

MARILENA MÜLLER COSTAL DANTAS D'ARCE
ENGENHEIRO-AGRÔNOMO

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE ABERRAÇÕES
CROMOSSÔMICAS NUMÉRICAS EM
ASPERGILLUS NIDULANS.

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
"Magister Scientiae"

PIRACICABA - SÃO PAULO
1972

ÍNDICE GERAL

	<u>Página</u>
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	3
Ciclos biológicos do <u>A. nidulans</u>	3
Aspectos citológicos e aberrações cromossômicas estruturais e numéricas em fungos	6
Letais balanceados	10
MATERIAL E MÉTODOS	12
Linhagens	12
Meios de cultura e soluções usadas	14
Obtenção de aneuplóides	18
Técnicas de análise genética	19
Irradiação com luz ultra-violeta	21
RESULTADOS	23
Cálculo da frequência de aparecimento espontâneo a partir de linhagens haplóides, normal e com duplicação cromossômica	23
Obtenção de aneuplóides a partir de linhagens diplóides, com o uso de p-fluorfenilalanina	23
Dissômicos selecionados para os próximos passos	24
Análise genética dos dissômicos	25
Irradiação de linhagens haplóides, diplóides e dissômicas com luz ultra-violeta	26
DISCUSSÃO	38
Frequência do aparecimento espontâneo de aneuplóides a partir de linhagens haplóides, normal e com duplicação cromossômica	38

	<u>Página</u>
Obtenção de aneuplóides a partir de linhagens diplóides, por meio de p-fluorfenilalanina e análise genética dos dissômicos obtidos	39
Irradiação com luz ultra-violeta de linhagens dissômicas, haplóides e diplóides	40
Estabilização de linhagens dissômicas	44
RESUMO	46
SUMMARY	47
BIBLIOGRAFIA CITADA	48

INTRODUÇÃO

O fungo filamentosso Aspergillus nidulans (Eidam) Winter, além de ser um organismo bem estudado sob diversos aspectos apresenta uma série de vantagens para pesquisas genéticas; estas vantagens já foram assinaladas no clássico trabalho de PONTECORVO, ROPER, HEMMONS, MACDONALD e BUFTON, (1953) e se resumem nos seguintes itens: apresenta uma fase vegetativa haplóide, com formação de conídios uninucleados que permitem a obtenção de colônias isoladas, geneticamente puras; através do ciclo sexual, por cariogamia e meiose, dá origem a ascósporos também haplóides que permitem a análise meiótica; apresenta um ciclo parassexual com formação de conídios diplóides, que por haploidização através de aneuploidia (KÄFER, 1961) dão formação a setores haplóides com segregação cromossômica, o que permite a realização de uma análise mitótica.

O A. nidulans possui um número haplóide de $n = 8$ cromossomos. Estes cromossomos, de difícil observação citológica (ELLIOTT, 1960) ainda não foram correlacionados aos 8 grupos de ligação do fungo. Pode-se pensar em diversas maneiras de correlacionar grupos de ligação e cromossomos em A. nidulans. Talvez através do uso de dissômicos ($n + 1$ cromossomos) essa correlação possa ser feita. Dissômicos já foram obtidos para sete dos oito cromossomos do fungo (POLLARD, KÄFER e JOHNSTON, 1968) e cada um deles apresenta morfologia típica (UPSHALL, 1971), sendo todos bastante instáveis, produzindo setores normais devidos à perda do cromossomo em excesso.

A finalidade do presente trabalho foi : primeiramente, a obtenção de aneuplóides a partir de uma linhagem normal e de uma linhagem que apresenta duplicação cromossômica, para um estudo da frequên-

cia de aneuplóides. Um estudo do aparecimento de aneuplóides nas duas linhagens indicará sua frequência espontânea e se há diferença significativa nessa frequência, entre linhagens com aberrações cromossômicas e linhagens isentas dessas aberrações, como foi sugerido por POLLARD e col. (1968) e constatado por AZEVEDO e ROPER (1970) em certas linhagens.

Em segundo lugar tentar verificar a possibilidade de, através de irradiação com luz ultra-violeta e obtenção de curvas de sobrevivência de vários dissômicos, conhecer os tamanhos relativos dos vários cromossomos envolvidos e assim, correlacionar os mesmos com os grupos de ligação.

Por último, verificar se há possibilidade de aumentar a estabilidade de aneuplóides, através de um sistema de letais balanceados, como foi feito para estabilização de diplóides no mesmo fungo, por AZEVEDO e ROPER (1967) e AZEVEDO (1970).

REVISÃO DA LITERATURA

Na revisão da literatura, podemos considerar separadamente tres pontos que interessam diretamente ao presente trabalho: a) os ciclos biológicos do A. nidulans; b) os aspectos citológicos do A. nidulans e as aberrações cromossômicas estruturais e numéricas; c) os letais balanceados.

Ciclos biológicos do A. nidulans

Sobre estes ciclos, faremos um breve resumo, baseado no trabalho de PONTECORVO e col. (1953).

O ciclo sexual ocorre concomitantemente com o ciclo vegetativo do fungo. Um conídio (haplóide) por germinação, dá origem a um micélio constituído por células multinucleadas. Algumas dessas células (células podais) se diferenciam e dela emergem conidióforos que terminam por uma vesícula globosa, multinucleada. Dessa vesícula desenvolvem-se os esterigmas primários, cada um originando dois ou mais esterigmas secundários, que por sua vez não dar uma cadeia de conídios uninucleados. Tanto os esterigmas primários como os secundários são também uninucleados. Todos os conídios de uma mesma cadeia, tendo derivado do esterigma uninucleado, apresentam portanto o mesmo tipo de núcleo. Sempre os conídios mais jovens estão na base das cadeias e nas linhagens selvagens os conídios apresentam coloração verde.

Uma importante ocorrência do ciclo vegetativo é a anastomose de hifas. Ocorre frequentemente entre ramificações de uma mesma hifa, entre hifas do mesmo micélio e entre hifas de dois micélios diferentes, que podem ser da mesma linhagem ou de linhagens diferentes. Co

mo uma consequência de anastomose entre hifas de linhagens geneticamente diferentes, podem ser incluídas na mesma célula, duas ou mais diferentes espécies de núcleos, os quais dão origem, então, a um micélio heterocariótico.

O ciclo sexual ocorre em órgãos especializados, os corpos de frutificação : cleistotécios ou peritécios. Estes são redondos, de coloração escura e contêm cerca de 10^5 ascos no seu interior. No interior de cada asco estão os ascoporos em número de oito. Os ascosporos são binucleados e apresentam coloração pardo avermelhada. Surgem por um processo cariogâmico, com a formação do zigoto que sofre imediatamente divisão meiótica produzindo quatro células haplóides. Cada uma dessas células por sua vez sofre uma divisão mitótica resultando portanto em cada asco, oito células ou ascosporos.

Quanto à denominação dada aos corpos de frutificação produzidos pelo *A. nidulans*, existe certa divergência. Segundo a maioria dos autores eles são cleistotécios, porém na maior parte dos trabalhos publicados por geneticistas é usada a denominação peritécio, de tal modo que este termo tornou-se clássico nos trabalhos que tratam da genética do fungo. Esta é a razão porque usamos neste trabalho o termo peritécio ao nos referirmos aos corpos de frutificação do *A. nidulans*.

ROPER (1952) observou coexistindo com o ciclo sexual, um outro que foi denominado por PONTECORVO (1956) de ciclo parassexual. Este, abrange três etapas : aparecimento de diplóides em linhagens normalmente haplóides, recombinação durante a mitose e haploidização.

O ciclo parassexual inicia-se com a formação de heterocáριο, seguindo-se fusão normal de núcleos haplóides dentro das hifas, originando-se assim núcleos diplóides e conseqüentemente linhagens diplóides. Estes diplóides quando isolados mostram-se bastante estáveis, porém produzem recombinantes através de recombinação mitótica.

Um dos processos de recombinação mitótica é a permuta cromossômica somática ("crossing-over" somático) reconhecida por PONTECORVO, TARR-GLOOR e FORBES (1954). A permuta somática ou mitótica ocorre no estágio de 4 fios e é exatamente recíproca (ROPER e PRITCHARD, 1955). Ela geralmente fica confinada a apenas um braço cromossômico e faz com que todos os genes em associação e distais em relação ao ponto de permuta, fiquem homozigotos. Genes proximais ao ponto de permuta, no outro braço do mesmo cromossomo, permanecem heterozigotos (PONTECORVO e KÄFER, 1958).

Outro processo de recombinação é a não-disjunção mitótica, da qual resulta um núcleo homozigoto para um ou mais pares de cromossomos homólogos, porém heterozigotos para os outros pares (PONTECORVO e KÄFER, 1958).

Um terceiro processo causando recombinação é a haploidização espontânea de diplóides, através de aneuploidia com sucessivas perdas de cromossomos, até que o estado haplóide estável seja atingido. KÄFER (1960; 1961), fez um estudo detalhado da origem e comportamento dos segregantes, principalmente aneuplóides, surgidos espontaneamente e por indução. Sua mais relevante descoberta foi a alta frequência com que núcleos aneuplóides são formados em linhagens diplóides. Pela análise de sua formação, conseguiu prover uma explicação do mecanismo de haploidização: núcleos hiperhaplóides, provavelmente surgindo por uma perda inicial de um ou uns poucos cromossomos na metáfase mitótica, ou por um atraso dos mesmos durante a anáfase, são suplantados por produtos de posterior não-disjunção, haplóides mais viáveis. O processo deve ocorrer em mais de dois passos, embora isto ainda não esteja evidenciado.

Pouco se conhece acerca da ocorrência de diploidia do A. nidulans na natureza e também sobre a real contribuição evolucionária

desse potencialmente eficiente tipo de recombinação parassexual (PONTECORVO, 1956). Também, embora alguma segregação mitótica tenha sido encontrada numa série de organismos, a questão de sua ocorrência geral em fungos e em tecidos de organismos superiores ainda está aberta.

O processo de segregação mitótica causada por permuta cromossômica em A. nidulans parece ser análogo ao descrito por STERN (1936), ocorrendo em Drosophila.

Aspectos citológicos e aberrações cromossômicas estruturais e numéricas em fungos.

Quanto a citologia e aberrações cromossômicas estruturais e numéricas em fungos, faremos uma revisão referente apenas ao A. nidulans. Para maiores detalhes sobre outros aspectos da citologia e dessas aberrações em fungos em geral, ver a recente revisão de FINCHAM e DAY (1971).

Quanto à citologia, ELLIOTT(1960) estudou o comportamento do núcleo em ascos de linhagens diplóides, comparando-o com o de linhagens haplóides. Observou que o número haplóide de cromossomos no A. nidulans é oito. Estes diferem em comprimento, tendo o autor considerado sua análise na paquitene, possível em diplóides, porém em haplóides, os cromossomos se apresentam sempre aglomerados. Na diacinese e metáfase I, são vistos oito bivalentes: três grandes (sendo um deles com um satélite), dois de tamanho médio, dois pequenos e um muito pequeno.

Culturas de ascósporos isolados por micromanipulação de peritécios de diplóides eram todas haplóides. Nos diplóides, a meiose parece ocorrer normalmente até a metáfase I, mas estágios posteriores típicos, bem como ascos com esporos são raramente observados.

As aberrações numéricas em A. nidulans já eram conhecidas

e foram bem estudadas, como vimos anteriormente (KÄFER, 1960; 1961).

KÄFER (1962) descreveu o uso de métodos genéticos para detecção e análise de translocações, usando-os no caso de uma translocação envolvendo os grupos de ligação I e VII. Nesse trabalho, esquematizou métodos para determinação de complementos cromossômicos normais em linhagens de *A. nidulans* que mostram alta frequência de translocações e deu ênfase à importância dos rearranjos cromossômicos em microrganismos.

BAINBRIDGE e ROPER (1966) partindo de alguns cruzamentos de pais morfologicamente normais, obtiveram na prole, dois terços normais e um terço com seu crescimento retardado e apresentando uma morfologia típica que denominaram "crinkled". Vinte e cinco por cento dos ascósporos eram inviáveis. Estudando, para cada um desses cruzamentos, o "pedigree" dos pais, observaram que enquanto um era cromossomicamente normal o outro apresentava uma translocação, aparentemente não recíproca, de um segmento do grupo de ligação III, ao grupo de ligação VIII. Supuseram então que aos ascósporos inviáveis, faltaria o segmento do grupo de ligação III e as colônias "crinkled" o teriam em duplicata. Essas colônias ao se desenvolverem, apresentaram setores que em grau variável, apresentaram morfologia e razão de crescimento próximos ao tipo selvagem. De um cruzamento envolvendo o marcador *sl2* (requerimento para tiosulfato) localizado no grupo de ligação III, obtiveram colônias "crinkled" tiosulfato-independentes, das quais, algumas produziram setores dos 2 tipos: com e sem requerimento para tiosulfato. Este tipo de instabilidade vegetativa confirmou a hipótese da duplicação do segmento.

NGA e ROPER (1968) usaram outra linhagem, também "crinkled" e de crescimento lento, porém em menor grau que a do grupo de ligação III. Esta outra linhagem, apresentava um segmento do grupo

de ligação I, terminalmente adicionado ao grupo de ligação II, tendo no segmento duplicado, três marcadores conhecidos: dois para requerimentos nutricionais e um para coloração amarela dos confídios. Neste e em mais dois trabalhos subsequentes (NGA e ROPER, 1969; ROPER e NGA, 1969) trabalhando com o mesmo tipo de material, chegaram a várias conclusões: linhagens de *A. nidulans* com um segmento cromossômico em excesso ao complemento haplóide, são instáveis na mitose; denominaram esta instabilidade, de "não-conformidade mitótica"; linhagens com duplicação, as quais apresentam a morfologia "crinkled" característica e baixa razão de crescimento, produzem setores mostrando vários graus de melhoria fenotípica, os quais surgem de núcleos que por um processo intracromossômico tenham perdido parte variável do segmento duplicado. Por uma só deleção ou por várias deleções independentes, o genoma pode aproximar-se da constituição do genoma haplóide, alcançando então estabilidade. Propuseram como explicação que ocorreria uma troca desigual entre cromátídeos irmãos ou uma permuta ("~~crossing-over~~") dentro de uma alça cromossômica. Embora um exame citológico profundo, não seja possível (ELLIOTT, 1960), as análises genéticas, mostraram ser correta a hipótese de deleção, pela qual, setores aparecem por perda de uma parte variável de algum segmento duplicado.

POLLARD e col. (1960) estudaram a frequência de aneuplóides do tipo $n + 1$, a qual presume-se refletir a não-disjunção meiótica, em cruzamentos de linhagens normais e de linhagens com aberrações cromossômicas.

Em cruzamentos entre linhagens estruturalmente homocigotas, são produzidos aneuplóides viáveis com frequência extremamente baixa, indicando ser a incidência de não-disjunção meiótica muito rara. Em cruzamentos heterocigotos para aberrações cromossômicas, por outro lado, é observada uma considerável frequência de tipos aneuplóides ou

semelhantes.

A hipótese é que, como observado em organismos superiores (STURTEVANT, 1926; DOBZHANSKY, 1930; DOBZHANSKY e STURTEVANT, 1931; BEADLE, 1932; GLASS, 1933; etc.) e o fato de translocações terem sido encontradas no "pedigree" de muitas linhagens de A. nidulans (KÄFER, 1962; 1965), os pares de cromossomos estruturalmente não idênticos apresentam maior frequência de não-disjunção meiótica.

Comparando as frequências dos vários segregantes aneuplóides, mitóticos e meióticos, POLLARD e col. (1968) observaram que a situação parece não ser análoga, supondo que: ou o processo de segregação cromossômica que dá origem aos aneuplóides meióticos não é o mesmo que dá origem aos mitóticos, ou na meiose, aberrações têm efeitos específicos no processo, possivelmente interagindo com recombinação, o que não ocorre na mitose.

AZEVEDO e ROPER (1970) estudaram as mudanças genéticas responsáveis pela instabilidade diferente apresentada por linhagens com duplicação e analisaram algumas de suas consequências. Em uma, deterioração e aumento da instabilidade foram determinadas por mutação em um segmento duplicado; um derivado menos instável não mais apresentou essa mutação, porém outra, em outro grupo de ligação. Ainda outra variante, instável demais para análise, deu derivados que apresentaram novas mutações em diferentes grupos de ligação. Foi proposto então, que deterioração e aumento da instabilidade resultavam de duplicações em "tandem" em um dos segmentos já duplicados; a transposição dessas regiões, reduziria a instabilidade.

Colônias hiperhaplóides e hiperdiplóides de A. nidulans, dissômicas ou trissômicas para um ou mais cromossomos respectivamente, são anormais fenotipicamente e instáveis somaticamente, já havia sido demonstrado por POLLARD e col. (1968) para as linhagens de Glasgow,

que dependendo de qual cromossomo fosse adicional, os fenótipos resultantes seriam especificamente diferentes entre si. UPSHALL (1971) demonstrou que essa afirmativa de especificidade fenotípica é válida também para linhagens de outras procedências e de diferentes bases genéticas.

Letais balanceados

O primeiro trabalho com A. nidulans, com referência a recessivos letais, foi o de KÄFER e CHEN (1964) que irradiaram uma linhagem diplóide, com luz ultra-violeta e analisaram o genótipo de 19 diplóides sobreviventes. Nestes, encontraram além de algumas translocações, letais recessivos. Quase simultaneamente, MACDONALD (1964) apresentou um processo para conservação de diplóides, através de balanceamento por deficientes morfológicos. Quando um diplóide heterozigoto apresenta maior segregação do tipo paternal que do tipo recombinante, um modo de mantê-lo é usando linhagens paternas e haplóides de crescimento deficiente (deficientes morfológicos). Assim, a seleção vai operar contra a maioria dos segregantes que apareçam.

AZEVEDO (1966) observou que a luz ultra-violeta induz recessivos letais e estudou sob este aspecto duas linhagens diplóides de A. nidulans. As colônias isoladas que apresentaram anormalidades após irradiação, permitiram, na maioria dos casos, uma localização dos letais. A frequência total de recessivos letais é cerca de 56 vezes maior que a de mutantes deficientes nutricionais, induzidos pelo mesmo mutagênico.

AZEVEDO e ROPER (1967) estimaram, em duas linhagens diplóides de A. nidulans, a frequência de mutações recessivas letais, espontâneas e induzidas por ultra-violeta. Nenhum letal foi detectado a-

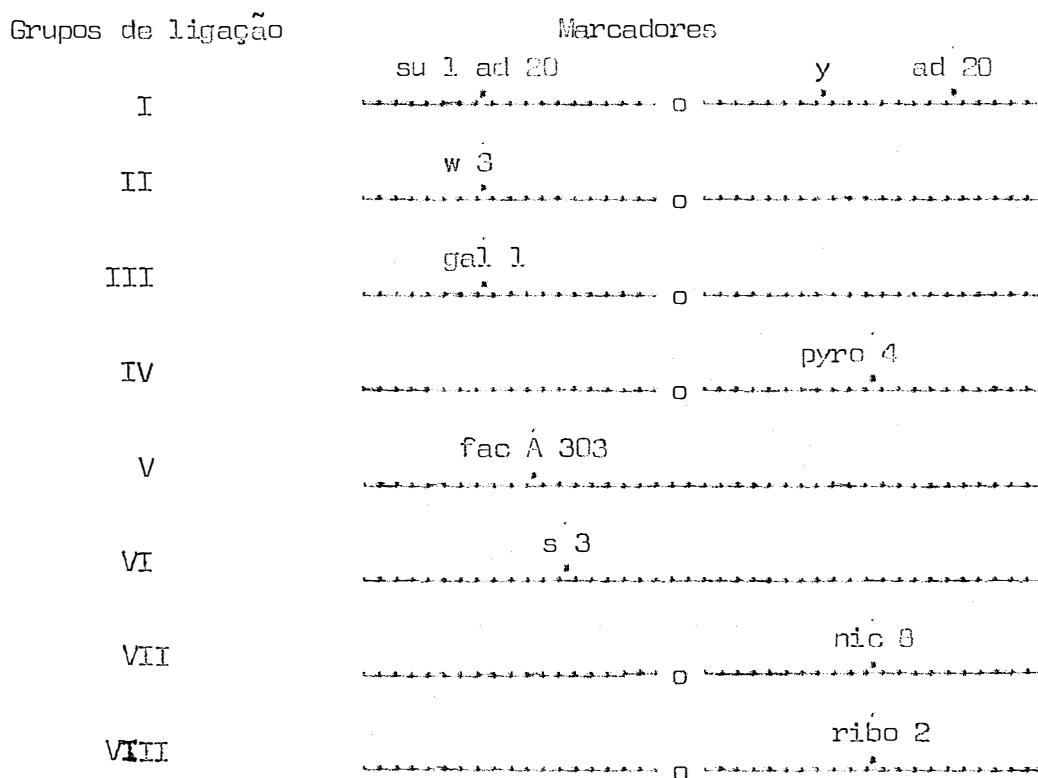
parecendo espontaneamente. Com tratamento, as duas linhagens apresentaram 20% de letais. Muitos deles foram localizados através de permuta mitótica. Análise meiótica revelou que um heterocáριο estável estava balanceado por dois letais não alélicos, um em cada componente haplóide. Outra colônia isolada apresentou um sistema letal balanceado, resultante de letais não alélicos ligados em trans. Seis outros eram diplóides estáveis. Em trabalho subsequente, AZEVEDO (1970), estimou as frequências espontânea e induzida por ácido nitroso, de mutações recessivas letais em uma linhagem diplóide de A. nidulans, observando 0% de letais induzidos. Uma colônia isolada era heterozigota para dois letais não alélicos em posição trans. Após tratamento com luz ultravioleta, ela produziu um heterocáριο estável, balanceado pelos dois letais, cada um em um dos componentes haplóides. Análises mitótica e meiótica mostraram que o tratamento com ultravioleta havia causado uma translocação de um segmento do cromossomo III, carregando um segundo letal, para o cromossomo V.

MATERIAL E MÉTODOS

LINHAGENS

As linhagens utilizadas são todas originárias dos estoques da Universidade de Glasgow, Escócia.

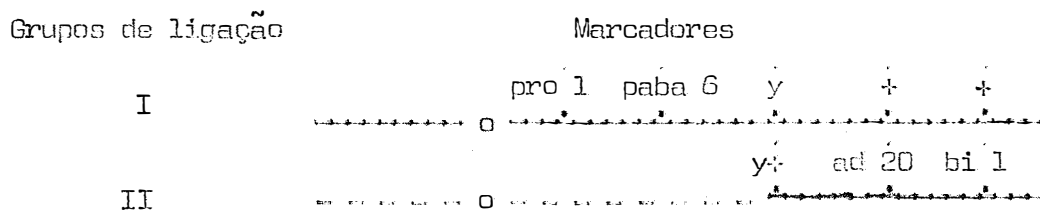
a) Linhagem MSE (master strain E) contendo marcadores em todos os oito grupos de ligação do *A. nidulans* (MC GULLY e FORBES, 1965) como se observa na figura 1.



Os centrômeros estão designados por o. As posições não estão em escala.

FIGURA 1 ·· A constituição genética da linhagem MSE.

b) Linhagem A : derivada de uma linhagem com duplicação, isolada através de semeadura seletiva de confídios de um haplóide aparentemente normal, ad 20 bi 1, em meio mínimo suplementado com biotina (NGA e ROOPER, 1968). A constituição genética de linhagem A, encontra-se esquematizada na figura 2.



A linha contínua representa o grupo de ligação I e a pontilhada o II. Os centromeros estão designados por o. As posições não estão em escala.

FIGURA 2 - A constituição genética da linhagem A.

c) Linhagem 4: variante deteriorada ($V_{8,1}$), derivada da linhagem A. Dissômico para o cromossomo III (AZEVEDO, 1971 e ROSATO, não publicado).

d) Linhagem $bi_1 meth_1$, haplóide.

e) Linhagem $bi//MSE$, diplóide.

f) Linhagem $A//MSE$, diplóide.

MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES USADASMeio Mínimo (MM)

Preparado de acordo com PONTECORVO e col., 1953.

Nitrato de sódio	6 g
Fosfato dihidrogenado de potássio	1,52 g
Cloreto de potássio	0,52 g
Sulfato de magnésio (7 H ₂ O)	0,52 g
Sulfato de ferro	traços
Sulfato de zinco	traços
Glicose	10 g
Ágar (Oxoid nº 3)	15 g
Água	1 litro
pH ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio	

Meio completo (MC)

Foi preparado também de acordo com PONTECORVO e col. (1953), adicionando-se ao meio mínimo:

Peptona (Oxoid)	2 g
Caseína hidrolizada (Oxoid)	1,5 g
Extrato de leveduras	0,5 g
Ácido nucleico de leveduras hidrolisado	2,5 ml
Solução de vitaminas	1,0 ml
pH ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio	

Ácido nucleico hidrolisado

ácido nucleico de leveduras (Oxoid)	2 g em 15 ml de solução N de HCl
Ácido nucleico de leveduras	2 g em 15 ml de solução N de NaOH

Ambas as soluções foram aquecidas a 100° C por 20 minutos, misturadas e o pH ajustado para 6,0. Filtrou-se em seguida e o volume foi completado para 40 ml. A preparação é conservada a 4° C sob cloroformio.

Solução de vitaminas

Esta solução contém por 100 ml. de água destilada, as seguintes vitaminas:

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

A solução foi esterilizada em banho-maria e guardada a 4° C, em frasco escuro.

Meio de acetato de amônio (APIRION, 1962)

Acetato de amônio	12 g
Fosfato dihidrogenado de potássio	3 g
Cloreto de sódio	2 g
Sulfato de magnésio (7 H ₂ O)	0,5 g

Sulfato de ferro	traços
Sulfato de zinco	traços
Água	1 litro
pH ajustado para 6,1	

Meio mínimo de galactose

Preparado da mesma forma que o meio mínimo comum, apenas substituindo-se a glucose por igual quantidade de galactose, como fonte de carbono.

Solução salina

Uma solução de cloreto de sódio 0,85% foi obtida dissolvendo-se o sal em água destilada. A solução foi colocada em frascos, (9 ml por frasco) e autoclavada.

Solução de tween

Tween 80 foi adicionado à água destilada em uma concentração de 0,1% (v/v). A solução foi colocada em tubos, (2,5 ml por tubo) que foram autoclavados e a seguir conservados a 4°C.

Suplementos adicionados ao MM quando da análise de requerimentos nutricionais

De acordo com o requerido nos experimentos os seguintes suplementos foram adicionados, por litro de meio:

Biotina	0,02 mg
Ácido nicotínico	0,05 mg
Piridoxina	0,05 mg
Riboflavina	0,05 mg
Ácido p-aminobenzoico	0,7 mg
Metionina	50,0 mg
Prolina	50,0 mg
Adenina	70,0 mg
Tiosulfato de sódio	200,0 mg

As soluções concentradas de cada suplemento foram mantidas separadamente, a 4°C, e adicionadas ao MM imediatamente antes do uso.

Meio mínimo líquido com 2% de meio completo

Ao MM, sem adição de ágar, adicionou-se 2% de MC. A mistura foi distribuída em tubos (2,5 ml em cada) e a seguir os tubos com a mistura foram autoclavados. Após resfriamento foram conservados em refrigerador.

Placas de análise

Para análise genética foram utilizadas placas de Petri com MC, MM ou MM suplementado com um ou vários requerimentos nutricionais. Para determinação dos requerimentos nutricionais das colônias analisadas, utilizaram-se placas com MM suplementado com todos os requerimentos envolvidos no cruzamento, exceto o que estava sob análise.

Semeadura e incubação

A densidade de conídios colocados em suspensão em solução de Tween, para desagregá-los, foi estimada através de um hemocitômetro. As diluições foram feitas, quando requeridas, pipetando-se volumes conhecidos da suspensão em 9 ml de solução salina. 0,1 ml da suspensão final foi semeada em placas com o meio de cultura apropriado.

A incubação foi feita durante todo o experimento, em estufas a 37°C.

OBTENÇÃO DE ANEUPLÓIDES

Método 1 - Cálculo da frequência do aparecimento espontâneo de aneuplóides a partir de linhagens haplóides, normal e com duplicação cromossômica.

Tanto utilizando a linhagem MSE (normal) como a linhagem A (com duplicação) o método foi o mesmo. Conídios foram colocados em suspensão, em solução de tween, separados, contados e semeados aproximadamente 40 por placa contendo MC. Após 72 horas de incubação foram contadas as colônias e isoladas as que apresentaram crescimento ou morfologia anormais. Estas foram observadas por mais 72 horas, durante sua incubação, antes de serem separadas ou não como supostos aneuplóides. Foram feitas repetições em várias etapas, até cerca de 200 placas por linhagem.

Método 2 - Uso de p-fluorfenilalanina (pFA) na obtenção de aneuplóides a partir de linhagens diplóides.

Foram utilizadas as linhagens diplóides A//MSE e bi/MSE.

Separadamente, essas linhagens foram semeadas em placas com MC ao qual se adicionou p-FA na proporção de 30 mcg por ml de meio. Subculturas foram tomadas de setores diferentes, visíveis em cada colônia e purificadas em MC, obtendo-se colônias a partir de um único conídio (técnica de retirada de microcolônias com 8-12 horas de incubação). Após tal purificação, a ploidia foi determinada medindo-se o diâmetro dos conídios ao microscópio. Os haplóides foram então classificados para requerimentos nutricionais da maneira usual (descrita nas "Técnicas de análise genética").

TÉCNICAS DE ANÁLISE GENÉTICA

Obtenção de heterocários

O método usado no presente trabalho é o mesmo descrito por PONTECORVO e col. (1953). Cerca de 10^6 conídios de cada uma de duas linhagens requerendo diferentes fatores de crescimento são colocados em 2,5 ml de MM líquido suplementado com 2% de MC líquido. Após 72 horas de incubação forma-se uma película na superfície do meio, a qual é transferida para placa com MM sólido, subdividida em geral em quatro partes e incubada por mais 72 horas. Na maioria dos casos, pode-se observar então, desenvolvimento de heterocário.

Nos casos de cruzamento envolvendo linhagens muito instáveis esta técnica foi levemente modificada, a fim de reduzir o número de mitoses necessárias antes da formação de peritécios e se tornar possível o isolamento de conídios diplóides. Em placas com MM sólido, foram recortados e retirados quatro pequenos cilindros, deixando em seu lugar quatro pequenos poços. Estes, foram preenchidos com MM líquido suplementado com 2% de MC líquido. As duas linhagens foram então inoculadas nesses poços.

Análise meiótica

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

Peritécios maduros foram obtidos de heterocários depois de 10 dias de incubação em placas de Petri com MM, as quais foram primeiramente vedadas com fita celulósica. Este procedimento favorece a formação de peritécios, provavelmente devido à anaerobiose parcial causada.

Em placas de ágar a 3%, com auxílio de um fio de platina, os Peritécios foram rolados na sua superfície, afim de libertá-los dos conídios e das células de Hülle aderentes aos mesmos. Cada peritécio isolado foi transferido para tubo com solução salina e aí esmagado para liberação dos ascósporos, que ficaram então em suspensão na solução salina. Aliquotas de cada suspensão de ascósporos foram semeadas em placas com MC. As suspensões remanescentes foram conservadas à 4°C. As placas foram incubadas por 48 horas, após o que foi possível verificar se os peritécios eram híbridos ou não, pois os híbridos devem apresentar segregação de ascósporos em proporções esperadas. Segregações de alelos em proporções diferentes da esperada, foi interpretada como devida a peritécio gêmeo e tais suspensões foram descartadas, utilizando-se para análise apenas ascósporos provenientes de peritécios híbridos.

Colônias isoladas, obtidas da germinação dos ascósporos, foram transferidas para placas mestras com MC, sendo feitas vinte e seis inoculações por placa, numa distribuição 5 x 5 + 1. Após 4 dias

de incubação estas placas mestras estavam prontas para replicação nas placas de análise. As placas de análise foram preparadas com MM suplementado com as substâncias requeridas pelas linhagens paternas, menos um dos requerimentos em cada placa. Dessa forma foi usada uma placa de análise para cada requerimento nutricional envolvido em cada cruzamento, além de mais duas, para controle, também em cada cruzamento. Essas placas para controle continham: uma, todos os requerimentos envolvidos no cruzamento e outra, nenhum. Classificação para incapacidade de crescimento em meio com galactose ou acetato de amônio como fontes de carbono, foi feita utilizando-se os dois meios apropriados, anteriormente já descritos.

Para transferência das colônias das placas mestras para as de análise usou-se um replicador com vinte e seis agulhas de platina, de comprimento uniforme e com a mesma distribuição utilizada nas placas mestras (5 x 5 + 1).

IRRADIAÇÃO COM LUZ ULTRA-VIOLETA

Curvas de Sobrevivência

A fonte de luz ultra-violeta foi uma lâmpada "Mineralight" modelo R 51, da "Ultra-violet Prod. Inc.", USA, com filtro para 2.537 Å colocada à 20 centímetros da suspensão de conídios. Conídios das várias linhagens tiveram separadamente o mesmo tratamento. Primeiramente colocados em solução de tween, foi estimada sua concentração através de hemocitômetro ao microscópio, para dar um valor aproximado de 4×10^6 conídios/ml da suspensão, que foi diluída em um frasco de solução salina, na proporção de 1:10 e colocada em placa de Petri esterilizada. Desta suspensão foram tiradas antes do início da irradiação (tempo zero), alíquotas de 0,1 ml em várias diluições consecutivas e semea

das com repetições em placas com MC.

Após irradiação de um minuto (tempo 1), o mesmo processo foi repetido, acontecendo o mesmo para os tempos : dois minutos (tempo 2), quatro minutos (tempo 4) e oito minutos (tempo 8). Procedeu-se a contagem das colônias após 48 horas de incubação e considerando-se as diluições feitas, estimou-se a porcentagem de sobrevivência relativa à suspensão não irradiada.

Estabilização com luz ultra-violeta

Conídios da linhagem 4 foram colocados em solução salina e irradiados com luz ultra-violeta durante 4 minutos, após o que foram semeados em meio completo. Microcolônias foram retiradas após 12 horas e purificadas em placas com MC. Paralelamente repetiu-se o mesmo com conídios não irradiados, para confronto. As colônias resultantes dos conídios irradiados e não irradiados foram medidas depois de 10 dias de incubação e a média dos diâmetros da parte estável da mesma foi tirada.

A dosagem de 4 minutos de irradiação foi resultante de uma curva de sobrevivência previamente feita para a linhagem 4, afim de que se conhecesse a dosagem máxima de ultra-violeta, capaz de dar a maior taxa de mutação, ainda dentro dos limites de sobrevivência do fungo.

RESULTADOS

Cálculo da frequência de aparecimento espontâneo de aneuplóides a partir de linhagens haplóides, normal e com duplicação cromossômica.

Usando a linhagem MSE, haplóide e sem aberração cromossômica, foram feitas sementeiras consecutivas em cerca de 200 placas, tendo sido obtidas 5.331 colônias, todas normais, sem que se observasse nenhuma outra de crescimento ou morfologia anormais.

Com a linhagem A, também haplóide, porém com um segmento do cromossomo I duplicado e ligado a uma extremidade do cromossomo II, o mesmo foi feito. Obteve-se 7771 colônias normais e 16 variantes instáveis, supostas aneuplóides. Desses supostos aneuplóides, foram medidos conídios ao microscópio, considerando-se cada cadeia de 5 conídios com comprimento inferior a 15,5 micras, haplóides e maiores, aneuplóides. Procedeu-se então a uma análise de requerimentos nutricionais para cada um dos aneuplóides, após o que foram estocados em tubos de ensaios com MC, à 4°C.

A frequência do aparecimento dos 16 aneuplóides, representa no total de 7787 colônias, 0,205% de aneuplóides.

Obtenção de aneuplóides a partir de linhagens diplóides, com o uso de p-fluorfenilalanina.

Foram utilizadas as linhagens diplóides A//MSE e bi//MSE. Para isso, conídios dessas linhagens foram semeados em placas contendo MC com p-FA. Os setores anormais, purificados através do processo de microcolônias, foram submetidos também à determinação de ploidia e con

siderados aneuplóides do tipo $n + x$ os que se apresentavam na faixa de 15,5 a 20 micras. Acima de 20 micras, foram considerados diplóides ou aneuplóides do tipo $2n + x$. Como no método anterior, procedeu-se a sua análise de requerimentos nutricionais e foram estocados.

Obteve-se através desse processo, mais 38 prováveis aneuplóides, dos quais apenas 11 foram considerados do tipo $n + x$.

Dissômicos selecionados para os próximos passos

Com base na sua morfologia típica (UPSHALL, 1971) foram selecionados os dissômicos que constam do Quadro I:

QUADRO I - Características dos dissômicos selecionados

Dissômico	morfologia	origem	grupo de ligação	genótipo
1	branco, pequeno, enrugado.	A//MSE	I	$\underline{y}_1; \underline{w}_3; \underline{pyro}_4; \underline{fac A 303}; \underline{s}_3; \underline{nic}_8$
3	avermelhado com gotículas na parte central, relativamente grande.	A//MSE	II	$\underline{y}_1; \underline{w}_3; \underline{pyro}_4; \underline{fac A 303}; \underline{s}_3; \underline{ribo}_2$
* 4	marron, pequeno, muito enrugado.	A	III	$\underline{pro}_1; \underline{paba}_6$
6	marron claro, grande, estrelado.	\underline{bi} //MSE	VI	\underline{bi}_1
9	marron claro, médio	A//MSE	IV	$\underline{y}_1; \underline{w}_3; \underline{pyro}_4; \underline{s}_3; \underline{ribo}_2$

* Linhagem cedida por Y.B. Rosato.

Análise genética dos dissômicos

Embora morfologicamente os dissômicos escolhidos fossem já relacionados com os diferentes grupos de ligação, foi realizada uma análise genética a fim de se comprovar ou não a dissomia dos diferentes isolados. Para tal, os diferentes dissômicos com excessão do 4 que já havia sido analisado por AZEVEDO (1971), foram cruzados com linhagens haplóides normais. Esses cruzamentos encontram-se no quadro II:

QUADRO II -- Cruzamentos efetuados entre dissômicos e linhagens haplóides.

Dissômico		Linhagens haplóide
1	x	$\underline{bi_1}; \underline{meth_1}$
3	x	$\underline{bi_1}; \underline{meth_1}$
6	x	MSE
9	x	$\underline{bi_1}; \underline{meth_1}$

Vários peritécios híbridos foram obtidos de cada cruzamento, porém, como demonstrado por outros autores (BALL e ROPER, 1966), a frequência de peritécios que carregam o dissômico é mínima, devido ao fato de que esses peritécios sofrem seleção contrária. Dessa maneira, não obtivemos dissômicos segregando na análise meiótica. Um caso típico, que foi o cruzamento $1 \times \underline{bi_1}; \underline{meth_1}$, onde não houve segregação de dissômicos na meiose, é mostrado no quadro III.

QUADRO III -- Resultado da análise meiótica de colônias obtidas de peritécios híbridos ($1 \times \underline{bi}_1; \underline{meth}_1$).

	F, obs	F, esp	χ^2	G.L.	Significância*
brancos	107		5,4	2	n.s.
verdes	40	1:2:1			
amarelos	36				
bi +	30	1:1	1,2	1	n.s.
bi -	22				
ac +	21	1:1	1,9	1	n.s.
ac -	31				
pyro +	20	1:1	2,7	1	n.s.
pyro -	32				
nic +	25	1:1	0,07	1	n.s.
nic -	27				

* ao nível de 5%

Irradiação de linhagens haplóides, diplóide e dissômicas com luz ultravioleta.

a) Curvas de sobrevivência

Foram irradiadas, além dos dissômicos 1, 3, 4, 6, e 9, para efeito de controle, as linhagens: MSE, haplóide branca; $\underline{bi}_1; \underline{meth}_1$ haplóide verde e $\underline{bi}/\text{MSE}$, diplóide. Os resultados encontram-se nos quadros IV a XI e Figuras 3 a 8.

QUADRO IV -- Linhagem MSE : número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes à irradiação.

Tempo (minutos)	conídios viáveis/ml		porcentagem relativa de sobreviventes		
	1ª repetição	2ª repetição	1ª repetição	2ª repetição	média
0	$8,4 \times 10^5$	$9,6 \times 10^5$	100,0	100,0	100,0
1	$5,2 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	61,9	42,7	52,3
2	$2,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	28,6	14,6	21,6
4	$4,3 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$	5,1	2,7	3,9
8	$3,3 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	0,4	0,19	0,29

QUADRO V -- Linhagem bi₁; meth₁ : número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes à irradiação.

Tempo (minutos)	conídios variáveis/ml		porcentagem relativa de sobrevivência		
	1ª repetição	2ª repetição	1ª repetição	2ª repetição	média
0	$1,2 \times 10^5$	$6,7 \times 10^5$	100,0	100,0	100,0
1	$0,7 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	58,3	50,7	54,5
2	$2,2 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$	18,3	35,8	27,0
4	$1,06 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$	0,8	4,6	6,7
8	$0,6 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$	0,5	0,4	0,45

QUADRO VI -- Linhagem *pi*//MSE : número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes à irradiação.

Tempo (minutos)	conídios viáveis/ml		porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1ª repetição	2ª repetição	1ª repetição	2ª repetição	
0	$6,6 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	100,0	100,0	100,0
1	$5,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	75,7	65,8	70,7
2	$2,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	34,8	26,8	30,8
4	$7,0 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	10,6	7,8	9,2
8	$6,7 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$	1,01	0,88	0,94

QUADRO VII -- Dissômico : número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes à irradiação.

Tempo (minutos)	conídios viáveis/ml		porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1ª repetição	2ª repetição	1ª repetição	2ª repetição	
0	$4,6 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	100,0	100,0	100,0
1	$1,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	36,9	42,8	39,8
2	$1,0 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$	21,7	11,0	16,36
4	$8,3 \times 10^3$	$4,7 \times 10^3$	1,8	1,7	1,75
8	0	0

QUADRO VIII -- Dissômico 3 : número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes à irradiação.

Tempo (minutos)	conídios viáveis/ml		porcentagem relativa de sobreviventes		média
	1ª repetição	2ª repetição	1ª repetição	2ª repetição	
0	$7,6 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5$	100,0	100,0	100,0
1	$4,3 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	56,6	52,8	54,7
2	$2,2 \times 10^5$	$1,06 \times 10^5$	28,9	20,0	24,4
4	$2,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	2,6	2,0	2,3
8	$2,3 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	0,4	0,3	0,35

QUADRO IX -- Dissômico 4 : número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes à irradiação.

Tempo (minutos)	conídios viáveis/ml		porcentagem relativa de sobreviventes		média
	1ª repetição	2ª repetição	1ª repetição	2ª repetição	
0	$6,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	100,0	100,0	100,0
1	$3,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	55,0	40,7	47,8
2	$1,7 \times 10^5$	$0,57 \times 10^5$	28,3	21,1	24,7
4	$6,5 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	10,8	6,6	8,7
8	$4,4 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	0,73	0,9	0,81

QUADRO X - Dissômico 6 - número e porcentagem relativa de conídios, sobreviventes à irradiação.

Tempo (minutos)	conídios viáveis/ml		porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1ª repetição	2ª repetição	1ª repetição	2ª repetição	
0	$1,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	100,0	100,0	100,0
1	$8,3 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	69,2	50,0	59,6
2	$3,8 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	31,7	22,0	26,8
4	$4,4 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	3,7	1,8	2,7
8	$3,6 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	0,3	0,2	0,25

QUADRO XI - Dissômico 9 - número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes à irradiação.

Tempo (minutos)	conídios/ml		porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1ª repetição	2ª repetição	1ª repetição	2ª repetição	
0	$3,5 \times 10^5$	$6,7 \times 10^4$	100,0	100,0	100,0
1	$3,0 \times 10^5$	$6,5 \times 10^4$	85,7	97,0	91,3
2	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	42,8	22,4	32,6
4	$2,2 \times 10^4$	$3,2 \times 10^3$	6,3	4,8	5,5
8	$1,2 \times 10^3$	$4,3 \times 10^2$	0,34	0,64	0,48

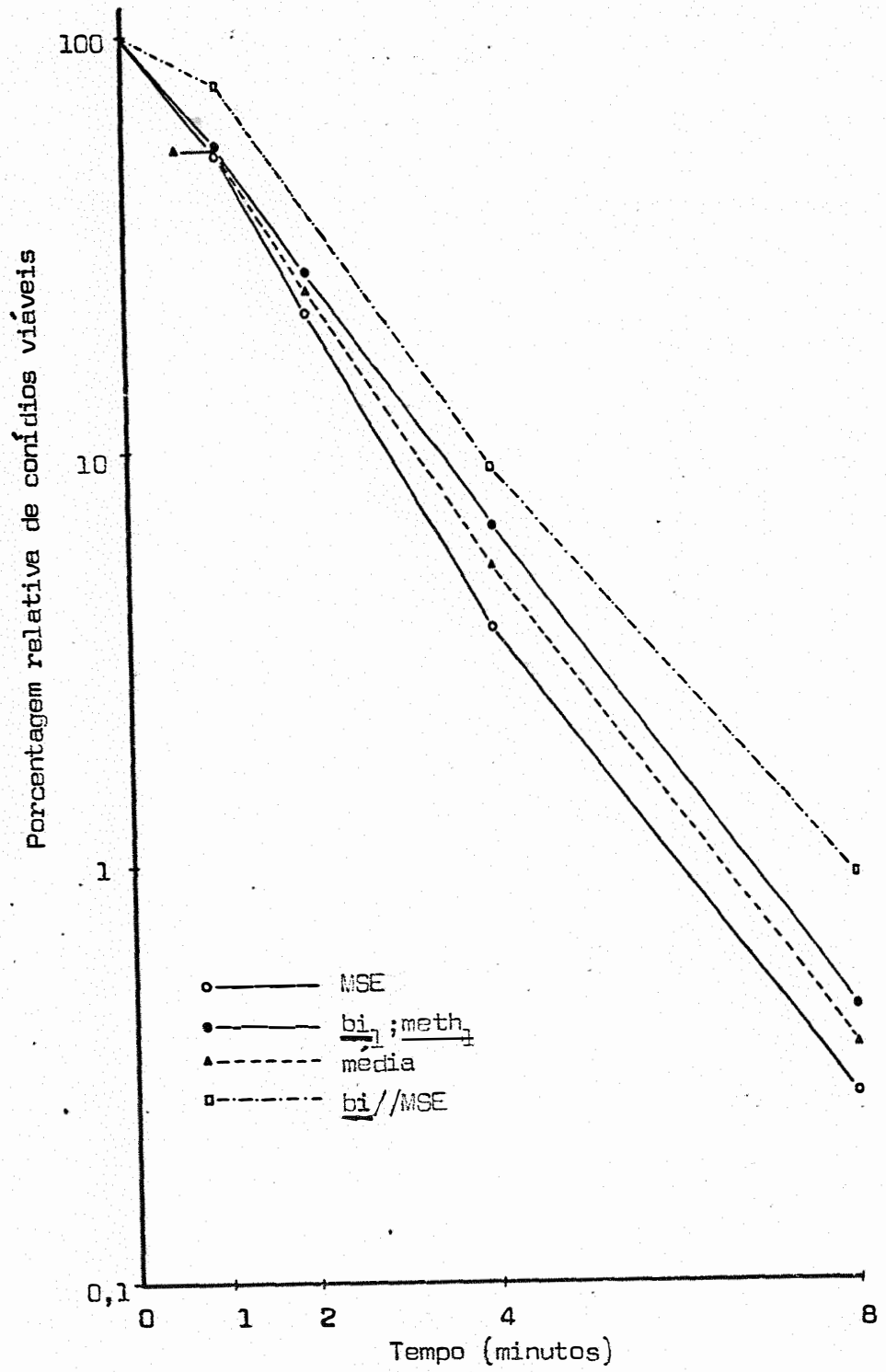


FIGURA 3 - Curvas de sobrevivência à luz ultra-violeta: linhagens MSE, $\underline{bi}_1; \underline{meth}_1$ (haplóides), $\underline{bi} // \underline{MSE}$ (diplóide e média das linhagens haplóides).

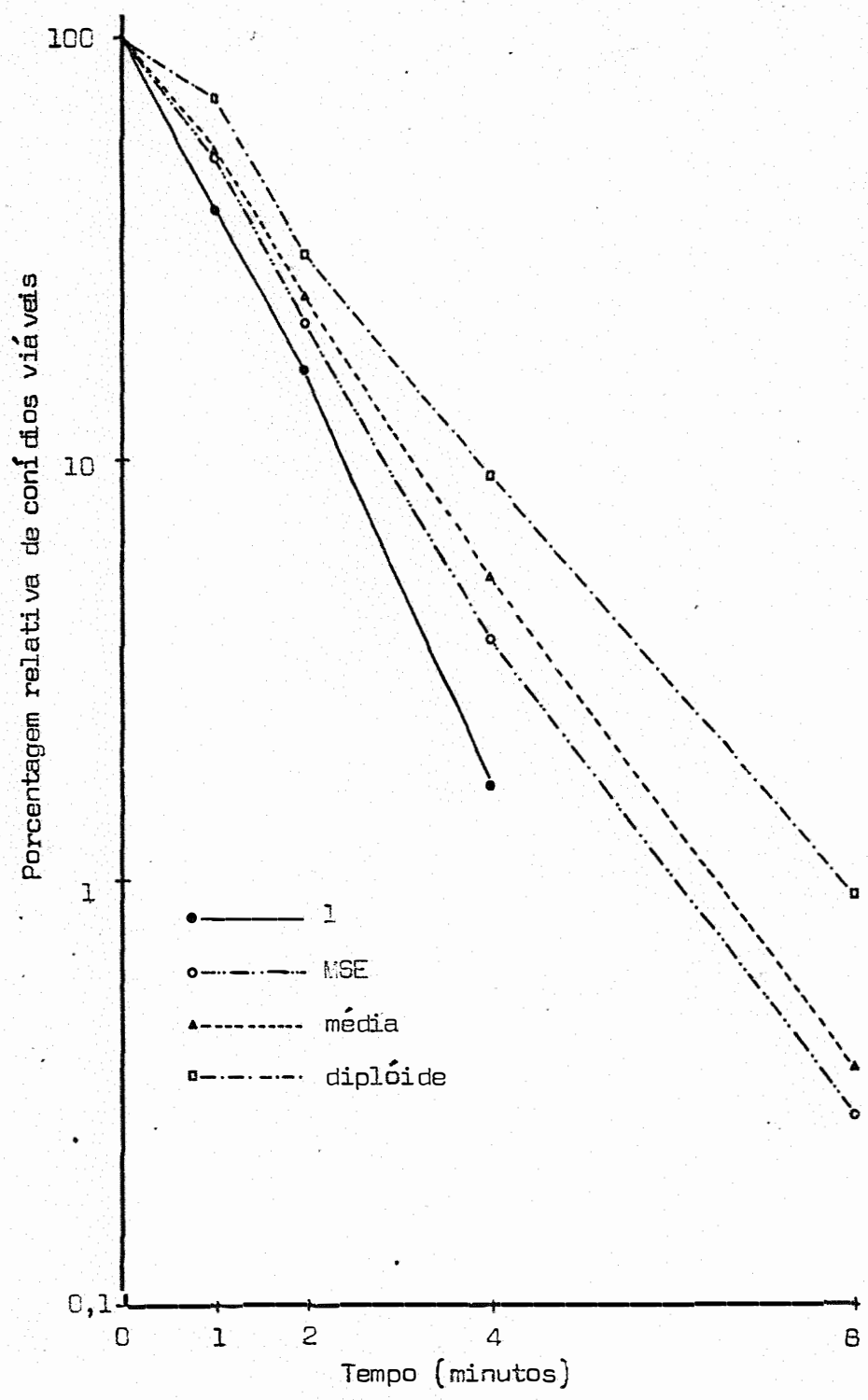


FIGURA 4 - Curvas de sobrevivência à luz ultra-violeta: linhagem 1 (disômica) comparada com linhagens haplóide, diplóide e média - das haplóides.

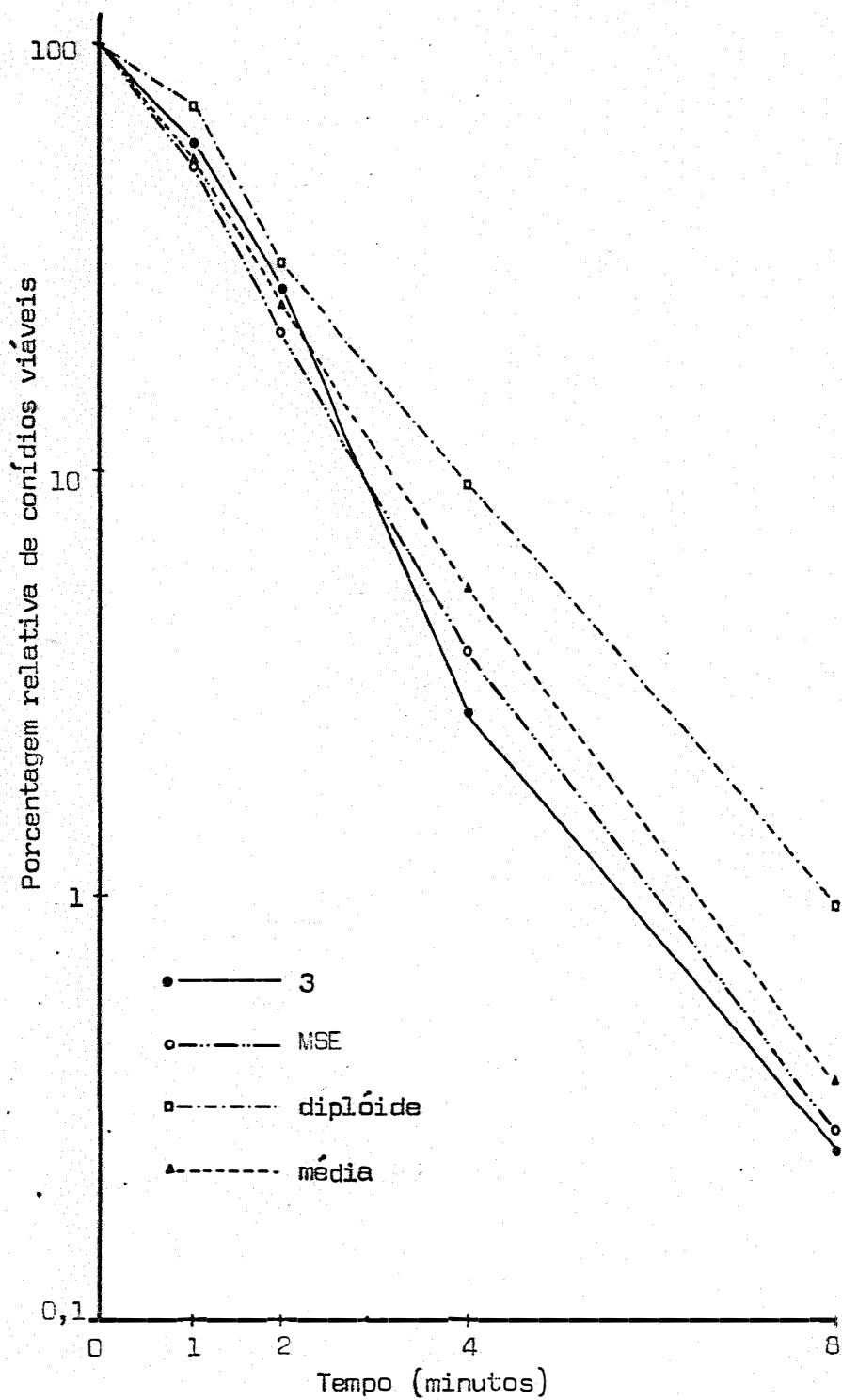


FIGURA 5 - Curvas de sobrevivência à luz ultra-violeta: linhagem 3 - (dissômica) comparada com linhagens haplóide, diplóide e média das haplóides.

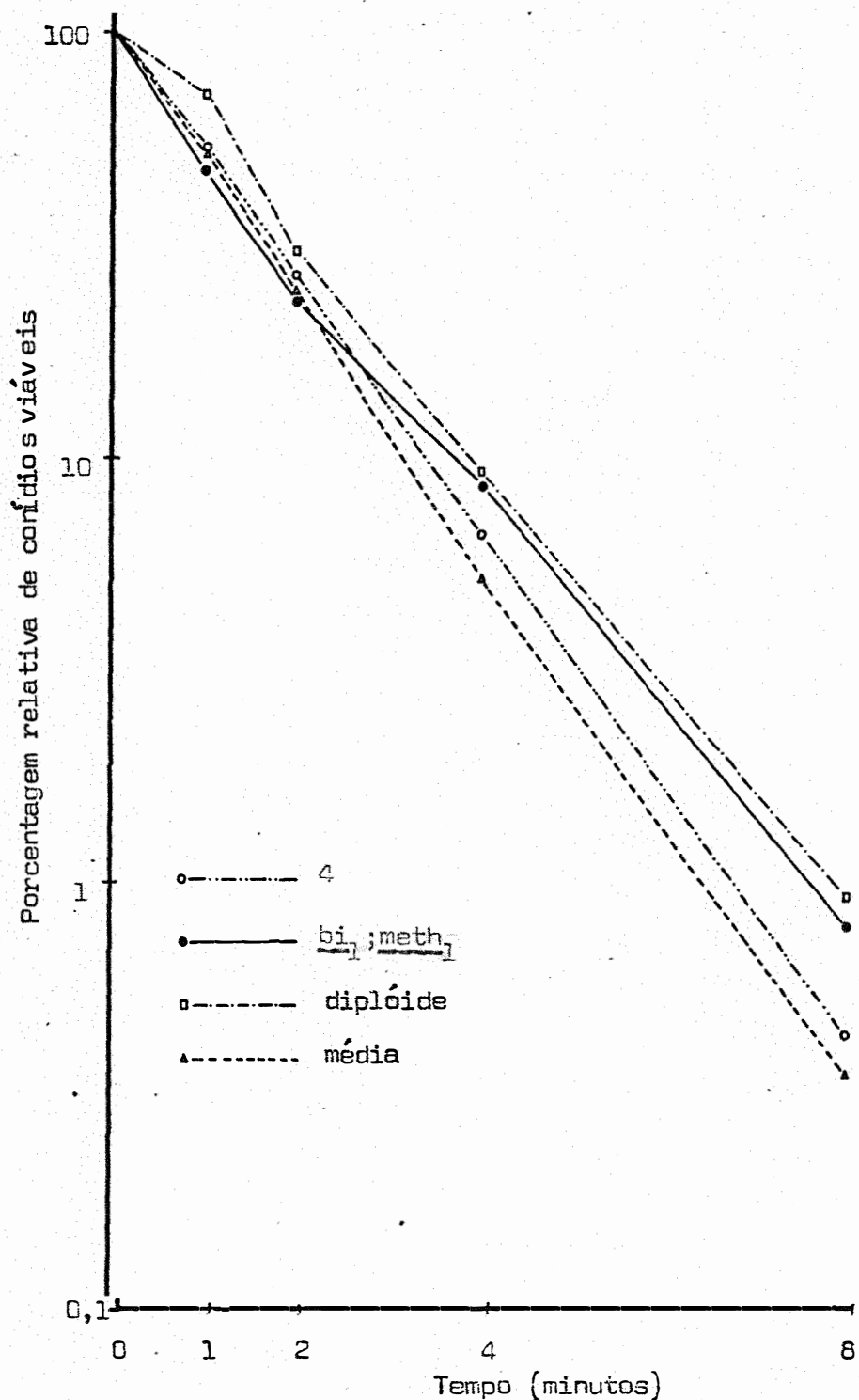


FIGURA 6 - Curvas de sobrevivência à luz ultra-violeta: linhagem 4 (dissômica) comparada com linhagens haplóide, diplóide e média das haplóides.

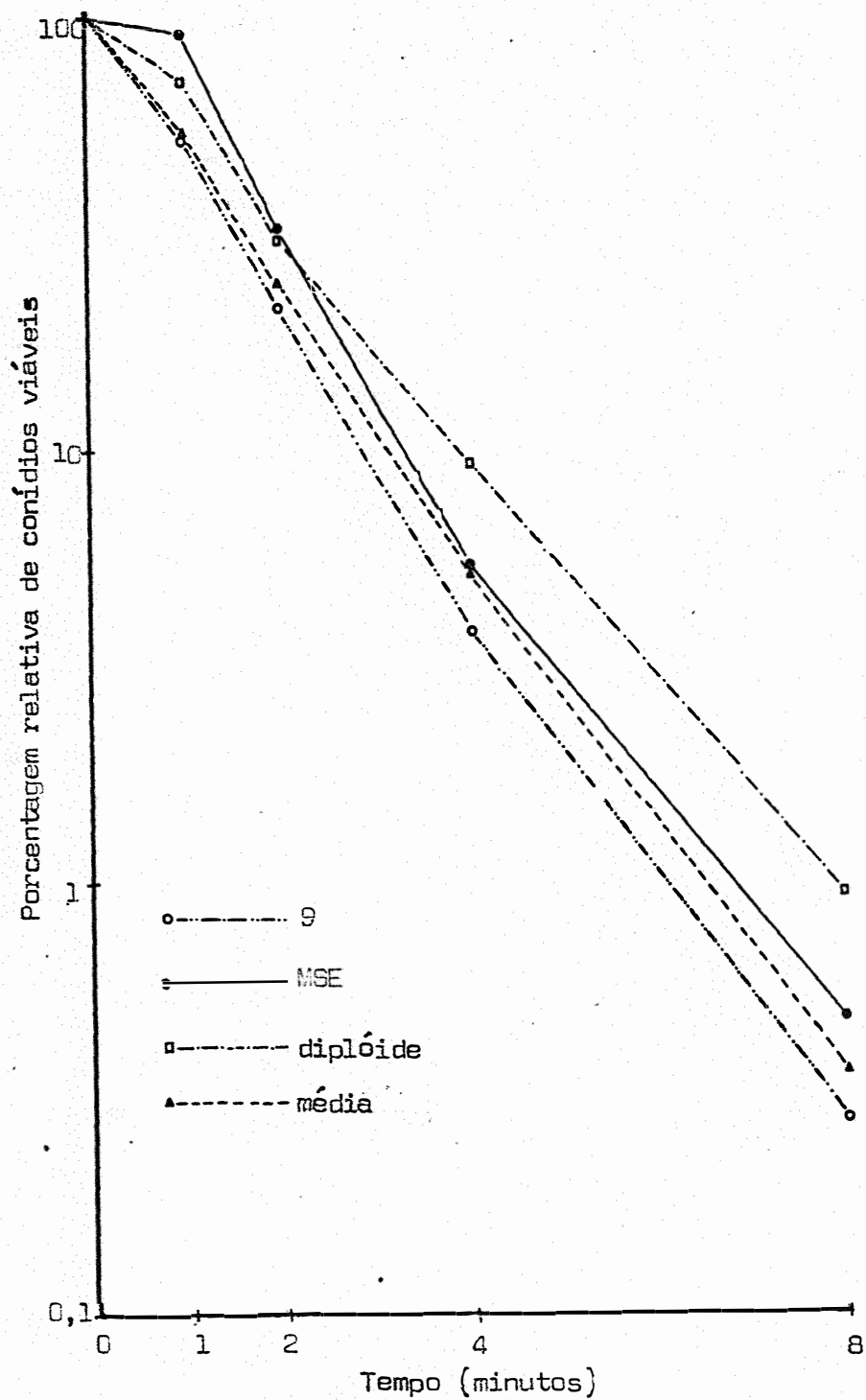


FIGURA 7 - Curvas de sobrevivência à luz ultra-violeta: linhagem 9 - (dissômica) comparada com linhagens haplóide, diploide e média das haplóides.

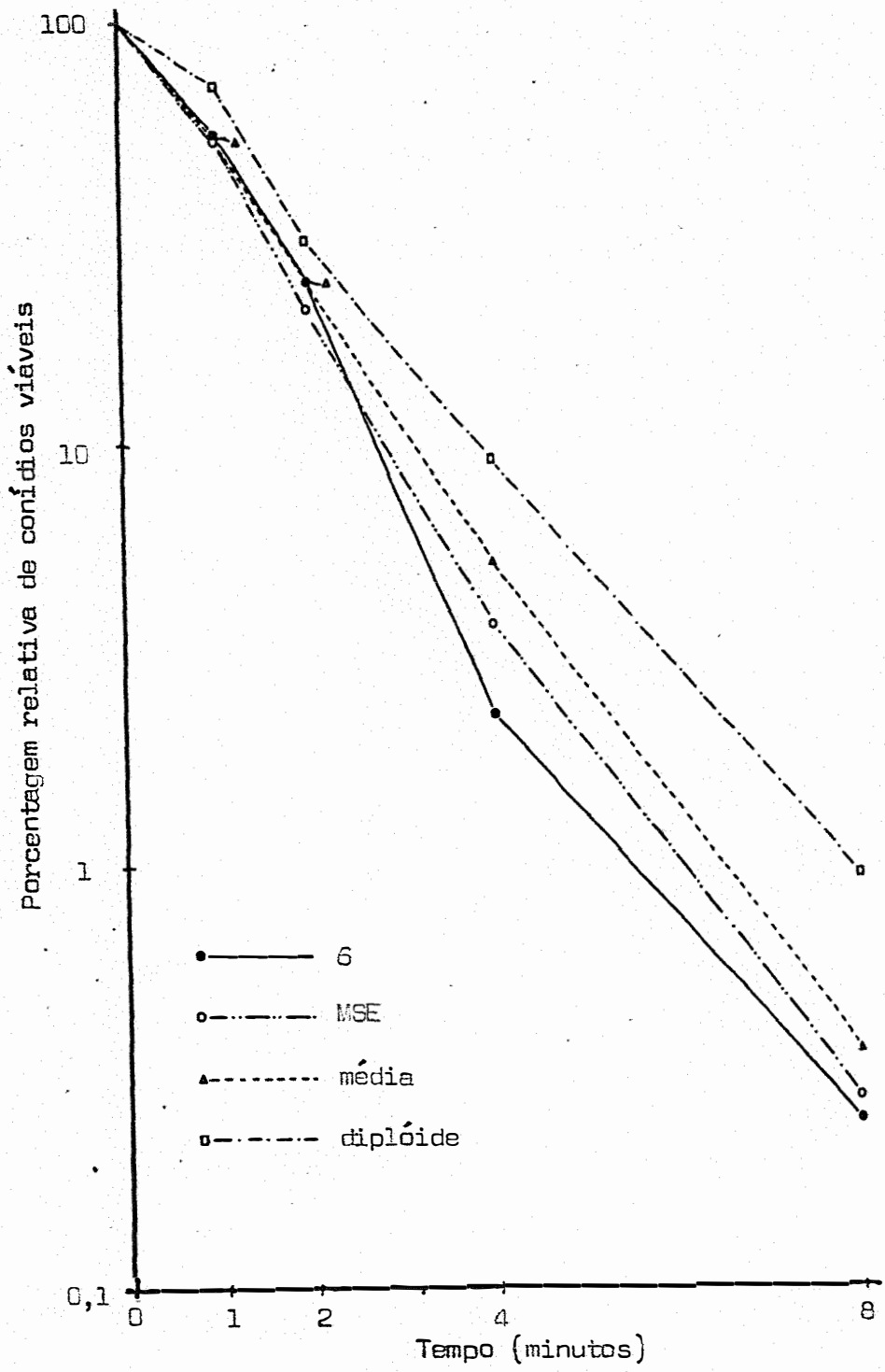


FIGURA 8 - Curvas de sobrevivência à luz ultra-violeta: linhagem 6 (dissômica) comparada com linhagens haplóide, diplóide e média das haplóides.

b) Estabilização de linhagens dissômicas

Para uma tentativa de estabilização foi irradiado o dissômico 4. Utilizando-se a curva de sobrevivência para o dissômico 4 em relação à luz ultra-violeta, (quadro IX e figura 6) irradiou-se confídios dessa linhagem, com doses que dessem de 1 a 5% de sobrevivência. Após essa irradiação, obtiveram-se algumas colônias que apresentaram a parte central estável, bem maior que a das colônias originais.

Foram medidas 8 dessas colônias e como controle usaram-se 8 colônias originais instáveis. Os resultados encontram-se no quadro XII.

QUADRO XII - Diâmetro médio da região central de dissômicos para o grupo de ligação III, irradiados e não irradiados.

Dissômico	Diâmetro médio (mm)
original (não irradiado)	5,00 ± 0,226
mais estáveis (irradiados)	18,875 ± 0,915

DISCUSSÃO

Frequência do aparecimento espontâneo de aneuplóides a partir de linhagens haplóides, normal e com duplicação cromossômica.

Os resultados indicam que não foi possível a obtenção de aneuplóides a partir de linhagem que não continha aberrações cromossômicas estruturais. Por outro lado, uma frequência relativamente alta de aneuplóides foi obtida a partir da linhagem A, que apresenta uma duplicação cromossômica translocada para outro grupo de ligação.

POLLARD, e col. (1968) verificaram que a frequência de aneuplóides do tipo $n + 1$, que aparecem durante a meiose em *A. nidulans*, é muito rara em cruzamentos envolvendo linhagens sem aberrações cromossômicas. No entanto, translocações, se envolvidas, aumentam a frequência de não disjunção e conseqüentemente de dissômicos. O efeito de aberrações combinadas foi ainda mais efetivo em causar não disjunções. A frequência de tipos dissômicos originários de diplóides isto é, por mitose, não foi muito influenciada pela presença ou ausência de aberrações. No nosso caso, dissômicos obtidos de linhagens haplóides e por mitose, mostram ocorrer somente em linhagens com aberrações cromossômicas. Portanto, podemos concluir que, ou aberrações cromossômicas só são atuantes em haplóides em causar não disjunção, ou o tipo de aberração por nós usada (duplicação translocada) comporta-se diferentemente dos tipos de aberrações (translocações) empregados por POLLARD e col. (1968). Quanto à frequência de dissômicos, os originários de linhagens haplóides por mitose como no presente caso, parece ser menor que dos originários por não disjunção meiôtica; FAULKNER (1967) encontrou um valor de 0,734% de prováveis dissômicos obtidos de ascósporos hí-

bridos (portanto por meiose), ou seja um valor 3,6 vezes maior que o encontrado no presente trabalho (por mitose).

Obtenção de aneuplóides a partir de linhagens diplóides, por meio de p-fluorfenilalanina e análise genética dos dissômicos obtidos.

KÄFER (1960; 1961) já havia observado que espontaneamente os diplóides de *A. nidulans* produzem uma alta frequência de aneuplóides. Aliás, foi esta a maneira sugerida pela qual uma linhagem diplóide sofre haploidização, isto é, através de sucessivas perdas cromossômicas por não disjunção.

Diplóides também podem ser induzidos a haploidizar, pelo uso de p-FA (LHOAS, 1961; MORPURGO, 1961). Os estágios intermediários entre os estados diplóide e haplóide não são normalmente observados após indução por p-FA adicionada às placas. No entanto, utilizamos uma modificação do método, qual seja a transferência de setores anormais para novo meio de cultura sem p-FA e posterior transferência de microcolônias. Assim, foi possível a obtenção de estágios intermediários entre os estados diplóide e haplóide. Esta modificação do método pode portanto ter bastante utilidade em futuros estudos sobre não disjunção mitótica e aberrações cromossômicas numéricas em fungos.

Evidentemente, não somente dissômicos foram obtidos mas também outros estágios intermediários. Felizmente, estudos bem conduzidos por UPSHALL (1971) mostraram ser possível uma correlação exata entre os diferentes dissômicos e a morfologia dos mesmos. Assim, pudemos correlacionar os dissômicos obtidos, por sua morfologia, com os diferentes grupos de ligação.

A análise genética viria confirmar qual o grupo de ligação que estaria ocorrendo em excesso, porém no caso, é extremamente difícil.

o a obtenção de corpos de frutificação resultando de cruzamentos de dissômicos x haplóides. O que ocorre é que há perda pelo dissômico, do cromossomo em excesso, antes ou durante o cruzamento, e o que se obtém são apenas segregantes normais. Um exemplo disso foi mostrado no quadro III, onde o cruzamento original foi realizado entre um dissômico e um haplóide, mas somente corpos de frutificação com todos os segregantes haplóides foram obtidos.

Irradiação com luz ultra-violeta de linhagens dissômicas, haplóides e diplóide.

Linhagens haplóides, dissômicas para os grupos de ligação I, II, III, IV e VI e linhagem diplóide foram irradiadas com luz ultra-violeta numa tentativa de verificar se haveria diferença em viabilidade à luz ultra-violeta, entre as diferentes linhagens usadas. Uma viabilidade maior de linhagens diplóides e dissômicas em relação às haplóides é de se esperar, pelo menos teoricamente, pois letais recessivos induzidos em diplóides e no cromossomo em duplicata dos dissômicos não causam a morte do conídio. Uma vez que a probabilidade de indução de letais em cromossomos grandes é maior do que em cromossomos pequenos, talvez essa pudesse ser uma maneira de se estabelecer um paralelo entre grupos de ligação e cromossomos em A. nidulans.

Os resultados quanto à sobrevivência mostraram em primeiro lugar e como era de se esperar, que a linhagem diplóide é mais resistente à luz ultra-violeta do que as linhagens haplóides usadas (Figura 3). No entanto, entre as linhagens haplóides, verificou-se uma grande variabilidade com relação à sobrevivência à luz ultra-violeta; a linhagem bi₁meth₁ foi bem mais resistente que a linhagem MSE. Este fato pode ser devido à qualquer dos marcadores nutricionais envolvidos; entre

tanto, como a sobrevivência foi feita por semeadura de conídios após a irradiação em meio completo, a principal causa dessa divergência observada entre a linhagem bi₁meth₁, de conídios verdes e a linhagem MSE, de conídios brancos, deve ter sido causada pela própria coloração dos conídios.

CURTIS (1970), quando estudou em Aspergillus carbonarius, a influência da pigmentação de conídios na resistência à luz ultravioleta, observou uma queda marcante e brusca da mesma, diretamente relacionada com a diminuição da pigmentação. A pigmentação normalmente marrom bem escura dos conídios de A. carbonarius foi grandemente reduzida quando o organismo cresceu em meio contendo certos derivados dimetilsulfonados. A diminuição e perda da pigmentação não afetaram a germinação, porém foram acompanhadas por uma queda brusca na resistência à luz ultravioleta, medida pela germinabilidade dos conídios após várias doses de irradiação. Dessa maneira, fica difícil estabelecer uma comparação entre os diversos dissômicos, pois as linhagens dissômicas, além de apresentarem morfologia anormal, têm em geral conídios maiores que os conídios haplóides e a coloração dos mesmos é extremamente variável (Quadro I).

De fato, dos 5 dissômicos analisados, apenas 2 deles foram mais resistentes que a linhagem haplóide de mesma coloração e mais resistentes que a média das linhagens haplóides (Figuras 4 a 8); na realidade sua sobrevivência, considerada nos tempos 4 e 8 minutos, situou-se entre a sobrevivência das linhagens haplóides e diplóides. Os outros 3 dissômicos analisados tiveram suas curvas de sobrevivência abaixo inclusive da linhagem haplóide de mesma coloração, tomando-se como base o tempo de 4 minutos. Os tempos de irradiação mais elevados estão sendo tomados em consideração na presente discussão, pois permitem um melhor discernimento das curvas obtidas. Os resultados obtidos com

esses 3 dissômicos indicam claramente que neste caso outros fatores, -- especialmente a coloração dos conídios, estão envolvidos na viabilidade à luz ultra-violeta, em adição ao cromossomo em excesso. Considerando-se então apenas os dissômicos para os grupos de ligação III e IV podemos concluir tentativamente que o grupo de ligação III corresponde a um cromossomo maior que o grupo de ligação IV como se pode depreender das Figuras 6 e 7.

Com relação a esse ponto, algumas considerações interessantes podem ser feitas comparando-se os trabalhos de ELLIOTT (1960), NGA (1966), DORN (1967), AZEVEDO e ROPER (1967), POLLARD e col. (1968) e AZEVEDO (1970).

NGA (1966) estudou a frequência de translocações cromossômicas em A. nidulans induzidas por raios gama. Pelo número de quebras cromossômicas podemos supor que cromossomos maiores sofram quebras mais frequentemente que cromossomos menores. Dessa maneira através dos dados desse autor, poderíamos dizer que o grupo de ligação I corresponde ao maior cromossomo e assim sucessivamente (Quadro XIII). Da mesma maneira, fazendo-se um cálculo do comprimento genético em unidades de recombinação dos diversos grupos de ligação do A. nidulans (DORN, 1967) chegamos à conclusão que o grupo de ligação II é que corresponderia ao maior cromossomo, seguindo-se os grupos de ligação III, I, VIII, IV, V, VI e VII (Quadro XIII). Também, pela frequência de recessivos letais induzidos por ultra-violeta (AZEVEDO e ROPER, 1967) e ácido nitroso (AZEVEDO, 1970) podemos supor que a maior incidência de letais se dê no maior cromossomo, que no caso corresponderia ao grupo de ligação III e a menor incidência de letais no menor cromossomo (Grupo de ligação V), (Quadro XIII).

QUADRO XIII -- Tentativa de correlação entre grupos de ligação e cromossomos em Aspergillus nidulans, baseada no número de quebras causadas por raios gama, recessivos letais induzidos, unidades de recombinação e frequência de aneuplóides.

GRUPOS DE LIGAÇÃO	Nº DE QUEBRAS CROMOSSOMICAS	*	**	***	****				
		MÉDIA DE RECESSIVOS LEITAIS INDUZIDOS	MÉDIA DE RECESSIVOS LEITAIS INDUZIDOS	UNIDADES DE RECOMBINAÇÃO	FREQUÊNCIA MÉDIA DE ANEUPLOÍDES	SOMAS DAS CLASSIFICAÇÕES	classif.	classif.	classif.
I	15	1	3,0	2	147	3	1,0	2	8
II	8	6	2,5	3	197	1	4,0	5	15
III	9	5	5,5	1	196	2	20,0	8	16
IV	11	4	1,0	6	105	5	11,0	7	22
V	6	7	0,0	8	95	6	7,0	6	27
VI	5	8	1,0	6	87	7	1,0	2	23
VII	12	3	1,5	5	86	8	1,5	4	20
VIII	13	2	2,5	3	107	4	0,0	1	10

* -- Segundo NGA (1966).

** -- " AZEVEDO e ROPER (1967) e AZEVEDO (1970).

*** -- " DORN (1967).

**** -- " POLLARD e col. (1968).

Finalmente, considerando-se o trabalho de POLLARD e col. (1968), que analisaram o número de dissômicos obtidos dos diferentes tipos, podemos supor que os dissômicos mais frequentes correspondam aos menores cromossomos e os menos frequentes aos maiores cromossomos. Considerando-se agora em conjunto todos esses dados, podemos então concluir que provavelmente o grupo de ligação I corresponde ao maior cromossomo do A. nidulans seguindo-se por ordem decrescente de tamanho os

grupos de ligação VIII, II, III, VII, IV, VI e V. Assim os grupos de ligação I, VIII e II seriam os 3 grandes cromossomos citados por ELLIOTT (1960). Os grupos de ligação III e VII corresponderiam aos 2 cromossomos de tamanho médio. Os grupos de ligação IV e VI, seriam os 2 cromossomos pequenos e o cromossomo muito pequeno corresponderia ao grupo de ligação V. Nossos resultados concordam com essas suposições no que se refere aos 2 únicos casos que puderam ser analisados, isto é, no fato de que pelas curvas de sobrevivência a luz ultra-violeta, o grupo de ligação III mostrou corresponder a um cromossomo maior que o grupo de ligação IV. Por outro lado, a luz ultra-violeta mostrou não ser o agente mais indicado no caso, em virtude dos problemas já mencionados anteriormente. Talvez agentes mutagênicos químicos tais como o etilmetano-sulfonato e o ácido nitroso sejam agentes muito mais indicados para se fazer uma correlação entre curvas de sobrevivência e tipo de dissômico, pois esses agentes não são afetados em sua ação pela coloração de conídios. Além disso no caso do ácido nitroso resultados preliminares indicaram grande diferença de sobrevivência entre linhagens haplóides e diplóides, sendo os diplóides muito mais resistentes que os haplóides.

Estabilização de linhagens dissômicas

Como já referido anteriormente, linhagens dissômicas são instáveis devido à perda do cromossomo em excesso. Isto, evidentemente, dificulta um estudo com estas linhagens. Um exemplo típico de dificuldade dessa natureza é a da obtenção de corpos de frutificação híbridos entre uma linhagem dissômica e uma linhagem haplóide. Para se contornar essa dificuldade, pode-se imaginar uma maneira de estabilizar linhagens dissômicas através de um sistema de letais balanceados, como fizemos

ram AZEVEDO e ROPER (1967) em linhagens diplóides de *A. nidulans*. Os resultados obtidos com a linhagem 4, dissômica para o grupo de ligação III, mostraram que essa estabilização é possível pelo menos parcialmente. (Quadro XII). A razão da não estabilização completa da linhagem dissômica é muito provavelmente a ocorrência de permuta somática no cromossomo em questão, produzindo-se recombinantes que não mais carregam um sistema de letais balanceados e que portanto podem perder o cromossomo em excesso. Pode-se pensar desde já então em inúmeras aplicações de dissômicos estáveis, para a genética, indústria e biologia molecular. Apenas para citar alguns exemplos, poderia se imaginar linhagens dissômicas de valor industrial, devido a presença de genes conferindo heterose ou vigor de híbrido no cromossomo em duplicata, à semelhança do que ocorre com linhagens diplóides ou mesmo duplicadas em certos fungos (Para revisão ver AZEVEDO e NEDER, 1969 e AZEVEDO, 1973). Um outro exemplo do uso de dissômicos estáveis seria um estudo da quantidade de DNA de linhagens dissômicas comparadas com linhagens haplóides normais.

RESUMO

O presente trabalho teve como finalidade, primeiramente a obtenção por via mitótica, de aneuplóides de duas linhagens haplóides, uma normal e outra com duplicação cromossômica translocada, afim de se comparar entre as duas, a frequência do aparecimento espontâneo dos mesmos. Essa diferença deveria refletir a influência de aberrações cromossômicas no processo de não disjunção mitótica. Pelos resultados, pudemos concluir, que no presente caso, dissômicos obtidos de linhagens haplóides e por mitose, ocorreram somente em linhagens com aberrações cromossômicas.

Em segundo lugar, tentou-se, através de irradiação com luz ultra-violeta e obtenção de curvas de sobrevivência de vários dissômicos, conhecer os tamanhos relativos dos vários cromossomos envolvidos e assim correlacionar os mesmos com os grupos de ligação. A luz ultra-violeta mostrou-se não ser o agente mais indicado no caso, em virtude de problemas relacionados principalmente com a coloração dos condícios. Entretanto, correlacionando dados obtidos por vários autores, que utilizaram métodos bem diversos mas que permitem estabelecimento de relações entre tamanho de cromossomos e grupos de ligação envolvidos, pudemos concluir que teoricamente este método é válido, sendo sugerido apenas, mudança do agente (luz ultra-violeta) por outros agentes mutagênicos.

Por último, procurou-se verificar a possibilidade de aumento da estabilidade de aneuplóides, através de um sistema de letais balanceados. Os resultados obtidos, mostraram ser essa estabilidade possível, pelo menos parcialmente.

SUMMARY

The purpose of this experiment can be summarized as follows:

1) The obtaining, through mitosis, of aneuploids from two haploid strains, one normal and the other with translocated chromosomal duplication, in order to compare the frequency of their spontaneous appearance. The difference in the frequency should give an idea of the influence of the chromosomal aberrations on the mitotic nondisjunction process. It was concluded, in the present case, that the occurrence of disomics was only possible in the strains with chromosomal aberrations.

2) Through ultra-violet irradiation and survival curves of some disomics it was intended to know the relative length of the chromosomes involved, and thus correlate them with the linkage groups. It was observed that ultra-violet light is not the best indicated mutagenic agent, due mainly to the interference of the conidia coloration. Nevertheless it was possible to establish a relationship between chromosomal length and linkage group. It is suggested that other mutagenic agents should be used for the same purpose in future research.

3) The possibility of increasing the stability of the aneuploids through a balanced lethals system was also investigated. The results showed that there is, at least, a partial possibility of doing so.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- APIRION, D. -- 1962 -- A General System for the Automatic Selection of Auxotrophs from Prototrophs and Vice Versa in Microorganisms. Nature, London 195: 959-961.
- AZEVEDO, J. L. -- 1966 -- Estudos sobre Recessivos Letais em Aspergillus nidulans (Eidam) Winter. Tese de Livre-Docência. ESALQ, USP. 121 pp.
- AZEVEDO, J. L. -- 1970 -- Recessive Lethals Induced by Nitrous Acid in Aspergillus nidulans. Mutation Research 10: 111-117.
- AZEVEDO, J. L. -- 1971 -- Mitotic Non-Conformity in Aspergillus nidulans. PhD Thesis, University of Sheffield, Great Britain, 240 pp.
- AZEVEDO, J. L. -- 1973 -- O Ciclo Parassexual em Fungos. Revista de Microbiologia 3. (no prelo).
- AZEVEDO, J. L. & R. N. NEDER -- 1969 -- Estudos Genéticos em Certos Fungos Filamentosos, in Melhoramento e Genética (W.E. Kerr, organizador), Edições Melhoramentos, São Paulo, pp. 245-261.
- AZEVEDO, J. L. & J. A. ROPER -- 1967 -- Lethal Mutations and Balanced Lethal Systems in Aspergillus nidulans. The Journal of General Microbiology 49: 149-155.
- AZEVEDO, J. L. & J. A. ROPER -- 1970 -- Mitotic Non-Conformity in Aspergillus : Successive and Transposable Genetic Changes. Genetic Research, Cambridge, 16: 79-93.
- BAINBRIDGE, B.W. & J. A. ROPER -- 1966 -- Observations on the Effects of a Chromosome Duplication in Aspergillus nidulans. The Journal of General Microbiology 42: 417-424.
- BALL, C. & ROPER, J. A. -- 1966 -- Studies on the Inhibition and Mutation of Aspergillus nidulans by Acridines. Genetical Research, Cambridge 7: 207-221.
- BEADLE, G.W. -- 1932 -- The Relationship of Crossing-over to Chromosome Association in Zea - Euchlaena Hybrids. Genetics 52: 233-246.
- CURTIS, C. R. -- 1970 -- Comparison of UV-Induced Delay in Germination in Pigmented and Pigment-Inhibited Conidia of Aspergillus carbonarius. Radiation Botany 10: 125-130.
- DOBZHANSKY, T. -- 1930 -- Translocations Involving the Third and Fourth Chromosomes of Drosophila melanogaster. Genetics 15: 347-399.

- DOBZHANSKY, T. & A. H. STURTEVANT -- 1931 -- Translocations Between the Second and Third Chromosomes of *Drosophila* and Their Bearing on Coenothera Problems. Carnegie Institut Washington Publications 421: 29-59.
- DORN, G.L. -- 1967 -- A Revised Map of the Eight Linkage Groups of *Aspergillus nidulans*. Genetics 56: 619-631.
- ELLIOTT, C.G. -- 1960 -- The Cytology of *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, Cambridge 1: 462-476.
- FAULKNER, B.M. -- 1967 -- Spontaneous Aneuploidy in Haploid Strains of *Aspergillus nidulans*. Aspergillus Newsletter 8: 18.
- FINCHAM, J.R.S. & P.R. DAY -- 1971 -- Fungal Genetics. Blackwell Scientific Publications. Oxford, Great Britain, 300 pp.
- GLASS, H.B. -- 1933 -- A Study of Dominant Mosaic Eye-Colour Mutants in *Drosophila melanogaster*. Journal of Genetics 23: 69-112.
- KAFER, E. -- 1960 -- High Frequency of Spontaneous and Induced Somatic Segregation in *Aspergillus nidulans*. Nature, London 186: 619-620.
- KAFER, E. -- 1961 -- The Processes of Spontaneous Recombination in Vegetative Nuclei of *Aspergillus nidulans*. Genetics 46: 1581-1609.
- KAFER, E. -- 1962 -- Translocations in Stock Strains of *Aspergillus nidulans*. Genetics 33: 59-60.
- KAFER, E. -- 1960 -- Origins of Translocations in *Aspergillus nidulans*. Genetics 52: 217-232.
- KAFER, E. & T.L. CHEN -- 1964 -- Translocations and Recessive Lethals Induced in *Aspergillus nidulans* by Ultra-Violet Light and Gamma Rays. Canadian Journal of Genetics and Cytology 6: 245-254.
- LHOAS, P. -- 1961 -- Mitotic Haploidization by Treatment of *Aspergillus niger* Diploids With *para*-Fluorophenylalanine. Nature, London 190: 744.
- MACDONALD, K.D. -- 1964 -- Preservation of the Heterozygous Diploid Condition in Industrial Microorganisms. Nature, London 204: 404-405.
- MC CULLY, K. & 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.
- MORPURGO, O. -- 1961 -- Somatic Segregation Induced by *para*-Fluorophenylalanine. Aspergillus Newsletter 2: 10.

- NGA, B.H. - 1966 - Quantitative Intrachromosomal Changes Arising at Mitosis in Aspergillus nidulans. PhD Thesis, University of Sheffield, Great - Britain.
- NGA, B.H. & J. A. ROPER - 1968 - Quantitative Intrachromosomal Changes Arising at Mitosis in Aspergillus nidulans. Genetics 58: 193-209.
- NGA, B.H. & J. A. ROPER - 1969 - A System Generating Spontaneous Intrachromosomal Changes at Mitosis in Aspergillus nidulans. Genetical Research, Cambridge 14: 63-70.
- POLLARD, D.R., E. KÄFER & M.T. JOHNSTON - 1968. Influence of Chromosomal Aberrations on Meiotic and Mitotic Nondisjunction in Aspergillus nidulans. Genetics 60: 743-757.
- PONTECORVO, G. - 1956 - The Parasexual Cycle in Fungi. Annual Review of Microbiology 10: 393-400.
- PONTECORVO, G. & 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. MACDONALD & A.W.J. BUFTON - 1953 - The Genetics of Aspergillus nidulans. Advances in Genetics 5: 142-238.
- PONTECORVO, G., E. TARR-GLOOR & E. FORBES - 1954 - Analysis of Mitotic Recombination in Aspergillus nidulans. Journal of Genetics 52: 225-237.
- ROPER, J.A. - 1952 - Production of Heterozygous Diploids in Filamentous Fungi. Experientia 8: 14-15.
- ROPER, J.A. & B.H. NGA - 1969 - Mitotic Non-Conformity in Aspergillus nidulans: the Production of Hypodiploid and Hypohaploid nuclei. Genetical Research, Cambridge 14: 127-136.
- ROPER, J.A. & R.H. PRITCHARD - 1955 - Recovery of the Complementary Products of Mitotic Crossing-over. Nature, London 175: 639.
- STERN, G. - 1936 - Somatic Crossing-Over and Segregation in Drosophila melanogaster. Genetics 21: 625-730.
- STURTEVANT, A.H. - 1926 - A Crossover Reducer in Drosophila melanogaster Due to Inversion of a Section of the Third Chromosome. Biologisches Zentralblatt 46: 697-702.
- UPSHALL, A. - 1971 - Phenotypic Specificity of Aneuploid States in Aspergillus nidulans. Genetical Research, Cambridge 18: 167-171.