER (1965) e BARRATT et al. (1965).

su 1 ad 20, an 1, ad 20; Acr 1, w 2 X paba 1, y; Acr 1; co, ribo 2

su 1 ad 20, ad 20, bi 1; w 2; cho; cha X su 1 ad 20, ribo 1, paba 1, ad 20; cho; cha

su 1 ad 20, ad 20, bi 1; w 2, cho; cha X paba 1, y, ad 20; phen 2; pyro 4; lys 5; s 3

su 1 ad 20, paba 1, y, ad 20; Acr 1; lys 5; cha

FIGURA 6

Ascendência da linhagem G

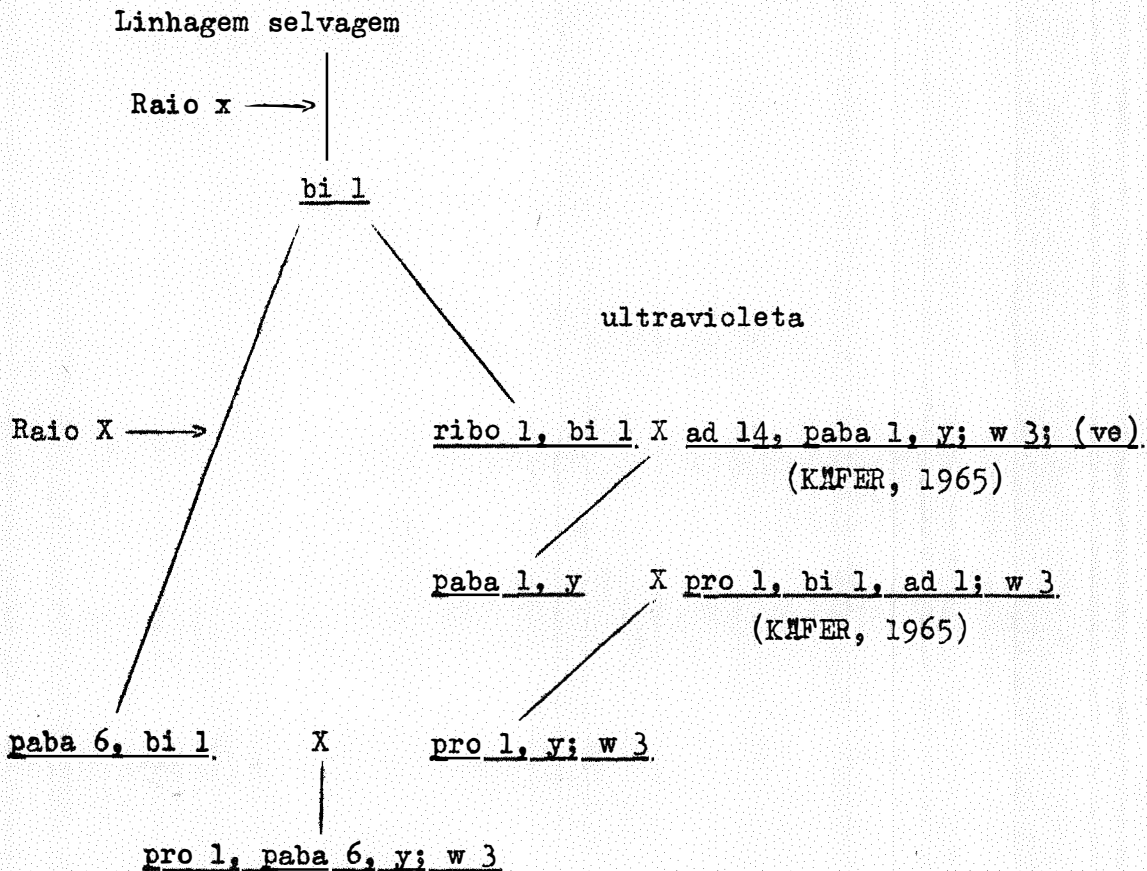
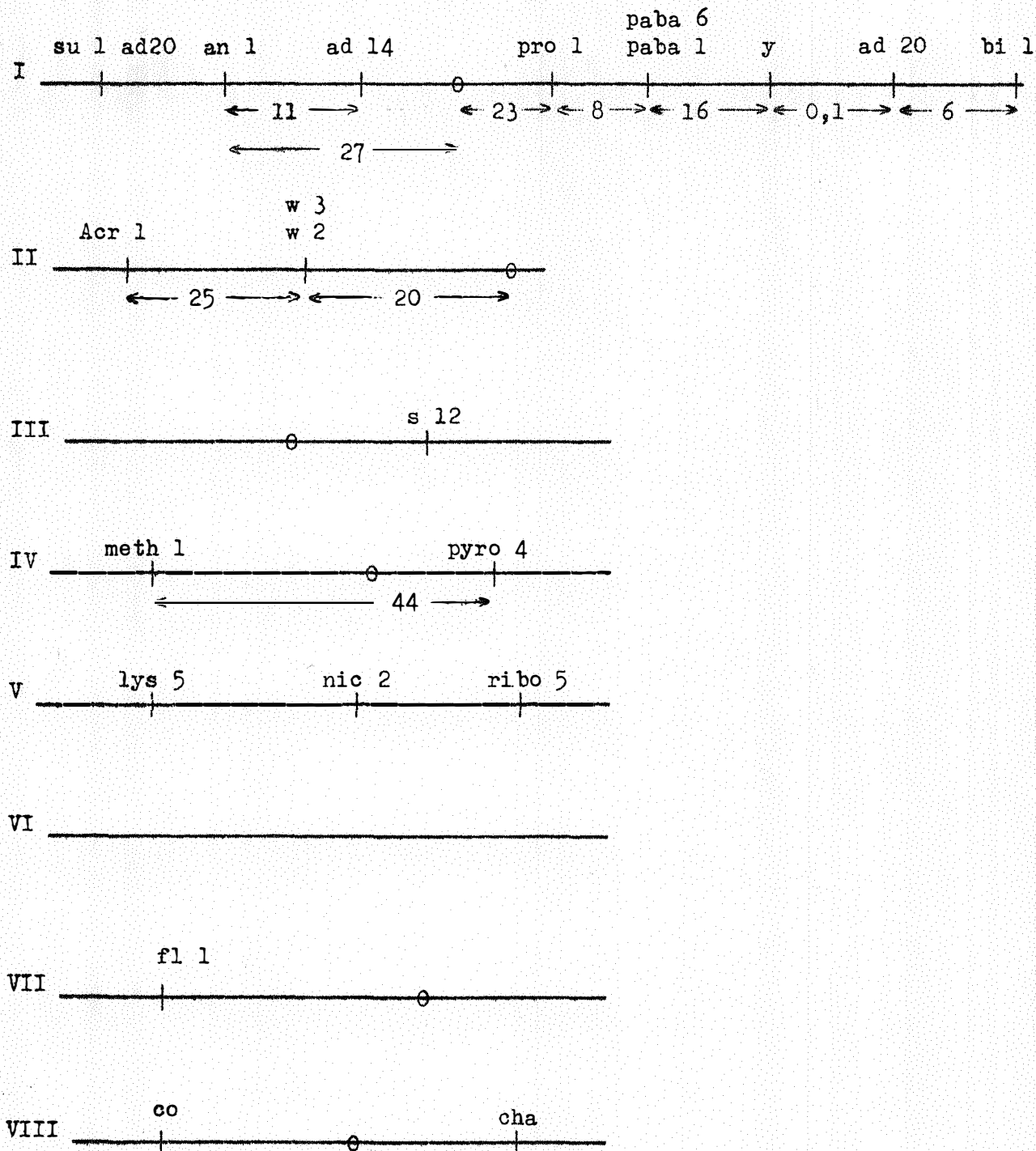


FIGURA 7

Mapa genético de A.nidulans, contendo os vários genes mutantes usados no presente trabalho.



Observação:- As distâncias em unidades meióticas de recombinação não estão em escala no mapa genético.

3.3. Meios de cultura e soluções usadas

Os meios de culturas usados, no presente trabalho, foram o meio mínimo e o meio completo a que se referem PONTECORVO e col. (1953).

Meio mínimo líquido

Nitrato de sódio.....	30 g
Cloreto de potássio.....	2,6 g
Sulfato de magnésio+7H ₂ O.....	2,6 g
Fosfato dihidrogenado de potássio.....	7,6 g
Sulfato de ferro.....	traços
Sulfato de zinco.....	traços
Glicose.....	50 g

Água destilada para completar 5 litros, e pH ajustado para pH 6,5 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico.

Meio mínimo sólido

Ao meio mínimo líquido foi adicionado agar Oxoid nº 3 (1,5%).

Meio completo líquido

Peptona (Oxoid).....	20 g
Extrato de leveduras (Oxoid).....	5 g
Caseína hidrolisada (Oxoid).....	15 g
Solução de vitaminas.....	10 ml
Ácido nucléico de leveduras de hidrolisado.....	25 ml

Completou-se até 10 litros com água de torneira, ajustou-se o pH para 6,5, com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico, e filtrou-se.

Meio completo sólido

Ao meio completo líquido adicionou-se agar Oxoid nº 3 (1,5%).

Esses meios, depois de autoclavados, a 1 atmosfera, por 10 minutos, foram guardados, em lugar escuro, à temperatura ambiente.

O ácido nucléico de levedura hidrolisado adicionado ao meio completo foi preparado da maneira seguinte:

Primeiramente foi feita uma solução juntando-se duas gramas de ácido nucléico de levedura (Oxoid) a 15 ml de solução normal de hidróxido de sódio. Depois foi feita outra solução juntando-se duas gramas de ácido nu-

cléico de levedura (Oxoid) a 15 ml de uma solução normal de ácido clorídrico. Essas duas soluções foram aquecidas a 100°C por 20 minutos, em seguida misturadas e o pH ajustado para 6,0. A solução resultante dessa mistura foi filtrada a quente, seu volume ajustado para 40 ml, e guardada no refrigerador sôbre clorofórmio.

A solução de vitaminas adicionada ao meio completo, tinha a seguinte composição:

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

A solução foi esterilizada por 15 minutos, em banho-maria, e durante três dias foi repetida essa operação. Em seguida a solução foi guardada em frasco escuro, no refrigerador.

No presente trabalho também foram usadas solução salina 0,15 M e solução Tween. No caso da solução salina 0,15 M, cloreto de sódio foi dissolvido em água destilada para dar uma solução 0,87%. Na preparação da solução de Tween, Tween 80 foi distribuído em água destilada para dar uma concentração de 0,1% (v/v). Ambas as soluções foram autoclavadas.

3.4. Métodos usados

No presente trabalho analisou-se o comportamento das 7 linhagens, quanto à formação de peritécio, efetuando-se o cruzamento dessas 7 linhagens entre si, num total de 21 cruzamentos, e procedeu-se a análise de 246 peritécios provenientes desses 21 heterocários.

3.4.1. Análise da produção de peritécios

Essa análise foi feita com o objetivo de verificar se as linhagens utilizadas, no presente trabalho, eram sexuais ou assexuais, e, em alguns casos, procurar verificar uma possível influência do meio na produção de peritécios, por parte dessas linhagens.

a) Para verificar se as linhagens eram sexuais ou assexuais, placas de petri, esterilizadas, com 9 cm de diâmetro, na base, e com papel de filtro na tampa, e contendo 40 ml de meio completo sólido, foram inoculadas

em quatro pontos, com as linhagens usadas neste trabalho. A inoculação foi feita transferindo-se conídios e pedaços de micélio, do fungo, por meio de um fio de platina flambada, sendo colocada uma linhagem em cada placa e usando-se duas placas para cada linhagem, uma placa vedada e outra não vedada. As placas foram colocadas na estufa a 37°C e as observações foram feitas com 10, 15 e 30 dias. Nos casos em que não foi verificada formação de peritécios, repetiu-se a operação por mais duas vezes. Em todos os casos partiu-se de culturas de 5 a 10 dias.

b) Para verificar o comportamento dessas linhagens, em um meio deficiente, elas foram inoculadas, da maneira anteriormente explicada, em placas de petri contendo meio mínimo sólido suplementado com 2% de meio completo sólido. As placas foram vedadas com fita celulósica e colocadas na estufa a 37°C e observadas após 10 e 20 dias de incubação.

c) Para verificar a interferência de um possível sintrofismo de tal modo que uma linhagem pudesse suplementar o meio mínimo com substâncias necessárias ao crescimento da outra, a linhagem A foi inoculada em duas placas de petri contendo meio mínimo suplementado com ácido nicotínico e riboflavina. A inoculação foi feita em diversos pontos da placa, do modo já referido anteriormente. As placas foram colocadas na estufa a 37°C e depois de quatro dias, quando o fungo estava desenvolvido, as placas foram autoclavadas por 10 minutos a 1 atmosfera; morto o fungo, foi inoculada, nessas placas, a linhagem C, feita a vedação, com fita celulósica, e as placas foram incubadas na estufa a 37°C. As observações foram feitas com 10, 15 e 28 dias após a incubação.

3.4.2. Cruzamentos

Os cruzamentos foram feitos com fundamento no fenômeno de heterocariose que ocorre em A.nidulans (PONTECORVO e col., 1953). A formação de heterocários balanceados foi possível desde que as linhagens usadas, no presente trabalho, tem requerimentos nutricionais. A técnica usada foi a seguinte: Conídios transferidos para solução de Tween, por meio de alça de platina, foram dessegregados, por agitação. A densidade da suspensão de conídios foi estimada em um hemocitômetro. Quando necessários foram feitas diluições, pipetando-se volumes conhecidos da suspensão, em 9 ml de solução salina. Conhecida a densidade da suspensão de conídios foi possível colocar quantidades aproximadamente iguais de conídios das linhagens cruzadas, em tubos contendo 2 ml de meio mínimo líquido suplementado com 2% de meio completo líquido. A quantidade aproximada de conídios colocados foi de 500 mil co

nídios de cada linhagem. Esses conídios, em tubos de ensaio com meio mínimo líquido suplementado, foram em seguida levados à estufa por 2 a 3 dias, onde permaneceram à temperatura de 37°C. Durante esse período formou-se uma película, na superfície do meio. Para cada cruzamento, a película foi retirada e cortada em quatro pedaços, de tamanho aproximadamente igual, na superfície do meio mínimo sólido, em placas de petri, cada placa contendo 40ml de meio mínimo sólido. Em seguida as placas foram incubadas a 37°C. Uma vez verificado o aparecimento de setores heterocarióticos, as placas foram vedadas com fita celulósica.

No caso do cruzamento entre linhagens, requerendo um fator comum, foi usado suplementar, com a substância requerida, tanto o meio mínimo líquido suplementado com 2% de meio completo, como o meio mínimo sólido.

Para verificar a existência ou não de peritécios, observações foram feitas com 10, 15 e 28 dias após a incubação.

3.4.3. Análise de peritécios

O método de análise de peritécios, usado, no presente trabalho, foi o mesmo descrito por PONTECORVO e col., (1953). Por meio de um fio de platina, peritécios foram transferidos para uma placa de petri, com ágar (3%) e em seguida rolados na superfície do ágar, para remover as células de Külle, que são viáveis (SCHWARTZ, 1928), e também remover os conídios a eles aderidos. Depois de limpos, os peritécios foram transferidos para placas de petri, com 20 ml de meio completo. Na parede das placas eles foram esmagados com fio de platina, e os ascosporos espalhados no meio de cultura, em linha dirigida para o centro da placa. Em cada placa foram colocados quatro peritécios provenientes de um cruzamento. As placas foram incubadas a 37°C. Após dois dias de incubação foi verificado se os peritécios eram híbridos ou não.

3.4.4. Frequência de peritécios e conídios

A frequência de peritécios foi calculada, fazendo-se a contagem dos peritécios em um campo de 7,2 mm de diâmetro na lupa entomológica. Dez desses campos foram contados em quatro heterocários de cada cruzamento. A contagem foi feita tomando-se os campos ao acaso.

Para dar uma indicação da distribuição desses peritécios, considerou-se um valor de dispersão de 0 a 10, e que foi estabelecido, para cada cruzamento, tomando-se o número de campo em que se contou um ou mais peritécios.

A frequência de conídios foi calculada transferindo-se, por meio de alça de platina, os conídios de quatro campos, com 7,2 mm de diâmetro, es colhidos ao acaso, para uma solução de Tween. Esses conídios foram desagregados agitando-se a suspensão e a mesma foi diluída de 1:10 em solução salina, e feita a contagem dos conídios em hemocitômetro. Dessa contagem pôde ser estimada a frequência de conídios por mm².

Tanto a contagem de peritécios como a de conídios foram feitas após 28 dias de incubação do heterocário.

3.4.5. Teste de heterocário

Para verificar a relação de núcleos, no cruzamento, foi feita uma suspensão de conídios, em Tween. Esses conídios foram desagregados pela agitação, contados em hemocitômetro, e diluídos em solução salina, de tal maneira que crescessem cêrca de 20 a 30 colônias, por placa de petri. A semeadura foi feita em placas de petri, contendo meio completo, colocando-se em cada placa 0,1 ml da suspensão. Essas placas foram colocadas em estufa a 37°C; depois de dois dias, as colônias foram caracterizadas e conta das.

Desde que os conídios de A.nidulans são uninucleados (YUILL, 1950) êsse método denominado por JINKS (1954) de "heterokaryon test", pode ser usado para se conhecer a relação de núcleos do heterocário.

3.4.6. Perda de umidade do meio de cultura a 37°C

Para verificar a perda de umidade do meio de cultura, duas placas de petri, com 9 cm de diâmetro na base, foram pesadas destampadas e vazias. Em seguida colocou-se em cada uma dessas placas 40 ml de meio completo sólido. As placas com êsse meio de cultura foram novamente pesadas, sem tampa, em condições asséticas. Colocadas as tampas, uma placa foi vedada com fita celulósica e a outra não, e ambas foram colocadas na estufa a 37°C por dez dias. Após êsse período de tempo as placas foram retiradas da estufa e novamente pesadas, sem tampa.

3.4.7. Auxanografia

Em casos em que não foi possível caracterizar morfológicamente as linhagens, elas foram caracterizadas pela técnica de auxanografia (PONTECORVO, 1949).

4. RESULTADOS OBTIDOS4.1. Produção de peritécios4.1.1. Linhagens em meio completo sólido

O quadro I apresenta o comportamento das linhagens em meio completo sólido, com relação à produção de peritécios

QUADRO I - Produção de peritécios em meio completo sólido

LINHAGENS							
1ª REPETIÇÃO	A	B	C	D	E	F	G
Em placas vedadas	-	+	-	-	+	+	-
Em placas sem vedar	-	+	-	-	+	-	-
2ª REPETIÇÃO							
Em placas vedadas	+		-	-			-
Em placas sem vedar	+		-	-		+	-
3ª REPETIÇÃO							
Em placas vedadas			-	-			-
Em placas sem vedar			-	-			-

Observações:

- + presença de peritécios
- ausência de peritécios

Os quadros em branco indicam que as linhagens não foram ensaiadas.

Como se nota pela observação do Quadro I, apenas as linhagens C, D e G não produziam peritécios. No entanto, em tubos de ensaio, em cultura de meio completo sólido inclinado, à temperatura ambiente, e com mais de dois meses, pode-se notar peritécios produzidos pela linhagem C, mas não pelas linhagens D e G.

Das linhagens que produziram peritécios em placas como indicado no Quadro I (A, B, E e F) foram analisados quatro peritécios, de cada, sendo que os peritécios das linhagens A e B mostraram possuir ascosporos viáveis, enquanto os das linhagens E e F apresentaram ascosporos inviáveis.

4.1.2. Linhagens em meio mínimo sólido suplementado com 2% de meio completo sólido.

Além de serem ensaiadas em meio completo, as sete linhagens usadas foram também ensaiadas em meio mínimo sólido suplementado com 2% de meio completo.

Os resultados podem ser encontrados no Quadro II.

QUADRO II - Crescimento e produção de peritécios nas linhagens crescidas em meio mínimo sólido + 2% de meio completo.

Linhagens	Crescimento	Produção de peritécios	Observações sobre o crescimento
A	+	+	Crescimento desigual com setores de crescimento residual com micélio cotonoso e aéreo e sem conídios e setores vigorosos com conídios e peritécios
B	+	-	Crescimento residual com conídios muito esparsos e amarelados na maioria dos casos. Raramente apareceram conídios brancos
C	+	-	Crescimento residual
D	+	-	Crescimento bom
E	+	-	Crescimento residual
F	-	-	
G	-	-	

Obs.: - Todos os ensaios foram feitos em placas vedadas. O sinal + indica crescimento e produção de peritécios. O sinal - indica ausência de crescimento e não produção de peritécios.

4.1.3. Observações sôbre a linhagem C inoculada sôbre a Linhagem A

Nas placas em que anteriormente fora inoculada a linhagem A, depois autoclavadas, e, em seguida, inoculada linhagem C, a linhagem C apresentou um crescimento tipicamente residual, com o aparecimento de micélios aéreos cotonosos, e só, em alguns pequenos setores, surgiram poucos conídios, ora de côr violácea, ora de côr verde. Esses conídios de côr violácea transportados a meio completo reproduziram a linhagem C típica.

4.2. Resultados dos cruzamentos

Os Quadros III a XXIII, apresentam o resultado dos 21 cruzamentos efetuados entre as 7 linhagens utilizadas. Para cada cruzamento foi calculada a frequência de peritécios por mm^2 , a frequência de conídios por $\text{mm}^2 \times 10^{-3}$, a dispersão dos peritécios e a % de conídios através do teste de heterocário. Os Quadros III a XXIII apresentam também os resultados da análise dos peritécios e o teste de X^2 correspondente ao número de peritécios híbridos e não híbridos, considerando-se como frequência esperada que a metade dos peritécios analisados deveriam ser híbridas e a outra metade não híbrida.

QUADRO III - Linhagem A X Linhagem B

Frequência de peritécios por mm² 0,2
 Frequência de conídios por mm² x 10⁻³ 147
 Dispersão..... 4

Teste de heterocário

% de Conídios da linhagem A..... 96,3%
 % de Conídios da linhagem B..... 3,7%

Análise dos peritécios

Peritécio Nº	Tamanho do peritécio (em micra)	Não híbrido	Híbrido
1	162	+ B	
2	144	+ B	
3	72	+ B	
4	288	+ B	
5	72	+ B	
6	180	+ B	
7	108		+
8	90	+ B	
9	252		+
10	180	+ B	
11	180	+ B	
12	152		+
		X ² = 3,0 n.s.	

Observações:-

O sinal + assinala o tipo de peritécio (híbrido ou não híbrido).

A letra colocada ao lado do sinal + na coluna correspondente aos peritécios não híbridos, indica a linhagem que forneceu os núcleos para a formação do peritécio.

QUADRO IV - Linhagem A X Linhagem C

Frequência de peritécios por mm^2	0,7
Frequência de conídios pro $\text{mm}^2 \times 10^{-3}$	52
Dispersão.....	7

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem A.....	46,2%
% de Conídios da linhagem C.....	53,8%

Análise dos peritécios

Peritécio Nº	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	324		+
2	288	+ C	
3	324		+
4	216	+ C	
5	180	+ A	
6	126	+ A	
7	216		+
8	198		+
9	162	+ C	
10	108	+ C	
11	468	+ A	
12	108	+ C	
		$\chi^2 = 1,33$ n.s.	

QUADRO V - Linhagem A X Linhagem D

Frequência de peritécios por mm²..... 0,8
 Frequência de conídios por mm² x 10⁻³..... 18
 Dispersão..... 9

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem A..... 77,8%
 % de Conídios da linhagem D..... 22,2%

Análise dos peritécios

Peritécio Nº	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	252	+ D	
2	288	+ D	
3	216		+
4	144		+
5	144	+ D	
6	216		+
7	216		+
8	126	-	-
9	144	+ D	
10	144	+ D	
11	72	+ D	
12	144	+ D	
13	72	+ D	
14	144	+ D	
		X ² = 1,92 n.s.	

Observações:

O sinal - indica que os peritécios não produzem ascósporos viáveis e como consequência o seu estado híbrido ou não híbrido não pode ser determinado.

QUADRO VI - Linhagem A X Linhagem E

Frequência de peritécios por mm^2 1,4
 Frequência de conídios por $\text{mm}^2 \times 10^{-3}$ 18
 Dispersão..... 9

Análise dos peritécios

Peritécio Nº	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	180	+ E	
2	216	+ E	
3	198	+ E	
4	108	+ E	
5	108	+ E	
6	144	+ E	
7	144	+ E	
8	216	+ E	
9	180	+ E	
10	144	+ E	
11	144	+ E	
12	108	+ E	
		$\chi^2 = 12,0$ ***	

QUADRO VII - Linhagem A X Linhagem F

Frequência de peritécios por mm^2 0,2
 Frequência de conídios por $\text{mm}^2 \times 10^{-3}$ 36
 Dispersão..... 5

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem A..... 44,3%
 % de Conídios da linhagem F..... 55,7

Análise dos peritécios

Peritécio Nº	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	126		+
2	252		+
3	252		+
4	144		+
5	180		+
6	252		+
7	180	+ F	
8	360		+
9	126		+
10	180		+
11	216		+
12	216		+
13	108	+ F	
14	72	+ F	
		$\chi^2 = 4,57$ *	

QUADRO VIII - Linhagem A X Linhagem G

Frequência de peritécios por mm^2 0,1
 Frequência de conídios por $\text{mm}^2 \times 10^{-3}$ 98
 Dispersão..... 3

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem A..... 2,0%
 % de Conídios da linhagem G..... 98,0%

Análise dos peritécios.

Peritécio	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	126	-	-
2	126	-	-
3	108	-	-
4	144	-	-
5	144	-	-
6	180	-	-
7	108	-	-
8	72	-	-
9	180	-	-
10	144	-	-
11	144	-	-
12	108	-	-
13	126	-	-
14	144	-	-
15	108	-	-
16	126	-	-
17	144	-	-
18	180	-	-

QUADRO IX - Linhagem B X Linhagem C

Frequência de peritécios por mm^2 2,3
 Frequência de conídios por $\text{mm}^2 \times 10^{-3}$ 45
 Dispersão..... 7

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem B..... 59,0%
 % de Conídios da linhagem C..... 41,0%

Análise dos peritécios

Peritécio	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	108	+ B	
2	108	+ B	
3	72	+ B	
4	108	+ B	
5	108	+ B	
6	144	+ B	
7	72		+
8	90	+ B	
9	108	+ B	
10	144	+ B	
11	72	+ B	
12	144	+ B	
		$\chi^2 = 8,33 \text{ **}$	

QUADRO X - Linhagem B X Linhagem D

Frequência de peritécios por mm^2 6,6
 Frequência de conídios por $\text{mm}^2 \times 10^{-3}$ 78
 Dispersão..... 10

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem B..... 91,6%
 % de Conídios da linhagem D..... 8,4%

Análise dos peritécios

Peritécio	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	216		+
2	180		+
3	198		+
4	108		+
5	144		+
6	108		+
7	108	+ B	
8	108		+
9	72		+
10	126		+
11	180		+
12	54	+ B	
		$\chi^2 = 5,33 \approx$	

QUADRO XI - Linhagem B X Linhagem E

Frequência de peritécios por mm² 7,3
 Frequência de conídios por mm² x 10⁻³ 63
 Dispersão..... 10

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem B..... 95,2
 % de Conídios da linhagem E..... 4,8

Análise dos peritécios

Peritécio	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	324		+
2	324		+
3	306		+
4	144		+
5	72	+ B	
6	72	+ B	
7	144	+ B	
8	216		+
9	72	+ B	
10	162	+ B	
11	72	+ B	
12	108	+ B	
		$\chi^2 = 0,33 \text{ n.s.}$	

QUADRO XII - Linhagem B X Linhagem F

Frequência de peritécios por mm²..... 5,0
 Frequência de conídios por mm² x 10⁻³..... 46
 Dispersão..... 10

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem B..... 91,2%
 % de Conídios da linhagem F..... 8,8%

Análise dos peritécios

Peritécio Nº	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	180	-	-
2	180	+ B	
3	72	+ B	
4	234	+ F	
5	180	+ B	
6	144	+ B	
7	198	+ B	
8	144	+ B	
9	144	+ B	
10	144	+ B	
11	144	+ B	
12	72	+ B	
		$\chi^2 = 11,00 \text{ ***}$	

QUADRO XIII - Linhagem B X Linhagem G

Frequência de peritécios por mm²..... 2,0
 Frequência de conídios por mm² x 10⁻³..... 17
 Dispersão..... 10

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem B..... 0,0%
 % de Conídios da linhagem G..... 100,0%

Análise dos peritécios

Peritécio Nº	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	90	+ B	
2	108	+ B	
3	108	+ B	
4	72	+ B	
5	162	+ B	
6	180	+ B	
7	108	+ B	
8	144	+ B	
9	108	+ B	
10	90		+
11	180	+ B	
12	72	+ B	
		$\chi^2 = 8,33 \text{ ** }$	

QUADRO XIV - Linhagem C X Linhagem D

Frequência de peritécios por mm^2	2,2
Frequência de conídios por $\text{mm}^2 \times 10^{-3}$	21
Dispersão.....	8

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem C.....	6,7%
% de Conídios da linhagem D.....	93,3%

Análise dos peritécios

Peritécio	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	288		+
2	72	-	-
3	54	-	-
4	72	-	-

QUADRO XV - Linhagem C X Linhagem E

Frequência de peritécios por mm^2	1,5
Frequência de conídios por $\text{mm}^2 \times 10^{-3}$	49
Dispersão.....	7

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem C.....	84,0%
% de Conídios da linhagem E.....	16,0%

Análise dos peritécios

Peritécio Nº	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	288		+
2	252		+
3	216		+
4	216		+
5	180		+
6	90	+ C	
7	144		+
8	144		+
9	234		+
10	162	+ C	
11	198		+
12	162		+

$\chi^2 = 5,33 \#$

QUADRO XVI - Linhagem C X Linhagem F

Frequência de peritécios por mm²..... 2,2
 Frequência de conídios por mm² x 10⁻³..... 78
 Dispersão..... 9

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem C..... 78,6%
 % de Conídios da linhagem F..... 21,4%

Análise dos peritécios

Peritécio N ^o	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	324		+
2	288		+
3	288		+
4	324		+
5	180		+
6	288		+
7	108	-	-
8	180	-	-
9	90	+ F	
10	180	+ F	
11	162	+ F	
12	108	+ F	
13	180		+
14	144		+
15	162	-	-
16	108	-	-

$\chi^2 = 1,33 \text{ n.s.}$

QUADRO XVII - Linhagem C X Linhagem G

Frequência de peritécios por mm^2 0,1
Frequência de conídios por $\text{mm}^2 \times 10^{-3}$ 78
Dispersão..... 2

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem C..... 52,0%
% de Conídios da linhagem G..... 48,0%

Análise dos peritécios

Peritécio	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	360	+ G	
2	216	-	-
3	144	-	-
4	180	-	-

QUADRO XVIII - Linhagem D X Linhagem E

Frequência de peritécios por mm² 2,4
 Frequência de conídios por mm² x 10⁻³ 9
 Dispersão..... 5

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem D..... 63,2%
 % de Conídios da linhagem E..... 36,8%

Análise dos peritécios

Peritécio Nº	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	234		+
2	180		+
3	252		+
4	180		+
5	324		+
6	252		+
7	252		+
8	162		+
9	324		+
10	252		+
11	342		+
12	198		+
		$\chi^2 = 12,0$ ***	

QUADRO XIX - Linhagem D X Linhagem F

Frequência de peritécios por mm²..... 1,1
 Frequência de conídios por mm² x 10⁻³..... 7
 Dispersão..... 8

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem D..... 79,2%
 % de Conídios da linhagem F..... 20,8%

Análise dos peritécios

Peritécio Nº	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	270		+
2	252		+
3	180		+
4	288		+
5	270		+
6	144		+
7	342		+
8	288		+
9	108	-	-
10	90	-	-
11	108	-	-
12	180	-	-
13	270		+
14	180	+ D	
15	180		+
16	288		+

$\chi^2 = 8,33 \text{ **}$

QUADRO XX - Linhagem D X Linhagem G

Frequência de peritécios por mm²..... 1,7
 Frequência de conídios por mm² x 10⁻³..... 22
 Dispersão..... 7

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem D..... 51,7%
 % de Conídios da linhagem G..... 48,3%

Análise dos peritécios

Peritécio Nº	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	216		+
2	342		+
3	144		+
4	252		+
5	216		+
6	216		+
7	108		+
8	216		+
9	216		+
10	144		+
11	216		+
12	252		+

$\chi^2 = 12,0$ ***

QUADRO XXI - Linhagem E X Linhagem F

Frequência de peritécios por mm²..... 0,1
 Frequência de confídios por mm² x 10⁻³..... 36
 Dispersão..... 2

Análise dos peritécios

Peritécio Nº	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	252		+
2	216		+
3	324		+
4	252		+
5	252		+
6	252		+
7	252		+
8	216		+
9	216		+
10	180		+
11	216		+
12	280	+ F	-
		$\chi^2 = 8,33 \text{ ** }$	

QUADRO XXII - Linhagem E X Linhagem G

Frequência de peritécios por mm^2	0,0
Frequência de conídios por $\text{mm}^2 \times 10^{-3}$	48
Dispersão	1

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem E	0,0%
% de Conídios da linhagem G	100,0%

Análise dos peritécios

Peritécio Nº	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	126	-	-
2	108	-	+
3	144	+ G	
4	144	+ G	

QUADRO XXIII - Linhagem F X Linhagem G

Frequência de peritécios por mm²..... 1,8
 Frequência de conídios por mm² x 10⁻³..... 151
 Dispersão..... 10

Teste de heterocário:

% de Conídios da linhagem F..... 55,3%
 % de Conídios da linhagem G..... 44,7%

Análise dos peritécios

Peritécio Nº	Tamanho do peritécio (em micra)	Não-híbrido	Híbrido
1	468	+ G	
2	288	+ G	
3	288	+ G	
4	324	+ G	
5	180	+ G	
6	288	+ G	
7	180	+ G	
8	324	+ G	
9	288	+ G	
10	360	+ G	
11	288	+ G	
12	216	+ G	
		$\chi^2 = 12,0$ ***	

O Quadro XXIV, apresenta uma síntese dos resultados gerais dos cruzamentos com relação ao número de peritécios híbridos e não-híbridos.

QUADRO XXIV - Resultados gerais dos cruzamentos

Linhagem	A			B			C			D			E			F			G		
	NH	H	T	NH	H	T	NH	H	T	NH	H	T	NH	H	T	NH	H	T	NH	H	T
A	Produz Peritécios			9	3	12	8	4	12	9	4	13	12	0	12	3	11	14	0	0	0
B	9	3	12	Produz Peritécios			11	1	12	2	10	12	7	5	12	11	0	11	11	1	12
C	8	4	12	11	1	12	Produz Peritécios			0	1	1	2	10	12	4	8	12	1	0	1
D	9	4	13	2	10	12	0	1	1	Não produz Peritécios			0	12	12	1	11	12	0	12	12
E	12	0	12	7	5	12	2	10	12	0	12	12	Produz Peritécios			1	11	12	2	1	3
F	3	11	14	11	0	11	4	8	12	1	11	12	1	11	12	Produz Peritécios			12	0	12
G	0	0	0	11	1	12	1	0	1	0	12	12	2	1	3	12	0	12	Não produz Peritécios		

Observação:- NH = número de peritécios não-híbridos
 H = número de peritécios híbridos
 T = número total de peritécios

Finalmente, o Quadro XXV apresenta o número e tipos de peritécios não-híbridos e o resultado geral do teste de heterocáριο.

QUADRO XXV - Resultado dos cruzamentos: número e tipos de peritécios não-híbridos e teste de heterocáριο

Cruzamento	Nº e tipo de peritécios não-híbridos	Nº total de peritécios examinados	Teste de heterocáριο (%)
A X B	0 A - 9 B	12	96,3 A - 3,7 B
A X C	3 A - 5 C	12	46,2 A - 53,8 C
A X D	0 A - 9 D	13	77,8 A - 22,2 D
A X E	0 A - 12 E	12	- - -
A X F	0 A - 3 F	14	44,3 A - 55,7 F
A X G	- - -	0	2,0 A - 98,0 G
B X C	11 B - 0 C	12	59,0 B - 41,0 C
B X D	2 B - 0 D	12	91,6 B - 8,4 D
B X E	7 B - 0 E	12	95,2 B - 4,8 E
B X F	10 B - 1 F	11	91,2 B - 8,8 F
B X G	11 B - 0 G	12	0,0 B - 100,0 G
C X D	0 C - 0 D	1	6,7 C - 93,3 D
C X E	2 C - 0 E	12	84,0 C - 16,0 E
C X F	0 C - 4 F	12	78,6 C - 21,1 F
C X G	0 C - 1 G	1	52,0 C - 48,0 G
D X E	0 D - 0 E	12	63,2 D - 36,8 E
D X F	1 D - 0 F	12	79,2 D - 20,8 F
D X G	0 D - 0 G	12	51,7 D - 48,3 G
E X F	0 E - 1 F	12	- - -
E X G	0 E - 2 G	3	0,0 E - 100,0 G
F X G	0 F - 12 G	12	55,3 F - 44,7 G

Observação:- A letra colocada ao lado do número indica a linhagem. Assim, no primeiro cruzamento (A X B), foram encontrados zero peritécios tipo A e 9 peritécios do tipo B.

4.3. Perda de umidade do meio de cultura a 37°C

Com a finalidade de verificar se a perda de umidade do meio de cultura exercia influência na produção de peritécios, placas de Petri foram pesadas no momento da colocação do meio nas mesmas, essas placas foram em seguida colocadas na estufa a 37°C e depois de 10 dias foi efetuada nova pesagem, uma das placas permanecendo vedada com fita celulósica e a outra sem vedação durante esse período de tempo. Os resultados referentes à perda de umidade em placas vedadas e não vedadas encontram-se no Quadro XXVI.

QUADRO XXVI - Perda de umidade do meio de cultura em placas vedadas e não vedadas.

Placa de Petri Nº	Pêso inicial do meio de cultura (em g)	Pêso do meio de cul- tura após 10 dias à 37°C (em g)	Perda de pê- so (em %)
1 (vedada)	36,5	34,5	5,4
2 (não vedada)	37,0	27,0	27,1

5. DISCUSSÃO

5.1. Análise da produção de peritécios pelas linhagens isoladas e em cruzamentos

Muitos autores, quer em estudos genéticos, quer em estudos micológicos, já observaram e destacaram o fato de A. nidulans apresentar uma variação na produção de peritécios.

No presente trabalho êsse fato foi igualmente verificado.

Enquanto duas linhagens (as linhagens D e G) revelaram ser puramente conidiais, as outras cinco (as linhagens A, B, C, E e F) mostraram ser capazes de produzir peritécios, embora em certos casos essa produção tenha sido irregular e incerta, dependendo também do meio de cultura usado como se verifica pela observação dos Quadros I e II. Também pela observação do Quadro I, verifica-se que tôdas as linhagens que produziram peritécios em placas vedadas com fita celulósica, também foram capazes de produzir em placas que não foram vedadas. Apesar de não ter sido feita nenhuma contagem, a produção de peritécios sempre pareceu maior no caso das placas vedadas.

A influência da vedação não está bem esclarecida. Tem sido sugerido que talvez se devesse a uma anaerobiose parcial (AZEVEDO, 1966). Contudo como A. nidulans tem se mostrado sensível a ligeiras modificações do meio (HENRARD, 1934), procuramos verificar se, quanto à perda de umidade, havia diferença considerável entre o meio contido em placas vedadas e o meio contido em placas sem vedação. Os resultados mostraram que, enquanto as placas vedadas, contendo 40 ml de meio completo sólido, perderam apenas 5,4% de umidade, as placas sem vedação perderam 27,1% em 10 dias (Quadro XXVI).

A conclusão a que se chega é que perdendo mais umidade, as placas sem vedação, oferecem, ao fungo, um meio mais concentrado, o que, talvez, influa na produção de peritécios.

Com relação aos 21 cruzamentos envolvendo as sete linhagens usadas, neste trabalho, todos êles apresentaram produção de peritécios. Os resultados são dados nos quadros III a XXIII.

Como se verifica pela observação dêsses quadros, a frequência de peritécios por mm² varia consideravelmente (0,0 a 7,3), bem como a dispersão dos mesmos (1 a 10).

As observações realizadas com as diversas linhagens, parecem mostrar que a produção de peritécio está relacionada com fatores internos

que se distribuem ao acaso. O encontro ou a separação, desses fatores, determinaria a formação ou não de peritécios. O comportamento das linhagens que submetidas às mesmas condições, ora produzem unicamente conídios, ora apresentam formas sexuais, poderia ser explicado por um mecanismo dessa natureza. Tratar-se-ia de fatores citoplasmáticos, complementares, que quando reunidos poderiam determinar a formação de peritécios e cuja separação impediria que essa formação se desse. Como fatores citoplasmáticos essa separação poderia ocorrer com relativa facilidade, e só na medida em que esses fatores pudessem se reunir novamente, através de processo de anastomoses das hifas, é que a produção de peritécios poderia ocorrer.

A participação de fatores extra-nucleares na formação de peritécios de A. nidulans tem sido sugerida por vários autores (MAHONEY e WILKIE, 1958; 1962 e CROFT, 1966).

Mas o comportamento do fungo, apresentando uma produção de peritécio irregular e incerta, cuja irregularidade não parece depender de um fator ambiental, normalmente controlado, porém de fatores internos que se distribuem ao acaso, parece indicar que não se trata de um único fator extra-nuclear, mas de fatores que se complementam. Os dados, entretanto são insuficientes para que se tire qualquer conclusão a esse respeito.

5.2. Sobre o heterotalismo relativo

Pela observação dos Quadros III a XXIII verifica-se que dentre os 21 cruzamentos realizados, 4 deles apresentaram porcentagem de peritécios híbridos maior do que 50%, tomando-se como significativos os resultados que ocorrem com probabilidade menor que 0,01. Outros 3 cruzamentos apresentaram porcentagem de peritécios híbridos maior que 50%, tomando-se como significativos os resultados que ocorrem com probabilidade menor que 0,05. Esses sete cruzamentos foram os seguintes:

Linhagem A	x	Linhagem F
Linhagem B	x	Linhagem D
Linhagem C	x	Linhagem E
Linhagem D	x	Linhagem E
Linhagem D	x	Linhagem F
Linhagem D	x	Linhagem G
Linhagem E	x	Linhagem F

Por outro lado, 5 cruzamentos apresentaram porcentagem de peritécio

cios inferior a 50%, tomando-se os mesmos limites de significância. Esses

cruzamentos foram:

Linhagem A	x	Linhagem E
Linhagem B	x	Linhagem C
Linhagem B	x	Linhagem F
Linhagem B	x	Linhagem G
Linhagem F	x	Linhagem G

Ainda, em 4 cruzamentos, o teste de X^2 não foi possível de ser realizado, seja pela não produção de peritécios com ascósporos viáveis (Linhagem A x Linhagem G) seja pelo número insuficiente de peritécios encontrados e analisados (Linhagem C x Linhagem D; Linhagem C x Linhagem G e Linhagem E x Linhagem G). Excluindo-se esses cruzamentos, temos, num total de 17 cruzamentos, um total de 7 com proporção de peritécios híbridos superior a esperada, ou seja, em 41,1% dos cruzamentos houve tendência para produção de peritécios híbridos. Esse resultado se equivale aos encontrados por HEMMONS, PONTECORVO e BUFTON (1952) e PONTECORVO e col., (1953). Interessante, no entanto, é notar que nos mesmos 17 cruzamentos, 5 deles, ou 29,4% apresentaram tendência a produzir peritécios do tipo não-híbrido, fato esse, ainda não relatado por outros autores.

Nos cruzamentos que apresentaram porcentagem superior a 50% de peritécios híbridos nota-se a presença de linhagens que não produziram peritécios (D e G), e a presença de linhagens que produziram peritécios sem ascósporos viáveis (E e F). As linhagens A, B e C também se acham envolvidas nesses cruzamentos.

Nos cruzamentos que apresentaram porcentagem inferior a 50% de peritécios híbridos nota-se a presença de linhagens que produziram peritécios com ascósporos viáveis (A e B), sem ascósporos viáveis (E e F) e de linhagens que não produziram peritécios (G). Apenas a linhagem D não aparece nesses cruzamentos.

Embora não se possa excluir a hipótese de que o sintrofismo seja um fator que contribua para que um cruzamento apresente menos de 50% de peritécios híbridos, há alguns fatos que parecem contrariar tal ponto-de-vista, pelo menos no que diz respeito as linhagens usadas no presente trabalho.

Primeiramente como se verifica no Quadro II, essas linhagens não revelaram uma capacidade de crescimento normal em meio deficiente. As linhagens F e G não foram capazes de crescer em meio mínimo suplementado com 2% de meio completo sólido. As linhagens B, C e E apresentaram crescimento muito prejudicado nesse meio. A linhagem que melhor cresceu, nesse meio, foi a linhagem D, que não se encontra envolvida nesses cruzamentos, e a única que produziu peritécios, nesse meio, foi a linhagem A.

Seria difícil supor que uma linhagem pudesse suplementar o meio mínimo, com substâncias necessárias ao crescimento de outra, em quantidade maior do que a existente em 2% do meio completo. Aliás a observação feita com a linhagem C revelou que, embora ela fôsse capaz de crescer em meio mínimo onde anteriormente fôra inoculada a linhagem A, êsse crescimento foi muito prejudicado, e pior do que no meio mínimo suplementado com 2% de meio completo.

É interessante observar que nesses cruzamentos que apresentaram uma tendência a uma baixa produção de peritécios híbridos verificou-se o aparecimento de peritécios não-híbridos do tipo das linhagens que produziram peritécios sem ascosporos viáveis, ou que não produziram peritécios.

Em nesses casos, é claro que não se pode considerar o sintrofismo como responsável pelo fenômeno. É possível que se trate de uma tendência do núcleo a uma cariogamia com núcleos da mesma origem, ou simplesmente que se trate de relação quantitativa dos dois tipos de núcleos existentes nos heterocários.

No Quadro XXVII, são dados os totais de peritécios examinados, considerando isoladamente os cruzamentos envolvendo cada uma das linhagens; são dados também os totais de peritécios do tipo das linhagens envolvidas, e os totais de peritécios híbridos, encontrados nesses cruzamentos.

QUADRO XXVII - Totais de peritécios examinados, considerando isoladamente os cruzamentos envolvendo cada uma das linhagens.

Cruzamento com a linhagem	Total de peritécios examinados	Peritécios do tipo da linhagem	Peritécios híbridos
A	63	3	22
B	71	50	20
C	50	7	24
D	62	10	50
E	63	12	39
F	73	9	41
G	40	15	14

Partindo desses valores e se considerassemos uma relação nuclear de 1:1 e que a cariogamia se processasse ao acaso, poderíamos estimar uma

frequência esperada de 1/4 da frequência total, para peritécios não-híbridos de um determinado tipo, e uma frequência esperada de 2/4 da frequência total, para peritécios híbridos, e aplicar o teste de χ^2 .

Nesse caso a aplicação do teste de χ^2 nos daria os resultados indicados no Quadro XXVIII.

QUADRO XXVIII - Frequências esperadas e observadas de peritécios do tipo da linhagem envolvida, de peritécios híbridos e outros tipos.

1º) Para o caso dos peritécios não-híbridos

Linhagem envolvida no cruzamento	Peritécios do tipo da linhagem envolvida		Peritécios de outros tipos		χ^2
	Freq. ob.	Freq. esp.	Freq. ob.	Freq. esp.	
A	3	15,75	60	47,25	13,75 ***
B	50	17,75	21	53,25	78,12 ***
C	7	12,50	43	37,50	3,23
D	10	15,50	52	46,50	2,60
E	12	15,75	51	47,25	1,19
F	9	18,25	64	54,75	6,25 *
G	15	10,00	25	30,00	3,33

2º) Para o caso dos peritécios híbridos

Linhagem envolvida no cruzamento	Peritécios híbridos		Peritécios de outros tipos		χ^2
	Freq. ob.	Freq. esp.	Freq. ob.	Freq. esp.	
A	22	31,50	41	31,50	5,72 *
B	20	35,50	51	35,50	13,54 ***
C	24	25,00	26	25,00	0,08
D	50	31,00	12	31,00	23,28 ***
E	39	31,50	24	31,50	3,56
F	41	36,50	32	36,50	1,10
G	14	20,00	26	20,00	3,60

Com base nos valores indicados no Quadro XXVIII, considerando como limite de significância 1%, poder-se-ia tirar as seguintes conclusões:

A linhagem A revelou-se normal na produção de peritécios híbridos e com tendência a produzir poucos peritécios do tipo A.

A linhagem B revelou-se com tendência a baixa produção de peritécios híbridos e com tendência a produzir maior quantidade de peritécios do tipo B.

A linhagem D revelou-se normal na produção de peritécios do tipo D e com tendência a produzir peritécios híbridos em maior quantidade.

O comportamento das outras linhagens foi compatível com o que seria de se esperar se não houvesse tendência de maior produção de peritécios híbridos ou não-híbridos.

Considerando o teste de heterocário (Quadros III a XXIII e XXV), pode-se verificar que nos cruzamentos que apresentaram percentagem de peritécios híbridos superior a 50%, a relação nuclear foi de aproximadamente 1:1 nos cruzamentos A x F, D x E e D x G. Já nos cruzamentos C x D, C x E e D x F houve uma predominância de um ou de outro núcleo.

Quanto aos cruzamentos que apresentaram percentagem inferior a 50% de peritécios híbridos, B x C e F x G mostraram relação nuclear de cerca de 1:1, mas no cruzamento B x F, houve uma predominância do núcleo B e no cruzamento B x G houve uma predominância do núcleo G. Nesse último caso, contudo, os peritécios, não-híbridos foram todos do tipo B. Já no cruzamento F x G, apesar da relação nuclear ser de 1:1, os peritécios não-híbridos foram todos do tipo G.

A relação entre o aparecimento dos diversos tipos de peritécios e a quantidade de núcleos de uma linhagem ou de outra, existente em um heterocário, merece um estudo mais detalhado. No presente trabalho os dados são insuficientes para análise desse problema, tudo parecendo indicar no entanto, que a relação nuclear no heterocário não é responsável pelo aparecimento maior de peritécios do tipo híbrido ou não-híbrido. Também não se pode concluir que uma marca nutricional seja responsável pelo fenômeno, a semelhança do que BAINBRIDGE (1964) relatou com relação ao mutante arginina.

5.3. Relação entre o tamanho do peritécio e hibridação

Os resultados obtidos quanto a relação entre o tamanho do peritécio e sua condição de híbrido ou não-híbrido, estão apresentados nos Qua-

dros III a XXIII. Para facilitar a discussão, podemos resumir os dados, distribuindo os peritécios híbridos e não-híbridos, de acôrdo com seu tamanho em micra (Quadro XXIX).

QUADRO XXIX - Tamanho dos peritécios e condição híbrida ou não-híbrida dos mesmos.

Tamanho do peritécio em micra	Nº de peritécios não-híbridos	Nº de peritécios híbridos	Nº Total de peritécios
54	1	0	1
72	15	2	17
90	5	1	6
108	18	6	24
126	1	3	4
144	22	10	32
162	6	3	9
180	16	12	28
198	2	4	6
216	4	19	23
234	1	2	3
252	1	17	18
270	0	3	3
288	8	8	16
306	0	1	1
324	2	10	12
342	0	3	3
360	2	1	3
468	2	0	2

Essa distribuição apresentada no Quadro XXIX, decorre do critério usado na aproximação dos dados obtidos nas medições dos peritécios. A medição foi feita com o micrômetro, valendo uma unidade 36 micra. Os valores menores do que uma unidade do micrômetro foram aproximados para mais ou menos. Contudo, valores iguais a 1/2 unidade do micrômetro foram registrados sem que se fizesse aproximação. Daí a conveniência de agrupar esses dados em classes, com intervalo de uma unidade do micrômetro, ou seja, com intervalo de classe de 36 micra. (Quadro XXX).

QUADRO XXX - Grupamento dos peritécios em classes

Classes (em micra)	Nº de peritécios não-híbridos	Nº de peritécios híbridos	Nº total de peritécios
40-75	16	2	18
76-111	23	7	30
112-147	23	13	36
148-183	22	15	37
184-219	6	23	29
220-255	2	19	21
256-291	8	11	19
292-327	2	11	13
328-363	2	4	6
364-399	0	0	0
400-435	0	0	0
436-471	2	0	2

Partindo-se da hipótese de que essas classes se comportam igualmente quanto ao número de peritécios híbridos e não-híbridos, pode-se calcular as frequências esperadas e aplicar o teste χ^2 como mostra o quadro XXXI.

QUADRO XXXI - Frequências observadas e esperadas de peritécios híbridos e não-híbridos.

Tamanho do peritécio em micra	Nº de peritécios não-híbridos	Nº de peritécios híbridos	Nº total de peritécios
40-75	16 (9,04)	2 (8,96)	18
76-111	23 (15,07)	7 (14,93)	30
112-147	23 (18,08)	13 (17,92)	36
148-183	22 (18,58)	15 (18,42)	37
184-219	6 (14,56)	23 (14,44)	29
220-255	2 (10,54)	19 (10,46)	21
256-291	8 (9,54)	11 (9,46)	19
292-327	2 (6,53)	11 (6,47)	13
328-471	4 (4,01)	4 (3,99)	8
	106	105	211

$$\chi^2 (G.L=8) = 54,04$$

De onde se conclue que há diferença significativa no número de peritécios híbridos dessas classes.

Considerando essas classes e as percentagens de peritécios híbridos de cada uma delas, o cálculo do Coeficiente de Correlação de Spearman nos daria o valor indicado no Quadro XXXII.

QUADRO XXXII - Cálculo do Coeficiente de Correlação entre tamanho dos peritécios e condição híbrida ou não-híbrida dos mesmos

		d	d ²
1	1	0	0
2	2	0	0
3	3	0	0
4	4	0	0
5	7	-2	4
6	9	-3	9
7	6	1	1
8	8	0	0
9	5	4	16
		$\sum d=0$	$\sum d^2=30$

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d^2}{n(n^2 - 1)} = 1 - \frac{6 \times 30}{9(81-1)}$$

$$r_s = 0,750^{**}$$

Os dados levam, portanto, à conclusão de que há, realmente, pelo menos, nos cruzamentos estudados, no presente trabalho, uma correlação entre o tamanho do peritécio e sua condição de híbrido ou não-híbrido, ou seja, peritécios de maior tamanho tem tendência a serem do tipo híbrido e vice-versa. Tal fato pode ser de valor em estudos genéticos com o A.nidulans uma vez que na análise de cruzamentos há interêsse unicamente no isolamento de peritécios híbridos, uma vez que peritécios não híbridos não se prestam para uma análise meiótica e mapeamento de genes.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve por objetivo principal verificar se, no fungo filamentoso Aspergillus nidulans (Eidam) Winter, havia ou não, uma correlação entre o tamanho do peritécio e sua condição de híbrido ou não-híbrido. Mas procurou-se, também, tirar algumas conclusões sôbre heterotalismo relativo e sôbre a formação de peritécio.

Para isso, sete linhagens de A. nidulans foram analisadas com relação a produção de peritécios.

Pôde-se concluir que duas linhagens produziram peritécios com ascospores viáveis, duas produziram peritécios que não apresentaram ascospores viáveis, uma produziu peritécios somente em tubos de ensaio após 2 meses de incubação e duas não produziram peritécios. Verificou-se, também, que as linhagens que produziram peritécios apresentaram, em certos casos, uma produção irregular e incerta.

Essas linhagens foram cruzadas entre si, em tôdas as combinações possíveis (21 cruzamentos). De cada um desses cruzamentos de quatro a dezoito peritécios foram isolados, medidos e, em seguida, analisados, com vista a verificar se eram híbridos ou não. Grupando êsses peritécios, em classes, de acôrdo com o seu tamanho, os resultados obtidos foram os seguintes:

Tamanho do peritécio em micra	Nº de peritécios não-híbridos	Nº de peritécios híbridos	Nº total de peritécios
40-75	16	2	18
76-111	23	7	30
112-147	23	13	36
148-183	22	15	37
184-219	6	23	29
220-255	2	19	21
256-291	8	11	19
292-327	2	11	13
328-471	4	4	8
	106	105	211

Em 246 peritécios analisados foram encontrados 106 peritécios não-híbridos, 105 peritécios híbridos e 35 peritécios que não produziram ascospores viáveis.

A análise estatística revelou a existência de uma correlação entre o tamanho do peritécio e sua condição de híbrido e não-híbrido.

Quanto ao heterotalismo relativo foram encontrados sete cruzamentos em que a percentagem de peritécios híbridos foi superior a 50%, tomando como limite de significância os resultados que ocorrem com probabilidade menor do que 0,05 (41,1%) e também cinco cruzamentos com percentagem de peritécios não-híbridos superior a 50% (29,4).

Quanto à formação de peritécios, em face da irregularidade com que essa formação se verifica, é sugerido que a mesma talvez esteja na dependência de fatores citoplasmáticos complementares, que poderiam se dispersar quando do desenvolvimento do micélio, impedindo a formação de peritécios, ou tornariam a se reunir, pelo processo de anastomoses das hifas, dando lugar à formação de peritécios.

7. SUMMARY

Strains of Aspergillus nidulans were used in an attempt to study the correlation between size and hybrid state or selfed state of the perithecia.

Seven strains of A. nidulans were crossed in all possible combinations (21 crosses). From each cross, a number of 4 to 18 perithecia were isolated, measured and analysed, giving a total number of 246 analysed perithecia. From these perithecia, 106 shown to be selfed, 105 shown to be hybrid and 35 produced no viable ascospores.

Grouping the perithecia in classes, according to its size, statistical analysis revealed a positive correlation between size and hybrid or selfed state of the perithecia, hybrid perithecia being, in general, bigger in size than selfed perithecia.

Relative heterothallism and perithecial production were discussed.

8. RESUMETO

Linioj de Aspergillus nidulans estas uzitaj en esplorado por studi la korelativon inter la dimensio de la periteciumoj kaj ĝia hibrida stato.

Sep linioj de A. nidulans estas krucitaj en ĉia ebla kombinaĵo (21 kruciĝoj) kaj ĉies kruciĝo, de 4 ĝis 18 periteciumoj estas analizitaj. 106 ne estis hibridaj, 105 estis hibridaj, kaj 35 produktis askosporojn kiuj ne ĝermis.

La periteciumoj estas grupigitaj en klasoj laŭ ĝia dimensio kaj la statistika analizo montris ke ekzistas korelativo inter la dimensio de la periteciumo kaj ĝia hibrida stato.

La relativa heterotalismo kaj la formado de periteciumoj estas ankau diskutitaj.

9. BIBLIOGRAFIA CITADA

- ARLETT, C.F. - 1960 - A System of Cytoplasmic Variation in Aspergillus nidulans - Heredity 15: 377-388.
- AZEVEDO, J.L. de - 1966 - Estudos Sôbre Recessivos Letais em Aspergillus nidulans (Eidam) Winter - Tese de Livre Docência apresentada a ESALQ, Piracicaba - Sao Paulo - 121 pg.
- BAINBRIDGE, B.W. - 1964 - The Arginine Crossing Technique - Aspergillus News Letter, 6: 8.
- BARATT, R.W., G.B. JOHNSON & W.N. OGATA - 1965 - Wild type and mutant stocks of Aspergillus nidulans - Genetics, 52: 233-246.
- CARR, A.J.H. & L.S. OLIVE - 1959 - Genetics of Sordaria fimicola. Am. J. Bot. 46: 81-80.
- CROFT, J.H. - 1966 - Control of Perithecial Production - Aspergillus News Letter, 7: 7.
- HEMMONS, L.M., G. PONTECORVO & A.W.S. BUFTON - 1953 - Perithecium analysis in Aspergillus nidulans - Heredity 6: 135.
- HENRARD, P. - 1934 - Polarité, Héredité et Variation, chez Diverses Espèces d'Aspergillus - Cellule 43: 351-424.
- JINKS, J.L. - 1954 - Somatic Selection in Fungi. Nature Lond., 174, 409-410.
- KAFER, ETTA - 1965 - Origins of Translocation in Aspergillus nidulans - Genetics 52: 217-232.
- MAHONEY, M. & D. WILKIE - 1958 - An Instance of Cytoplasmic Inheritance in Aspergillus nidulans - Proc. Roy. Soc. B., 148: 359-361.
- MAHONEY, M. & D. WILKIE - 1962 - Nucleo - cytoplasmic Control of Perithecial Formation in Aspergillus nidulans. Proc. Roy. Soc. B., 154: 524-532.
- OLIVE, L.S. - 1954 - Heterothallic Behavior in the Aspergillaceae. Mycologia 46: 254-255.
- OLIVE, L.S. - 1958 - On the Evolution of Heterothallism in Fungi - Am. Natur., 92: 233-251.
- PONTECORVO, G. - 1949 - Auxanographic Technique in Biochemical Genetics - J. gen. Microbiol., 3: 122-126.
- PONTECORVO, G., E. FORBES & O.B. ADAM - 1949 - Genetics of Homothallic Ascomicete Aspergillus nidulans. Heredity 3: 385.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.N. HEMMONS, K.D. MACDONALD & A.W.J. BUFTON - 1953 - The Genetics of Aspergillus nidulans. Advances in Genet. 3: 142-238.
- SCHWARTZ, W. - 1928 - Entwicklungsphysiologische Untersuchungen über die Gattungen Aspergillus und Penicillium. I-Aspergillus - Arten. Flora Jena, 23: 386-440.
- SMITH, G. - 1957 - An Introduction to Industrial Mycology - Arnold. London. 399 pg.
- SNEDECOR, G.W. - 1956 - Statistical Methods - The Iowa State College Press, Ames, Iowa. 534 pg.
- YUILL, E. - 1950 - The Number of Nuclei in Conidia of Aspergillus - Trans. Brit., Mycol. Soc., 33: 324-331.