

PARASSEXUALIDADE E PRODUÇÃO DE AFLATOXINA EM
Aspergillus flavus, Link.

CLAUDIO LUIZ MESSIAS

Instituto de Biologia
UNICAMP

Orientador : JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

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

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo
Maio - 1977

Ofereço

Minha mãe

e a minha irmã ANA RITA

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

Quero externar meus agradecimentos àqueles que de alguma forma colaboraram para a realização desse trabalho, que como todos é fruto da colaboração entre os homens, e ao mesmo tempo quero dirigi-los especialmente para:

- Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação valiosa na realização desse trabalho, bem como pela amizade sincera e pelos estímulos constantes.
- Ao Prof. Dr. Pedro Magalhães Lacava pelo apoio e orientação nos primeiros trabalhos realizados nesta área.
- Aos Prof. Dr. Homero Fonseca, pela orientação na parte de aflatoxina, e também ao Prof. Dr. Alcides Martinelli Filho e a ambos pela doação das linhagens que foram empregadas no presente trabalho.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida bem como pelo auxílio financeiro do setor de Genética de Microorganismo do IGEN, através do programa Integrado de Genética. E ainda a USAID (Aliança para o Progresso), através do CNPq.
- A Universidade Estadual de Campinas, bem como ao Prof. Dr. Walter August Hadler, diretor do Instituto de Biologia pelas facilidades concedidas.
- Ao Prof. Dr. Ernesto Paterniani pelas facilidades concedidas como diretor do Instituto de Genética.

- Aos Prof. Dr. Ivanhoé Rodrigues Barracho e ao Prof. Dr. Aquiles Eugenio Piedrabuena pela colaboração na parte estatística.
- Ao Colega José Paes de Barros, pelas sugestões na elaboração do texto.
- Aos Sr.^s Antonio J. Rocha Campos, Salvador Pexe, Luiz Próspero pelo auxílio técnico.
- Ao Sr. José Boglio, pelo valioso auxílio na impressão.

Í N D I C E

	Página
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 - Características gerais e estudos genéticos em <i>A. flavus</i>	3
2.2 - Aspectos gerais sobre a produção de aflatoxina	7
3 - MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 - Linhagens utilizadas	11
3.2 - Meios de cultura e soluções utilizadas ...	13
3.2.1 - Meio mínimo (PONTECORVO e col. 1953)	13
3.2.2 - Meio completo (PONTECORVO e col. 1953)	13
3.2.3 - Meio mínimo mais 2% de meio completo	14
3.2.4 - Meio "YES" (DAVIS e col. 1966)	14
3.2.5 - Solução salina	14
3.2.6 - Solução de tween 80	14
3.2.7 - Solução de p-fluorofenilalanina (pFA)	15
3.2.8 - Solução de vitaminas	15
3.2.9 - Solução de caseína hidrolisada	15

	Página
3.2.10 - Hidrolisado de ácido nucléico de leveduras	16
3.2.11 - Suplementos adicionados ao meio mínimo	16
3.2.12 - Solução de albumina (ROBINOW e CATEN, 1969)	17
3.2.13 - Solução de álcool etílico	17
3.2.14 - Solução de ácido acético glacial ..	17
3.2.15 - Fixador HCl	17
3.2.16 - Tampão fosfato	18
3.2.17 - Solução de Giemsa	18
3.3 - Crescimento das linhagens em meio mínimo e em meio completo (PONTECORVO e col. 1953)	18
3.4 - Curva de sobrevivência	19
3.5 - Obtenção dos mutantes auxotróficos	19
3.6 - Técnicas de análise genética	21
3.6.1 - Obtenção heterocário	21
3.6.2 - Obtenção de diplóides	22
3.6.3 - Haploidização de diplóides	22
3.6.4 - Teste de reversão	23
3.7 - Observação do número de núcleos nas linhagens selvagens, mutantes e diplóides ..	23
3.8 - Intervalo de confiança para as porcentagens do número de núcleos por conídios de <i>A. flavus</i>	24

	Página
3.9 - Avaliação da produção de aflatoxina em linhagens selvagens, mutantes, diplóides e segregantes haplóides	25
3.9.1 - Extração da aflatoxina	25
3.9.1.1 - Micélio	25
3.9.1.2 - Meio de cultura	26
3.9.1.3 - Preparação das cromatoplasmas .	26
3.9.1.4 - Determinação quantitativa da aflatoxina	27
4 - RESULTADOS OBTIDOS	29
4.1 - Teste de crescimento das linhagens de <i>A. flavus</i> em meio mínimo (MM) e meio completo (MC). PONTECORVO e col. (1953)	29
4.2 - Curva de sobrevivência	30
4.3 - Obtenção dos mutantes	30
4.3.1 - Teste de reversão	33
4.4 - Análise genética	35
4.4.1 - Obtenção do heterocário	36
4.4.2 - Obtenção de diplóides	36
4.4.3 - Haploidização dos diplóides	37
4.5 - Contagem do número de núcleos nas linhagens mutantes, diplóides e selvagens de <i>A. flavus</i>	39
4.6 - Produção de aflatoxina B ₁ no micélio e no meio de cultura das linhagens selvagens, mutantes, diplóides e segregantes haplóides	42

	Página
5 - DISCUSSÃO	46
5.1 - Sobrevivência de <i>A. flavus</i> à luz ultravioleta	46
5.2 - Mutantes obtidos	47
5.3 - Análise genética	50
5.3.1 - Heterocários	50
5.3.2 - Diplóides	50
5.3.3 - Haploidização	51
5.4 - Análise do número de núcleos em linhagens originais, mutantes e diplóides	52
5.4.1 - Selvagens	52
5.5 - Produção de aflatoxina	53
5.5.1 - Segregantes	55
6 - RESUMO E CONCLUSÕES	56
7 - SUMMARY AND CONCLUSIONS	58
8 - LITERATURA CITADA	60
9 - APÊNDICE	65

ÍNDICE DAS TABELAS

	Página
TABELA 1 - Diversos fungos produtores de aflatoxina	9
TABELA 2 - Produção de aflatoxina B ₁ , em ppm no micélio e no meio de cultura por linhagem de <i>A. flavus</i>	12
TABELA 3 - Porcentagem de conídios de <i>A. flavus</i> sobreviventes a UV. (2537 Å)	30
TABELA 4 - Mutantes simples de <i>A. flavus</i> , obtidos por irradiação de luz UV	32
TABELA 5 - Duplos mutantes de <i>A. flavus</i> , obtidos por irradiação à luz UV	32
TABELA 6 - Representação dos mutantes de <i>A. flavus</i> , utilizados no presente trabalho	33
TABELA 7 - Frequência de reversão espontânea de diferentes mutantes de <i>A. flavus</i>	35
TABELA 8 - Formação de heterocários entre diferentes linhagens de <i>A. flavus</i>	36
TABELA 9 - Diplóides obtidos entre diferentes linhagens de <i>A. flavus</i>	37

	Página
TABELA 10 - Segregantes haplóides de diferentes diplóides heterozigotos de <i>A. flavus</i>	38
TABELA 11 - Número de núcleos em conídios de <i>A. flavus</i>	39
TABELA 12 - Porcentagem de conídios de <i>A. flavus</i> com diferentes números de núcleos	40
TABELA 13 - Limite de confiança para a porcentagem do número de núcleos por conídios em mutantes e diplóides de <i>A. flavus</i>	41
TABELA 14 - Produção de aflatoxina B ₁ , em ppm, pelas linhagens selvagens de <i>A. flavus</i> ..	43
TABELA 15 - Produção de aflatoxina B ₁ , em ppm, pelas linhagens mutantes de <i>A. flavus</i>	43
TABELA 16 - Produção de aflatoxina B ₁ , em ppm, para diferentes diplóides de <i>A. flavus</i> ...	44
TABELA 17 - Produção de aflatoxina B ₁ , em ppm, para diferentes segregantes haplóides de <i>A. flavus</i>	45

ÍNDICE DAS FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Curva de sobrevivência, <i>A. flavus</i> à luz ultravioleta	31
FIGURA 2 - Obtenção dos mutantes de <i>A. flavus</i> , à luz ultravioleta	34

ÍNDICE DO APÊNDICE

	Página
TABELA A.1 - Leitura das cromatoplasmas com luz ultravioleta: extratos originários de meio de cultura, de linhagens selvagens e mutantes haplóides	66
TABELA A.2 - Leitura das cromatoplasmas com luz ultravioleta: extratos originários de meio de cultura, de diferentes diplóides	67
TABELA A.3 - Leitura das cromatoplasmas com luz ultravioleta: extratos originários de meio de cultura, de diferentes segregantes haplóides	68
TABELA A.4 - Leitura das cromatoplasmas com luz ultravioleta: extratos oriundos de micélio de linhagens, selvagens e mutantes haplóides	69
TABELA A.5 - Leitura das cromatoplasmas com luz ultravioleta: extratos oriundos de micélio de diplóides	70
TABELA A.6 - Leitura das cromatoplasmas com luz ultravioleta: extratos oriundos de micélio de segregantes haplóides	71

	Página
TABELA A.7 - Peso do micélio das linhagens selvagens e mutantes haplóides, utilizadas para extração de aflatoxina	72
TABELA A.8 - Peso do micélio de diferentes diplóides e segregantes haplóides	73
TABELA A.9 - Tipos de conídios e porcentagem dos diferentes tipos de conídios nas linhagens haplóides e diplóides	74
TABELA A.10 - Resultado da análise dos setores haplóides do diplóide (<u>arg</u> + <u>w</u>)(+ <u>lys</u> <u>y</u>)	75
TABELA A.11 - Resultado da análise dos setores haplóide do diplóide (<u>pro</u> <u>pab</u> + <u>g</u>)(+ + <u>lys</u> <u>y</u>)	75

1 - INTRODUÇÃO

A aflatoxina, causadora da morte de mais de cem mil peruzinhos na Inglaterra em 1960, é produzida por vários fungos principalmente o *Aspergillus flavus*.

Uma série de toxinas são conhecidas, destacando-se B₁ e B₂, G₁ e G₂, que se apresentam com fluorescência azul e verde respectivamente, quando analisadas em cromatografia de camada delgada à luz ultravioleta; e que são bastante tóxicas, salientando-se a aflatoxina B₁ em termos de toxicidade.

Essas substâncias têm-se mostrado cancerígenas a diversos animais. Devido a essa característica, a aflatoxina ganhou atenção especial por parte dos pesquisadores de todo mundo, bem como o fungo *A. flavus*, pelo fato deste microrganismo atacar produtos que são básicos na alimentação de muitos países, como fontes de proteínas.

O *A. flavus*, produtor desta toxina, é um fungo imperfeito; e estudos genéticos da produção desta substância só podem ser realizados com a colaboração do ciclo parassexual. Mutantes com produção alterada de aflatoxina tem sido obtidos e alguns trabalhos já foram realizados por LEAICH e PAPA (1974) e PAPA (1977).

No presente trabalho procurou-se, pela obtenção de mutantes para diferentes requisitos nutrimentais, a partir de linhagens de *A. flavus*, produtoras de diferentes quantidades de aflatoxina, estudar a produção desta toxina através do ciclo parassexual.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Características gerais e estudos genéticos em *A. flavus*

O fungo filamentoso *A. flavus* apresenta-se com abundante conidiação, quando crescido em meio Czapeck sólido; sua colônia tem crescimento rápido e apresenta-se plana e radiada, adquirindo uma coloração amarelo-esverdeada, que tende a verde-oliva, após um período longo de desenvolvimento (RAPER e FENNEL, 1969). Os conídios são uninucleados (RAPER e FENNEL, 1969) ou binucleados (YUILL, 1950), com 4,5 a 7,0 micras de diâmetro, apresentando-se com forma globosa.

Esse fungo produz, no meio de cultura, substâncias exógenas, entre elas a aflatoxina, de grande importância por ter-se mostrado como uma substância altamente carcinogênica. Estudos relacionados a aspectos genéticos de *A. flavus*, tem

sido desenvolvidos, procurando-se verificar a existência do ciclo parassexual, fenômeno este descoberto por PONTECORVO e ROPER (1952) em *A. nidulans*. Atualmente, vários outros fungos já tem seu ciclo parassexual descrito. Esse ciclo parassexual veio permitir estudos genéticos em muitos fungos que não apresentam o ciclo sexual. O fenômeno apresenta os seguintes passos essenciais: heterocariose, diploidização, recombinação mitótica e haploidização (PONTECORVO e col. 1953).

O ciclo parassexual em *A. flavus* foi observado pela primeira vez por PAPA (1973). Segundo o autor, os diplóides obtidos apresentam-se com redução do número de núcleos, apresentando, em grande proporção, conídios com um único núcleo. Assim sendo, PAPA (1973) cita a variação do número de núcleos como sendo um dado para a identificação de diplóides em *A. flavus*. Até então, outros critérios, que incluem o diâmetro e o volume do conídio, e o conteúdo de DNA, eram utilizados em várias espécies de *Aspergillus* (PONTECORVO e col. 1953).

ISHITANI e col. (1956) sugerem que o número de núcleos e o conteúdo de DNA do núcleo que migra para o conídio, determinam o tamanho do conídio, antes da constricção do esterigma em *A. oryzae* e *A. sojae*.

IKEDA e col. (1957) verificaram também em *A. oryzae* e *A. sojae* que os mesmos não apresentam diferença no tamanho entre conídios diplóides e haplóides, embora o número de núcleos por conídio seja reduzido à metade nos diplóides.

LEAICH e PAPA (1975), trabalhando com a linhagem PC 7 de *A. flavus*, obtiveram sete mutantes haplóides que apresentavam um grande número de conídios binucleados, totalizando 3,1% em mutante branco (W_3), em 176 conidióforos analisados, e 44,1% em outro mutante branco (W_2), em 50 conidióforos observados.

Em *A. flavus*, haplóides binucleados (N+N) e diplóides uninucleados (2N) apresentam o conídio com o mesmo volume, pois, praticamente, o haplóide tem equivalente soma de DNA em relação ao diplóide (PAPA e LEAICH, 1975).

LEAICH e PAPA (1974), estudando a produção de aflatoxina em mutantes de *A. flavus*, não verificaram correlação aparente em requisitos nutrimentais e produção de aflatoxina. Significativas produções de aflatoxina do grupo B (B_1 e B_2) foram produzidas pelos mutantes, o que permitiu uma distribuição dos mutantes em grupos, em relação à produção de aflatoxina, a saber: alta, intermediária e baixa.

Em outros fungos pertencentes ao grupo *A. flavus*, como o *A. oryzae*, o heterocáριο formado entre um isolado fraco produtor de ácido kójico (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e outro forte produtor (3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) produz ácido kójico em níveis maiores que os pais. O diplóide, entretanto, produz muito menos ácido kójico que os pais superiores. Alguns segregantes, entretanto, mostram significativo aumento na produção para síntese de ácido kójico, (6000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) IKEDA (1957).

PAPA e LEAICH (1973), em *A. flavus*, -demonstraram que heterocáριο pode ser formado entre mutantes que se diferenciavam em marcas nutrimentais, cor de conídios e produção de aflatoxina B₁. A análise dos níveis de aflatoxina em mutantes haplóides e em segregantes haplóides e diplóides, obtidos por haploidização dos diplóides, sugerem que mais de um tipo de ação gênica está envolvido.

Diplóides heterozigotos para a produção de aflatoxina B₁ (B₁⁺/B₁⁻) geralmente produzem pouca aflatoxina B₁. Os segregantes desses diplóides possuem níveis de produção de aflatoxina B₁ similar aos pais haplóides, o que sugere uma simples diferença gênica. Poucos segregantes dos diplóides sintetizados de B₁⁺ haplóides apresentam níveis de B₁ similares ao de seu pai haplóide de maior produção, ao passo que outros segregantes mostram níveis intermediários de B₁. Esses resultados indicam um possível efeito aditivo de genes para a produção de aflatoxina B₁.

CODNER (1963) verificou que muitas linhagens produzem tipos de aflatoxina B e G, ou só B. Poucas linhagens produzem somente um tipo de aflatoxina B₁ ou G₁. Assim sendo, este fato sugere que vários tipos de aflatoxina podem seguir uma sequência de processos enzimáticos.

DONKERSLOOT e Col. (1972), descrevem um mutante de *A. parasiticus*, enfraquecido para biossíntese e para a acumulação de "averufin", como um possível intermediário.

LEE e col. (1971) observaram um mutante acumulando uma outra substância, que poderia ser um possível intermediário na síntese, substância esta que é o ácido norsolorínico, acumulado por um mutante de *A. parasiticus*.

2.2 - Aspectos gerais sobre a produção de aflatoxina

Em 1960, na Inglaterra, mais de cem mil perus morreram vítimas de uma doença desconhecida, que foi chamada de "Turkey X Disease". Essas observações, além de outras, foram relacionadas com hepatomas.

Observações importantes haviam sido feitas: a doença estava em um raio de 80 a 100 milhas de Londres e associada com a alimentação ministrada a estes animais. Analisando-se o produto, verificou-se que, na alimentação manufaturada pelas companhias, havia um ingrediente em comum, a torta de amendoim trazida do Brasil (GOLDBLATT, 1969). Os estudos se seguiram e observações de amostras tóxicas e não tóxicas, oriundas do Brasil, revelaram nas primeiras, desenvolvimento de hifas entre os cotilédones. Mas foi em amostras altamente tóxicas originárias de Uganda que se verificou a contaminação por um fungo (SARGENT e col. 1961).

O fungo foi desenvolvido em Czapek, e solução deste meio de cultura em clorofórmio possibilitou a observação de fluorescência, quando cromatografadas em papel, num Rf de 0,7. Este extrato foi tóxico a peruzinhos e causou o mesmo sintoma

associado à doença "X". O agente produtor foi identificado como sendo o *A. flavus*, Link (SARGENT e col. 1961), e à toxina foi dado o nome de Aflatoxina, em vista de sua origem.

Atualmente já se conhecem outros fungos que são produtores de aflatoxina, embora até 1965 a produção de aflatoxina era suposta apenas como sendo produzida por dois fungos, o *A. flavus* e o *A. parasiticus*.

DIENER e DAVIS (1969) apresentam uma lista dos fungos produtores dos diferentes tipos de aflatoxina "in vitro". Na Tabela 1, são apresentados estes fungos, bem como o tipo de aflatoxina produzido pelos mesmos.

A produção de aflatoxina pode ser influenciada por alguns fatores de ordem ambiental, como o tipo de substratos, o tempo e a temperatura, o pH, a fonte de carbono, a fonte de nitrogênio, os microelementos e as vitaminas (DIENER e DAVIS, 1969).

A produção geralmente é estudada em meio líquido, devido à facilidade de extração. As primeiras investigações feitas por NESBITT e col. (1962) utilizaram meio Czapek modificado, adicionado de sulfato de zinco; pequenas quantidades de aflatoxina foram produzidas, mesmo quando a esse meio era adicionado extrato de leveduras.

Utilizando-se a linhagem ATCC 15517 (V-373410), MATELES e ADYE (1965), obtiveram uma produção de 90 mg de aflatoxina por litro de meio, com agitação, mas somente 63 mg/litro, em cultura submersa com glicose-amônio. A mesma cultu-

ra produziu 63 mg em 100 ml de meio, utilizando-se 2% de extrato de levedura e 20% de sacarose em cultivo estacionário (DAVIS e col. 1966).

TABELA 1. Diversos fungos produtores de aflatoxina

F u n g o s	A f l a t o x i n a s			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Grupo do <i>A. flavus</i>				
<i>A. flavus</i>	+	+	+	+
<i>A. flavus</i> var. <i>columaris</i>	-	+	-	-
<i>A. oryzae</i>	+	+	-	-
<i>A. parasiticus</i>	+	+	-	+
Outras espécies				
<i>A. niger</i>	+	-	-	-
<i>A. wentii</i>	+	-	-	-
<i>A. ruber</i>	+	-	-	-
<i>A. ostianus</i>	+	-	-	-
<i>A. ochraceus</i>	+	-	-	-
<i>Penicillium puberulum</i>	+	-	-	-
<i>P. variable</i>	+	-	-	-
<i>P. frequentans</i>	+	-	-	-
<i>P. citrinum</i>	+	-	-	-
<i>Rhizopus</i> sp	+	-	+	-
+ = Produção		- = Não produção de aflatoxina		

DAVIS e DIENER (1966) observaram que grandes quantidades de aflatoxina foram obtidas em 15 dias, a 20°C. A mesma quantidade foi produzida em apenas 11 dias, à temperatura de 30° C.

DAVIS e DIENER (1968) demonstraram que *A. parasiticus* não se desenvolve em meio contendo ribose ou xilose a 20% e 2% de extrato de leveduras, quando os dois compostos são autoclavados juntos. O *A. flavus* é pobre produtor e não produz a aflatoxina em compostos associados com ácido cítrico (DAVIS e DIENER, 1968).

Vários compostos nitrogenados influem na produção de aflatoxina. A capacidade de produção em nitrogênio orgânico depende aparentemente da linhagem utilizada ou da composição do meio. Entretanto, grandes quantidades tem sido produzidas em meio que contém licor de milho, uma mistura de ácido casamínico, extrato de leveduras ou peptona (DAVIS e col. 1967).

ELDRIDGE (1964) estudou o efeito de várias vitaminas no desenvolvimento e produção de aflatoxina. Tiamina e biotina, adicionadas ao Czapek líquido, ocasionaram um aumento na produção de **aflatoxina**.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Linhagens utilizadas

As linhagens de *Aspergillus flavus*, utilizadas no presente estudo, foram gentilmente cedidas pelos professores Dr. Homero Fonseca e Dr. Alcides Martinelli Filho, do Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Piracicaba SP. As linhagens foram caracterizadas segundo um critério de letras e números e também quanto à produção de aflatoxina no meio de cultura e no micélio. As letras maiúsculas representam o grupo coletado; o número em seguida, a amostra coletada; e a letra minúscula distingue as diversas colônias conseguidas no isolamento de cada amostra. Assim sendo, as seguintes linhagens foram usadas:

A₅^a - Originária de amendoim em casca, úmido, oriundo de Santa Adélia (SP)

A₆^e - Originária de amendoim descascado, ensacado, oriundo de Santa Adélia (SP)

B₂^d - Originária de amendoim em casca, ensacado, oriundo de Santa Adélia (SP)

Com relação à produção de aflatoxina, a Tabela 2, abaixo ilustra cada uma dessas linhagens. A produção é dada em partes por milhão (ppm) de aflatoxina B₁, no micélio e no meio de cultura.

TABELA 2. Produção de Aflatoxina B₁, em ppm no micélio e no meio de cultura por linhagens de *A. flavus*

Linhagem	Produção de Aflatoxina B ₁ em ppm	
	Micélio	Meio de Cultura
A ₅ ^a	0,00	0,15
A ₆ ^e	0,00	0,00
B ₂ ^d	11,38	6,00

3.2 - Meios de cultura e soluções utilizadas

3.2.1 - Meio mínimo (PONTECORVO e col. 1953) (MM)

NaNO ₃	6,00 g
KH ₂ PO ₄	1,50 g
KCl	0,50 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,50 g
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Glicose	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1,0 l

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

3.2.2 - Meio completo (PONTECORVO e col. 1953) (MC)

Este meio foi preparado adicionando-se ao meio mínimo as seguintes substâncias:

Peptona	2,00 g
Caseína Hidrolisada	1,50 g
Extrato de leveduras	0,50 g
Solução de vitaminas	1,00 ml
Ácido nucleico de leveduras	2,50 ml

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

3.2.3 - Meio mínimo mais 2% de meio completo

Adicionou-se ao meio mínimo, 2% de meio completo; distribuiu-se 2,5 ml por tubo e esses tubos foram conservados em refrigerador após autoclavagem.

3.2.4 - Meio "YES" (DAVIS e col. 1966)

Extrato de leveduras	2%
Sacarose	20%
Água desmineralizada	1 litro

Autoclavagem a 1 atm durante 15 minutos

3.2.5 - Solução salina

Preparou-se uma solução de cloreto de sódio 0,89%, dissolvendo-se o sal em água destilada. Nove mililitros da solução foram colocados em cada frasco e autoclavou-se em seguida.

3.2.6 - Solução de tween 80

Adicionou-se tween 80 a água destilada, numa concentração de 0,1% (v/v) e 2,5 ml da solução foram colocados

em tubos de ensaio que foram autoclavados e, a seguir, conser
vados em refrigerador.

3.2.7 - Solução de p-fluorofenilalanina (pFA).

Obteve-se a solução utilizada (1%), dissolvendo-se pFA em água destilada. A mesma foi esterilizada em banho maria, por 15 minutos, e conservada em refrigerador a 4°C.

3.2.8 - Solução de vitaminas

Ácido nicotínico	100,0 mg
Ácido <u>p</u> -aminobenzoíco	10,0 mg
Aneurina	50,0 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Água destilada	100,0 ml

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

3.2.9 - Solução de caseína hidrolisada

Cem miligramas de caseína hidrolisada foram co
locadas em frasco contendo 10 ml de H₂O destilada, sendo esta

esterilizada em banho-maria, por 15 minutos. A seguir colo
cou-se em frasco escuro e conservou-se em refrigerador.

3.2.10 - Hidrolisado de ácido nucléico de leveduras

Ácido nucléico de leveduras (Oxoid)
2 gramas em 15 ml de solução normal de ácido clorídrico
Ácido nucléico de leveduras (Oxoid) 2 gramas em
15 ml de solução de hidróxido de sódio

Ambas as soluções foram aquecidas por 20 minutos, a
100°C e em seguida, misturadas. Ajustou-se o pH para 6,0,
filtrando-se em seguida. O volume foi completado para 40
ml e guardou-se a preparação em refrigerador, sob clorofórmio.

3.2.11 - Suplementos adicionados ao meio mínimo

Substâncias	Concentração
Ácido p-aminobenzóico	50 µg/ml
Adenina	50 µg/ml
Arginina	50 µg/ml
Lisina	50 µg/ml
Prolina	50 µg/ml

3.2.12 - Solução de albumina (ROBINOW e CATEN, 1969).

A solução de albumina foi obtida adicionando-se 5% de clara de ovo a água destilada esterilizada. Manteve-se a solução no refrigerador, em frasco escuro.

3.2.13 - Solução de álcool etílico

Estas soluções foram utilizadas para a hidratação do material, nas seguintes concentrações: 50%, 70% e 95%. Realizou-se a diluição com água destilada.

3.2.14 - Solução de ácido acético glacial

A solução foi preparada utilizando-se álcool absoluto, ácido acético glacial e ácido láctico na proporção de 6:1:1 respectivamente.

3.2.15 - Fixador HCl

Preparou-se o fixador, utilizando-se 82,5 ml de HCl (Densidade 1,19) em 1.000 ml de H₂O, em balão volumétrico.

3.2.16 - Tampão fosfato

KH_2PO_4	0,60 g
NaHPO_4	2,80 g
Água destilada	1.000 ml

Após a preparação, a solução foi mantida em refrigerador.

3.2.17 - Solução de Giemsa

Dissolveu-se 1 grama de Giemsa em 54 ml de glicerina, a quente; após esfriamento, foram adicionados 84 ml de metanol (P.A.), filtrou-se e aqueceu-se em banho-maria. A seguir, a solução foi mantida em frascos.

3.3 - Crescimento das linhagens em meio mínimo e em meio completo (PONTECORVO e col. 1953).

Devido à necessidade de utilizar-se um meio de composição definida para estudos genéticos, inicialmente avaliou-se o crescimento das diferentes linhagens, utilizadas no presente trabalho, com relação ao seu desenvolvimento nestes meios MM e MC. O crescimento foi comparado em relação ao diâmetro da colônia, após três dias de desenvolvimento, à temperatura de 28°C.

3.4 - Curva de sobrevivência

Conídios da linhagem A₅a selvagem foram transferidos para solução de tween 80, estimando-se o número de conídios por mililitro através de hematímetro, ao microscópio. Em seguida, a suspensão de conídios foi diluída em solução salina (1:10), colocando-se esta em placa de Pitri esterilizada, e efetuou-se a irradiação com luz ultravioleta, em diferentes tempos. Após cada irradiação e após diluições apropriadas, semeou-se 0,1 ml por placa com meio completo. As placas foram incubadas a 28°C e, após três dias, procedeu-se à contagem do número de colônias. Considerando-se a diluição realizada, calculou-se a porcentagem de sobrevivência em relação à suspensão não irradiada.

3.5 - Obtenção dos mutantes auxotróficos

Conídios das linhagens A₅a, A₆e e B₂d, com cinco dias de desenvolvimento, foram transferidos separadamente para tubos de ensaio contendo solução de tween 80. Em seguida contou-se o número destes em hematímetro, procurando-se obter uma concentração de aproximadamente 10⁷ conídios por mililitro.

As suspensões de conídios foram diluídas (1:10) em solução salina e irradiadas (UV), durante três minutos e quarenta e dois segundos,

As suspensões irradiadas foram diluídas e, dessa diluição, semeou-se 0,1 ml por placa de Petri, contendo MC. A seguir, as placas foram incubadas a 28°C, por três dias. Após esse tempo, conídios das várias colônias foram transferidos para placas de Petri, sendo inoculados na distribuição 5 X 5 mais 1, em meio completo (AZEVEDO, OLIVEIRA e ROCHA CAMPOS, 1977). Após o desenvolvimento das novas colônias, essas foram replicadas para placas de Petri contendo meio mínimo e novamente incubadas a 28°C. Assim, as colônias que não se desenvolveram neste meio foram consideradas possíveis mutantes. Cortando-se o ágar sobre o qual os conídios foram inoculados, transferiam-se os blocos obtidos para tubos inclinados contendo meio completo. Assim, conseguiam-se novos conídios para ensaio das deficiências nutricionais.

Os conídios obtidos foram suspensos em tubos contendo solução de tween 80, e semeou-se uma alíquota de 0,2 ml desta suspensão bem densa por "pour plate", para 20 ml de meio mínimo, ainda líquido, à temperatura de 45°C. Transferiu-se o conteúdo dos tubos para placas de Petri, que foram a seguir incubadas a 28°C. Após 24 horas, gotas de solução de caseína hidrolisada, vitaminas, extrato de leveduras e ácido nucléico, foram distribuídas cuidadosamente em diferentes locais das placas e estas foram novamente incubadas. Após 72 horas, um crescimento ao redor destas soluções caracterizava a deficiência do mutante e, posteriormente, ensaiou-se cada aminoácido, vitaminas e bases nitrogenadas, procurando-

se a caracterização do mutante.

Assim foram obtidos os mutantes simples. Nova irradiação desses mutantes possibilitou a obtenção de mutantes duplos, seguindo-se a mesma técnica descrita anteriormente, com adição, no entanto, da substância requerida, ao meio mínimo.

3.6 - Técnicas de análise genética

As técnicas de análise genética foram as utilizadas para obtenção do ciclo parassexual em fungos, descritas por PONTECORVO e col. (1953), nas quais constam: obtenção de heterocário e de diplóides, recombinação mitótica e haploidização.

3.6.1 - Obtenção heterocário.

Conídios das linhagens que se diferenciavam quanto à produção de aflatoxina, à morfologia e às marcas nutricionais, foram colocados em tubos de ensaio contendo 2,5 ml de meio mínimo líquido, suplementado com 2% de meio completo, o que permite uma pequena germinação dos conídios.

Depois de três dias de incubação, formou-se uma película na superfície do meio, devido à fusão de hifas, pela deficiência nutricional das mesmas. Transferiu-se a película

para placa contendo meio mínimo sólido, originando-se então setores heterocarióticos, pois somente estes poderiam se desenvolver, por apresentarem núcleos diferentes, que se complementam em suas hifas.

3.6.2 - Obtenção de diplóides

Conídios dos setores heterocarióticos (vide item 3.6.1) foram ressuspensos em solução de tween 80 e, posteriormente, semeados em meio mínimo. Obteve-se, assim colônias que se desenvolvem neste meio e que são possíveis diplóides.

3.6.3 - Haploidização de diplóides

A haploidização foi feita utilizando-se meio (MM) contendo os requisistos nutricionais das linhagens que entraram no cruzamento mais 0,007% de p-fluorofenilalanina. (MORPURGO, 1961 ; LHOAS, 1961).

A p-fluorofenilalanina (pF_A) é um análogo da fenilalanina, o qual tem a propriedade de evidenciar o crescimento de setores haplóides que surgem como segregantes da linhagem diplóide.

3.6.4 - Teste de reversão

Todas as linhagens mutantes auxotróficas utilizadas foram ensaiadas para reversão das marcas nutricionais. Para tal, utilizou-se meio mínimo e meio suplementado com o requisito nutricional da linhagem, quando se tratava de um mutante simples; e com as combinações apropriadas de requisitos, quando se tratava de mutante duplo. O crescimento neste meio possibilitou o cálculo da frequência de reversão para as diferentes marcas. Assim, conídios das linhagens foram suspensos em solução de tween 80 e semeados em placas preparadas conforme descrito acima.

3.7 - Observação do número de núcleos nas linhagens selvagens, mutantes e diplóides.

Com o objetivo de se verificar o número de núcleos em conídios destas diferentes linhagens, coletaram-se conídios das mesmas, com 72 horas de crescimento, em lâmina com uma gota de solução de albumina 5%. Após a secagem, os conídios foram fixados, durante 10 minutos, em solução fixadora de álcool absoluto, ácido acético glacial e ácido láctico (6:1:1). Em seguida, fez-se hidratação em álcool em diferentes concentrações, a saber: 95%, 70%, 50% e em água destilada. A seguir, o material sofreu hidrólise em HCl 1 N, durante 5 minutos, à temperatura ambiente; e durante 6 minutos, à temperatura de

62°C, em banho-maria com temperatura controlada. Logo após o material foi lavado cinco vezes em água tamponada (Tampão-fosfato pH 7), corado por 15 minutos em Giemsa (10 ml de tampão-fosfato para 18 gotas de solução de Giemsa) e observado ao microscópio. Os núcleos, após esse tratamento, aparecem com coloração avermelhado-azulado. Esta técnica foi proposta por: PAES DE BARROS, (1977).

3:8 - Intervalo de confiança para as porcentagens do número de núcleos por conídios de *A. flavus*.

Após a coloração dos núcleos dos conídios das diferentes linhagens de *A. flavus*, fez-se a contagem do número destes. Em cada lâmina, eram considerados quatro campos, contando-se o número de conídios uninucleados, binucleados, trinucleados e tetranucleados. Finalmente, obteve-se um número total de conídios com os diferentes números de núcleos e calculou-se a porcentagem de cada tipo. Foi calculado também o limite de confiança para todos os casos estudados. O cálculo foi feito segundo a fórmula abaixo:

$$p = \frac{\hat{m} + t^2 / 2 + t \sqrt{\hat{\sigma}^2 + (t/2)^2}}{n + t^2}$$

onde: \hat{m} - número de casos favoráveis $t = 1,96$,

$\hat{\sigma}^2$ - variância em face a $nq = m \cdot q$.

O valor obtido por esta formula, multiplicado por 100, dá o valor em porcentagem, dos limites de confiança para cada proporção.

3.9 - Avaliação da produção de aflatoxina em linhagens selvagens, mutantes, diplóides e segregantes haplóides

A verificação da produção de aflatoxina foi feita em cultura líquida, utilizando-se meio "YES" (DAVIS, 1966). Conídios das diferentes linhagens, bem como dos diferentes diplóides, foram transferidos para meio "YES", em frasco de 250 ml (50 ml de meio por frasco). Utilizaram-se três repetições para cada amostra e todas foram incubadas a 28°C, por 7 dias.

3.9.1 - Extração da aflatoxina

3.9.1.1 - Micélio

Após 7 dias de desenvolvimento em meio "YES", formou-se densa massa micelial sobre a superfície do meio. Essa foi retirada e colocada sobre papel de filtro Whatman n° 1, para eliminação do meio residual no micélio. Em seguida, pesou-se e passou-se o mesmo cuidadosamente para balão extrator de Soxhlet refluxado com 50 ml de acetona a 70%, durante uma ho-

ra e trinta minutos. A seguir, passou-se o solvente para funil de separação de 250 ml, lavando-se o balão extrator com 20 ml de acetona 70%. Fez-se a extração da toxina com duas porções de 25 ml, às quais se adicionou Na_2SO_4 anidro, para posterior cromatografia. Esta metodologia foi proposta por FONSECA e col. (1974).

3.9.1.2 - Meio de Cultura

O meio de cultura foi filtrado em Buchner sobre papel de filtro Whatman nº 1, a vácuo de trompa d'água, sendo recebido em kitasato. Em seguida, tomou-se alíquotas de 10 ml deste meio e transferiu-se para balão de separação de 250 ml, sobre o qual adicionaram-se 25 ml de clorofórmio. Após boa agitação manual, colocou-se para decantação e separação das fases. A fase inferior foi recebida em frasco com sulfato de sódio anidro para retenção da água. Após a filtração, recebeu-se este líquido em frasco escuro para posterior cromatografia (FONSECA e col, 1974).

3.9.1.3 - Preparação das cromatoplasmas

As placas cromatográficas foram preparadas com 80 ml de água destilada e 40 gramas de sílica gel G-Sthal-Merck.

Fez-se a distribuição sobre as placas de vidro de 20 cm X 10 cm, com auxílio de espalhador manual, ficando a camada com 500 micras de espessura. Após a preparação, as placas foram ativadas em estufa, à temperatura de 100°C, durante 1 hora. Posteriormente, as placas foram colocadas em dessecador e aí mantidas por 24 horas, antes de serem utilizadas.

3.9.1.4 - Determinação quantitativa da aflatoxina

Sobre placas de sílica gel de 500 micras, previamente preparadas, foram colocadas, a 2 cm da margem, alíquotas de 2,5 e 15 microlitros das soluções obtidas. Logo após, as placas foram colocadas em cubas contendo solvente (Benzeno, Acetato de Etila e Etanol), na proporção de 30:19:1, conforme FONSECA e col. (1974), separando-se as aflatoxinas dos grupos B e G. Para cada observação, foram efetuadas três corridas até 10 cm do ponto de aplicação. Em seguida, as placas foram retiradas secas, com auxílio de secador de cabelos, e levadas para serem lidas em luz ultravioleta de 365 nm de emissão máxima, 125 watts, marca Philips. A distância da placa à luz foi de 30 cm (COOMES e FEUELL, 1965). Foram realizadas três determinações para cada linhagem. As amostras que se apresentavam com fluorescência em até 2,5 ul, foram diluídas e posteriormente cromatografadas e as que não apresentavam fluorescência nessa diluição eram concentradas e novamente cromatografadas.

A fórmula utilizada para determinação da quantidade de aflatoxina foi a seguinte:

$$\text{ppm de aflatoxina } B_1 = \frac{0,4 \cdot D}{P \times V}$$

Onde:

D = Diluição da amostra

P = Peso da amostra ou quantidade em litros da amostra

V = Volume da menor alíquota em que foi vista fluorescência

O valor 0,4 é decorrente do fato de que, nas condições estabelecidas para esta determinação por COOMES e FEUILL (1965), a menor quantidade de aflatoxina B_1 em que pode ser observada fluorescência na placa é de 0,0004 microgramas.

Todas as determinações foram feitas juntamente com padrão de aflatoxina, cedidos pelo Dr. Homero Fonseca, do Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ-USP-Piracicaba).

4 - RESULTADOS OBTIDOS

4.1 - Teste de crescimento das linhagens de *A. flavus* em meio mínimo (M) e meio completo (MC) PONTECORVO e col (1953).

Placas de Petri contendo meio mínimo e meio completo foram inoculadas com conídios das diferentes linhagens e incubadas a 28°C, durante 72 horas. Após este tempo, pode-se observar que o crescimento, avaliado em relação ao diâmetro, foi o mesmo, tanto no meio completo como no meio mínimo, para as linhagens estudadas.

4.2 - Curva de sobrevivência

Uma suspensão de conídios da linhagem A₅^a selvagem de *A. flavus* foi irradiada em diferentes tempos, à luz ultravioleta (UV) 2537 Å. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3. Porcentagem de conídios de *A. flavus*, sobreviventes a UV. (2537 Å)

Tempo de Irradiação (UV) em minutos	Nº de Conídios por ml	% Sobreviventes
0	1,22 X 10 ⁶	100,00
1/2	1,44 X 10 ⁶	94,00
1	3,99 X 10 ⁵	33,00
2	9,60 X 10 ⁴	8,00
4	9,00 X 10 ³	0,80
8	4,00 X 10 ²	0,04

Com os dados da Tabela 3, construiu-se uma curva de sobrevivência em escala semilogarítmica, conforme mostra a Figura 1.

4.3 - Obtenção dos mutantes

Após a obtenção da curva de sobrevivência, irradiou-se a suspensão de conídios das linhagens A₅^a, A₆^e e B₂^d, durante 3,42 minutos, o que possibilitou a obtenção dos seguintes mu-

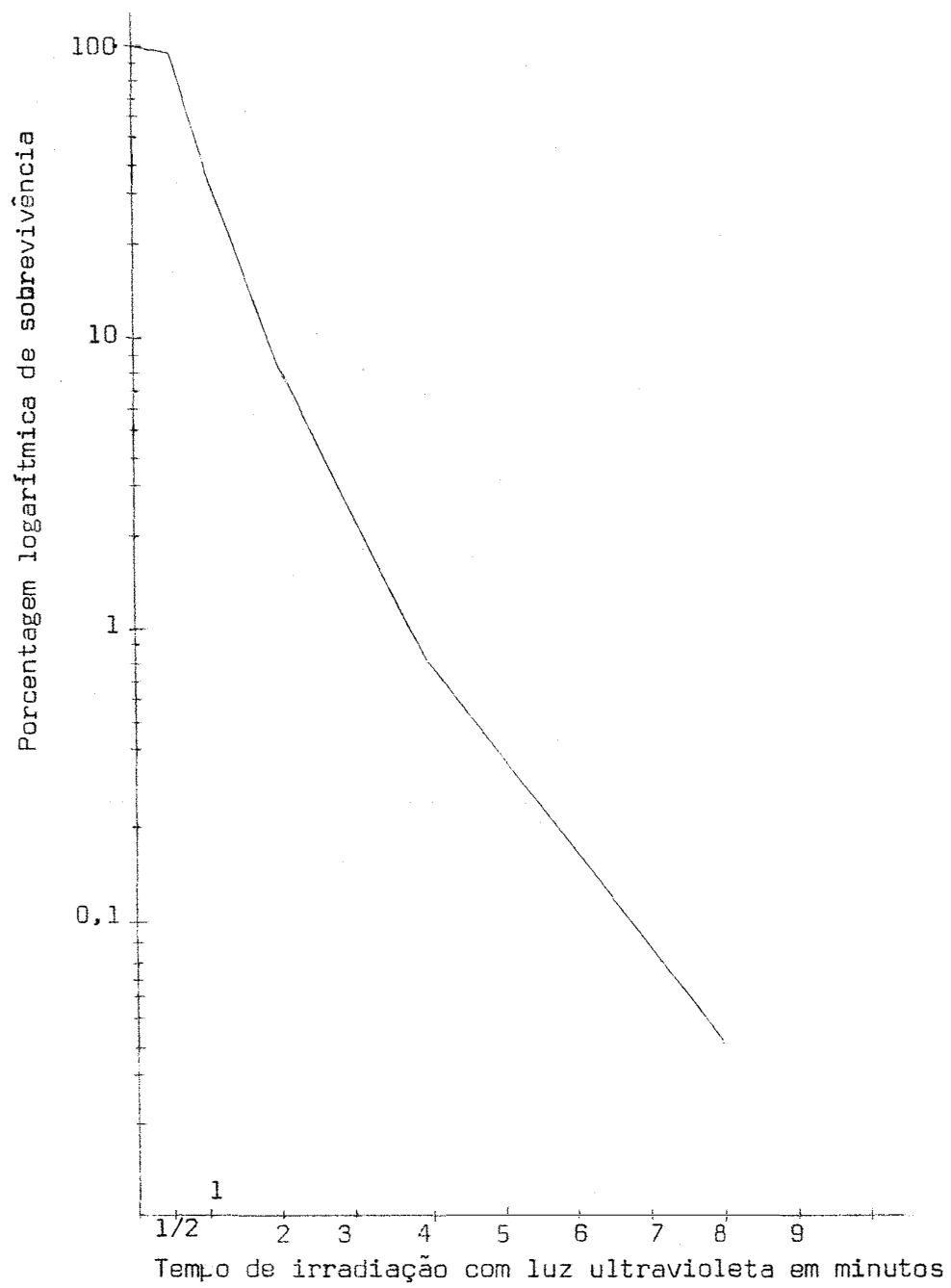


Fig. 1 - Curva de sobrevivência, *A. flavus* à luz ultravioleta

tantes simples mostrados na Tabela 4.

TABELA 4. Mutantes simples de *A. flavus*, obtidos por irradiação de luz UV

Linhagem Original		MUTAÇÃO	
Irradiada	Morfológica	Nutricional	Símbolo
A ₅ ^a	Branco	-	<u>W</u>
A ₆ ^e	-	adenina	<u>ade</u>
A ₆ ^e	-	prolina	<u>pro</u>
B ₂ ^d	-	lisina	<u>lys</u>

Nova irradiação destes mutantes simples permitiu a obtenção de alguns duplos mutantes, conforme indica a Tabela 5.

TABELA 5. Duplos mutantes de *A. flavus*, obtidos por irradiação à luz UV

Mutante Simples	Morfológico	Duplo Mutante De ficiência Nutricional	Símbolo
A ₅ ^a <u>w</u>	-	arginina	<u>arg</u>
A ₆ ^e <u>pro</u>	-	ác. -p-aminobenzoico	<u>pab</u>
B ₂ ^d <u>lys</u>	amarelo	-	<u>y</u>

Para melhor visualização, a Tabela 6 mostra a representação destes mutantes, que será empregada na descrição do trabalho. Na Figura 2, estão os passos seguidos para obtenção deste mutantes.

TABELA 6. Representação dos mutantes de *A. flavus*, utilizada no presente trabalho

Mutantes	Representação
A ₅ ^a arginina branco	A ₅ ^a <u>arg</u> <u>w</u>
A ₆ ^e adenina	A ₆ ^e <u>ade</u>
A ₆ ^e prolina ác.p-aminobenzóico	A ₆ ^e <u>pro</u> <u>pab</u>
B ₂ ^d lisina amarelo	B ₂ ^d <u>lys</u> <u>y</u>

4.3.1 - Teste de reversão

Os mutantes foram ensaiados para verificação da estabilidade destes, para que pudessem ser utilizados com devida segurança nas análises genéticas. Testou-se a frequência de reversão espontânea para os mesmos, e os resultados são apresentados na Tabela 7.

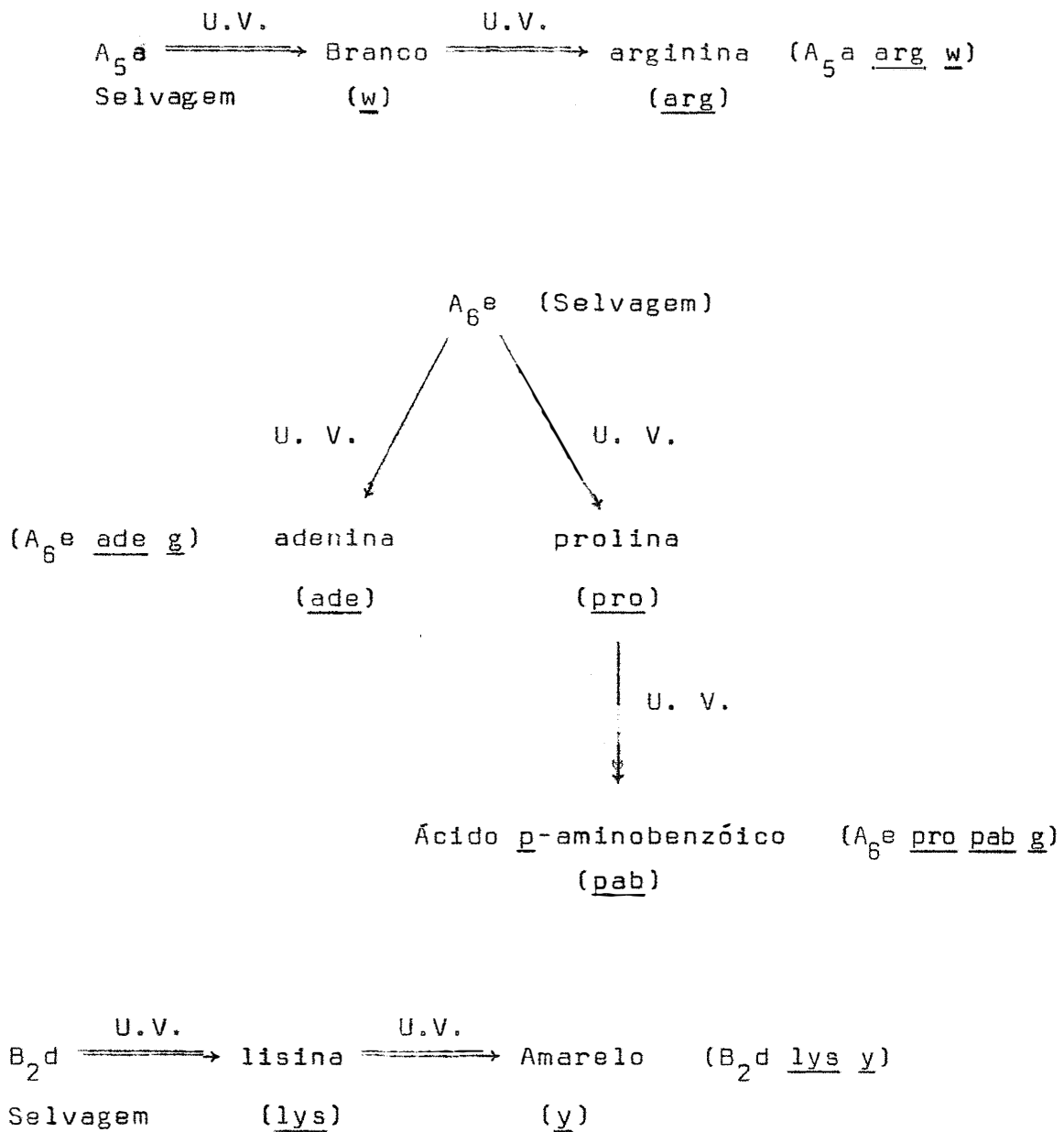


Fig. 2 - Obtenção dos mutantes de *A. flavus*, à luz ultra-violeta

TABELA 7. Frequência de reversão espontânea de diferentes mutantes de *A. flavus*

Mutantes	Frequência de Mutantes em 10^6 conídios
A ₅ a <u>arg w</u>	< 1
A ₆ e <u>pro pab</u>	< 1
A ₆ e <u>ade</u>	< 1
B ₂ d <u>lys y</u>	< 50
B ₂ d <u>lys</u>	< 1

Nota-se pela Tabela 7, que quatro dos cinco mutantes apresentaram baixa frequência de reversão, enquanto que um dos mutantes (B₂d lys y) apresentou uma frequência de mutação espontânea de 50 mutantes, em 10^6 conídios testados. Assim sendo, o mutante B₂d lys y apresentou uma frequência de reversão espontânea maior que o mutante B₂d lys.

4.4 - Análise genética

A obtenção dos mutantes propiciou a obtenção de heterocáries. Após se desenvolverem em meio mínimo, proporcionaram a obtenção de diplóides, que foram haploidizados. Os resultados desses passos seguem-se abaixo.

4.4.1 - Obtenção do heterocário

Os heterocários dos diferentes mutantes, conforme descrito no item 4.3, foram obtidos entre as seguintes linhagens mutantes: A_5 a arg w X B_2 d lys y ; A_6 e pro pab X B_2 d lys y ; A_6 e ade X B_2 d lys y ; A_6 e pro pab X A_5 a arg w ; A_6 e pro pab X A_6 e ade. Foi observado, na formação destes heterocários, que a constituição das películas que eram transferidas para o meio mínimo, variou quanto à consistência. Na Tabela 8, estão indicados esses resultados.

TABELA 8. Formação de heterocários entre diferentes linhagens de *A. flavus*

Cruzamento	Constituição da Película
A_5 a <u>arg</u> <u>w</u> / B_2 d <u>lys</u> <u>y</u>	+
A_6 e <u>pro</u> <u>pab</u> / B_2 d <u>lys</u> <u>y</u>	+
A_6 e <u>ade</u> / B_2 d <u>lys</u> <u>y</u>	+
A_6 e <u>pro</u> <u>pab</u> / A_5 a <u>arg</u> <u>w</u>	+
A_6 e <u>ade</u> / A_6 e <u>pro</u> <u>pab</u> g	+

+ = Película muito bem formada + = Película fina

4.4.2 - Obtenção de diplóides

Confídios dos heterocários obtidos dos diferentes cruzamentos possibilitaram a obtenção dos seguintes diplóides con

forme a Tabela 9.

TABELA 9. Diplóides obtidos entre diferentes linhagens de *A. flavus*.

Heterocário	Diplóides
A ₅ ^a <u>arg</u> <u>w</u> / B ₂ ^d <u>lys</u> <u>y</u>	(<u>arg</u> + <u>w</u>) (<u>+</u> <u>lys</u> <u>y</u>)
A ₆ ^e <u>pro</u> <u>pab</u> / B ₂ ^d <u>lys</u> <u>y</u>	(<u>pro</u> <u>pab</u> + <u>g</u>) (<u>+</u> <u>+</u> <u>lys</u> <u>y</u>)
A ₆ ^e <u>ade</u> <u>g</u> / B ₂ ^d <u>lys</u> <u>y</u>	(<u>ade</u> + <u>g</u>) (<u>+</u> <u>lys</u> <u>y</u>)
A ₅ ^a <u>arg</u> <u>w</u> / A ₆ ^e <u>pro</u> <u>pab</u> <u>g</u>	(<u>arg</u> + <u>+</u> <u>w</u>) (<u>+</u> <u>pro</u> <u>pab</u> <u>g</u>)
A ₆ ^e <u>ade</u> <u>g</u> / A ₆ ^e <u>pro</u> <u>pab</u> <u>g</u>	(<u>ade</u> + <u>+</u> <u>g</u>) (<u>+</u> <u>pro</u> <u>pab</u> <u>g</u>)

Todos os diplóides obtidos apresentaram coloração verde e eram prototróficos. No início, os conídios do diplóide entre as linhagens A₅^a arg w e B₂^d lys y, apresentavam-se com coloração amarela, passando a verde muito mais tardiamente que os outros.

Os diplóides foram purificados e mantidos em meio mínimo.

4.4.3 - Haploidização dos diplóides

A utilização de p-fluorofenilalanina (pFA), permitiu a obtenção de setores haplóides, que foram purificados. A análise destes segregantes permitiu a construção da Tabela 10,

que mostra a constituição dos diferentes segregantes haplóides obtidos.

TABELA 10. Segregantes haplóides de diferentes diplóides heterozigotos de *A. flavus*.

Diplóide	Genótipo	Segregantes		
		Branco ,	Amarelo ,	Verde ,
<u>(arg + w) (+ lys y)</u>	<u>arg lys</u>	0	0	0
	<u>arg +</u>	0	0	0
	<u>+ lys</u>	0	0	1
	<u>+ +</u>	0	0	1
<u>(pro pab + g) (+ + lys y)</u>	<u>pro pab lys</u>	0	0	0
	<u>pro pab +</u>	0	0	0
	<u>pro + +</u>	0	0	0
	<u>+ + +</u>	0	0	1
	<u>pro + lys</u>	0	0	1
	<u>+ + lys</u>	0	0	0
	<u>+ pab lys</u>	0	0	0
	<u>+ pab +</u>	0	0	0

Para os demais diplóides não foi possível a obtenção de segregantes haplóides.

4.5 - Contagem do número de núcleos nas linhagens mutantes, diplóides e selvagens de *A. flavus*

Com a técnica descrita no item 3.7, observou-se os diferentes tipos de conídios, caracterizados pelo número de núcleo. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

TABELA 11. Número de núcleos em conídios de *A. flavus*

Linhagem	Número de Núcleos por Conídios			
	1	2	3	4
Selvagens				
A ₅ ^a	+	+	+	+
A ₆ ^e	+	+	+	+
B ₂ ^d	+	+	+	-

Mutantes				
A ₅ ^a <u>arg w</u>	+	+	+	+
A ₆ ^e <u>ade</u>	+	+	+	-
A ₆ ^e <u>pro pab</u>	+	+	+	-
B ₂ ^d <u>lys y</u>	+	+	+	-

Diplóides				
(<u>arg + w</u>)(<u>+ lys y</u>)	+	+	+	+
(<u>pro pab + g</u>)(<u>+ + lys y</u>)	+	+	+	+
(<u>ade + g</u>)(<u>+ lys y</u>)	+	+	-	-
(<u>ade + + g</u>)(<u>+ pro pab g</u>)	+	+	-	-

Os dados em porcentagem, referente aos diversos tipos de conídios são apresentados na Tabela 12.

TABELA 12. Porcentagem de conídios de *A. flavus* com diferentes números de núcleos

Linhagens	Porcentagem de Conídios				Número Conídios
	Uni- cleados	Bini- cleados	Tri- cleados	Tetra- cleados	
Mutantes					
A ₅ a <u>arg w</u>	27,71	59,52	11,90	0,87	462
A ₆ e <u>ade g</u>	40,51	57,38	2,11	0,00	237
A ₆ e <u>pro pab g</u>	35,17	68,30	1,48	0,00	472
B ₂ d <u>lys y</u>	24,85	52,07	23,08	0,00	169
Diplóides					
(<u>arg + + w</u>) (<u>+ pro pab g</u>)	95,22	4,78	0,00	0,00	335
(<u>arg + w</u>) (<u>+ lys y</u>)	17,65	54,90	26,14	1,31	153
(<u>pro pab + g</u>) (<u>+ + lys y</u>)	21,61	52,76	24,62	2,01	199
(<u>ade + g</u>) (<u>+ lys g</u>)	53,33	46,67	0,00	0,00	90
(<u>ade + + g</u>) (<u>+ pro pab - g</u>)	98,74	1,26	0,00	0,00	239

Com os dados constantes na Tabela 12, calculou-se o limite de confiança para a porcentagem do número de núcleos por conídios, conforme a fórmula do item 3.8, encontrando-se os resultados na Tabela 13.

TABELA 13. Limite de confiança para a porcentagem do número de núcleos por conídios em mutantes e diplóides de *A. flavus*

Linhagem	Nº Conídios estudados	Porcentagem			
		Uninucleado	Binucleado	Trinucleado	Tetra nucleado
Mutantes					
A ₅ ^a <u>arg w</u>	462	23,82	54,99	9,26	0,34
		<u>27,71</u>	<u>59,52</u>	<u>11,90</u>	<u>0,87</u>
		31,96	63,90	15,18	2,20
A ₆ ^e <u>pro pab g</u>	472	30,99	58,90	0,72	-
		<u>35,17</u>	<u>68,30</u>	<u>1,48</u>	-
		39,58	67,57	3,02	-
A ₆ ^e <u>ade g</u>	237	34,46	51,01	0,90	-
		<u>40,51</u>	<u>57,38</u>	<u>2,11</u>	-
		46,86	63,51	4,84	-
B ₂ ^d <u>lys y</u>	169	18,94	44,57	17,36	-
		<u>24,85</u>	<u>52,07</u>	<u>23,08</u>	-
		31,88	59,47	29,98	-
Diplóides					
<u>(arg + w)(+ pro pab g)</u>	239	92,38	2,96	-	-
		<u>95,22</u>	<u>4,78</u>	-	-
		97,04	7,62	-	-
<u>(arg + w)(+ lys y)</u>	153	12,42	46,99	19,83	0,36
		<u>17,65</u>	<u>54,90</u>	<u>26,14</u>	<u>1,31</u>
		24,46	62,60	33,63	4,64
<u>(pro pab + g)(+ lys y)</u>	199	16,46	45,84	18,25	0,78
		<u>21,61</u>	<u>52,76</u>	<u>24,62</u>	<u>2,01</u>
		27,83	59,58	29,98	5,05
<u>(ade + g)(+ lys y)</u>	90	43,10	36,71	-	-
		<u>53,33</u>	<u>46,67</u>	-	-
		63,33	46,67	-	-
<u>(ade + + g) (+ pro pab g)</u>	239	96,37	0,43	-	-
		<u>98,74</u>	<u>1,26</u>	-	-
		99,38	3,62	-	-

Pela Tabela 13, verifica-se que existe uma variação bem distinta entre os tipos de conídios e, por outro lado, que a grande maioria se enquadra dentro da categoria de unicleados e binucleados, sendo as outras condições bastante reduzidas.

Os diplóides apresentam-se com tendência para conídios uninucleados, apesar de que, para os diplóides (arg + w) (lys + y) e (pro pab + g) (lys + + w) ocorre um aumento da porcentagem em torno da condição binucleada.

4.6 - Produção de aflatoxina B₁ no micélio e no meio de cultura das linhagens selvagens, mutantes, diplóides e segregantes haplóides

A produção de aflatoxina B₁ no micélio e no meio de cultura das linhagens selvagens, mutantes, diplóides e segregantes haplóides foi avaliada em termos de B₁ em ppm. Os resultados obtidos estão nas Tabelas 14 , 15 , 16 e 17.

TABELA 14. Produção de aflatoxina B₁, em ppm, pelas linhagens selvagens de *A. flavus*

Linhagem	Produção de Aflatoxina B ₁ em ppm			
	Micélio	Média	Meio de Cultura	Média
A ₅ ^a	(n.d.)	-	(0,1 - 0,2)	0,15
A ₆ ^e	(n.d.)	-	(n.d.)	-
B ₂ ^d	(7,38 - 14,78)	(11,08)	(4,0 - 8,0)	6,00

n.d. = não detectável

TABELA 15. Produção de aflatoxina B₁ em ppm pelas linhagens mutantes de *A. flavus*

Linhagem	Produção de aflatoxina B ₁ em ppm			
	Micélio	Média	Meio de Cultura	Média
A ₅ ^a <u>arg w</u>	(n.d.)	-	(n.d.)	-
A ₆ ^e <u>ade g</u>	(0,15 - 0,30)	(0,23)	(0,20 - 0,40)	0,30
A ₆ ^e <u>pro pab g</u>	(n.d.)	-	(0,13 - 0,26)	0,19
B ₂ ^d <u>lys y</u>	(13,44 - 26,89)	(20,16)	(2,0 - 4,0)	3,00

TABELA 16. Produção de aflatoxina B₁ em ppm para diferentes diplóides de *A. flavus*

Diplóide	Aflatoxina B ₁ em ppm			
	Micélio	Média	Meio de Cultura	Média
(<u>arg</u> + <u>w</u>)(+ <u>lys</u> <u>y</u>)	(13,97-28,21)	21,09	(4,0-8,0)	6,0
(<u>pro pab</u> + <u>g</u>)(++ <u>lys</u> <u>y</u>)	(7,64-15,27)	(11,46)	(2,0-4,0)	3,0
(<u>ade</u> + <u>g</u>)(+ <u>lys</u> <u>y</u>)	(6,66-13,32)	(9,99)	(2,0-4,0)	3,0
(<u>pro pab</u> + <u>g</u>)(++ <u>arg</u> <u>y</u>)	(n.d.)	-	(0,13-0,27)	0,2
(<u>pro pab</u> + <u>g</u>)(++ <u>ade</u> <u>g</u>)	(n.d.)	-	(n.d.)	-

n.d = Quantidade não detectável ou não produção de aflatoxina.

TABELA 17 - Produção de aflatoxina B₁ em ppm para diferentes segregantes haplóides de *A. flavus*

Diplóide	Segregante	Aflatoxina b ₁ em ppm		
		Micélio	Média	Meio de Cultura
(arg <u>+</u> w)(<u>+</u> <u>lys</u> y)	+ <u>lys</u>	(n.d.)	-	(n.d.)
	+ <u>+</u>	(n.d.)	-	(0,13 - 0,27)
(pro <u>peb</u> + g)(<u>+</u> <u>+</u> <u>lys</u> y)	+ <u>+</u> <u>+</u>	(11,38 - 22,76)	(17,07)	(4,0 - 8,0)
	<u>prob</u> + <u>lys</u>	(n.d.)	-	(n.d.)
				0,20
				6,0
				-

n.d. = Quantidade não detectável ou não produção de aflatoxina

5. - DISCUSSÃO

5.1 - Sobrevivência de *A. flavus* à luz ultravioleta

Os dados apresentados na Tabela 3 e na Figura 1 mostram, como era de se esperar, que, com o aumento do tempo de irradiação, a porcentagem de sobreviventes decresce. A queda de sobrevivência revelou, no entanto, que, com pequenas doses de irradiação, o decréscimo foi menor do que se esperaria, se os conídios de *A. flavus* fossem todos uninucleados. Pode-se dizer, portanto, que a linhagem usada tem conídios com mais de um núcleo, o que foi confirmado por posterior análise citológica (item 4,5). De fato, YUILL (1953) verificou que o *A. flavus*, apresenta conídios binucleados o que também foi confirmado por PAPA e LEAICH (1973). Uma vez que essa parece ser

uma característica geral da espécie, a curva de sobrevivência, embora feita apenas para uma das linhagens empregadas no presente trabalho (A_5a), foi extrapolada para as outras linhagens usadas (A_6e e B_2d).

Pela curva de sobrevivência, foi estabelecido um LD_{95} como sendo aquele correspondente ao tempo de 3,42 minutos, que foi então o utilizado na obtenção de mutantes, uma vez que, como salienta BURNETT (1975), essa é a porcentagem de sobrevivência que oferece maiores possibilidades de mutações gênicas.

5.2 - Mutantes obtidos

Através de uso da luz ultravioleta como agente mutagênico, foram obtidos mutantes morfológicos (conídios brancos e conídios amarelos), e auxotróficos. Dentre os auxotróficos, ocorrem deficiências para aminoácidos (lisina, arginina, e prolina), purinas (adenina) e vitaminas (ácido p-aminobenzóico). Todas as linhagens foram capazes de produzir mutantes. O número de mutantes obtidos foi de cerca de um para cada 350 colônias analisadas. O número de mutantes obtidos pela técnica de isolamento total, usado no caso, é inferior ao obtido pela mesma técnica, em outra espécie de *Aspergillus*, o *A. nidulans* (PONTECORVO e col. 1953), na qual se obtém um mutante em cada 200 colônias, após irradiação com UV. Isso seria de se esperar, uma vez que, em *A. nidulans*, os conídios são uninucleados,

exeto em um caso estudado (PIZZIRANI, 1977). Sendo o *A. flavus* portador de conídios não apenas uninucleados, mas também binucleados, trinucleados e até tetranucleados, mutantes induzidos em núcleos desses conídios serão mascarados pelo alelo selvagem do outro núcleo, com diminuição, portanto, da frequência de mutantes induzidos. Pode-se sugerir, então, que em futuros trabalhos de obtenção de mutantes em *A. flavus*, técnicas seletivas poderão ser utilizadas com mais vantagem. Técnicas como a da filtração ou da "Starvation", entre outras (FINCHAN e DAY, 1973), seriam talvez de utilidade na obtenção de mutantes auxotróficos em *A. flavus* PAPA (1976), utilizando técnica de isolamento total e réplica, obteve mutantes para aminoácidos (prolina, leucina, isoleucina/valina, lisina, metionina e arginina), vitaminas (tiamina, biotina, ácido-p-aminobenzoico, piridoxina e ácido nicotínico) e purinas (adenina). Pelo mesmo processo, mutantes morfológicos também foram isolados para coloração de conídios, tais como branco (w), oliva (tan) castanho e amarelo. Estes mutantes possibilitaram que o autor estudasse os grupos de ligação neste fungo. Assim, ele propôs um número de sete grupos de ligação, mas acredita que este número possa ser igual ao número de grupos de ligação existentes em *A. nidulans* ou *A. niger*, que contêm oito e seis grupos de ligação respectivamente.

Alguns mutantes, obtidos por nós (arg⁻ e pro⁻), estão sendo submetidos a uma análise bioquímica mais detalhada. Através de meio suplementado com precursores da arginina, veri-

ficou-se que o mutante pro⁻ não cresce em ácido glutâmico e cresce em prolina, citrulina, ornitina e arginina, enquanto que o mutante arg⁻ não cresce em ácido glutâmico, prolina ou ornitina e cresce em citrulina e arginina. Esses dados mostram que esses dois mutantes são diferentes e indicam que está ocorrendo um bloqueio metabólico diverso em cada caso. Esses dados são diferentes dos obtidos em *A. nidulans* (PONTECORVO e col. 1953), não sendo a citrulina utilizada como intermediário da síntese da arginina nesse último fungo.

No teste de reversão (Tabela 7), verificou-se que quatro das cinco linhagens utilizadas não mostram reversão, em 10^6 cófídios usados. Uma delas, no entanto, (B_2d lys y) teve alta frequência de reversão espontânea (da ordem de 1 em 10^4) - 10^5 cófídios). Isso indica que na linhagem B_2d lys y, a reversão do gene lys é mais frequente que na linhagem B_2d lys. Isso pode ser devido ou à indução de um outro mutante, quando foi obtida a linhagem B_2d lys y a partir de B_2d lys, ou então devido a um efeito do próprio gene y sobre a reversão do gene lys.

Os resultados da Tabela 7 indicam, no entanto, que essas linhagens podem ser utilizadas com sucesso nos próximos passos da análise genética, sem interferência de uma alta frequência de reversão.

5.3 - Análise genética

5.3.1 - Heterocários

Nos cinco cruzamentos realizados, heterocários foram obtidos, embora em um dos casos a película se apresentasse com constituição muito fina (Tabela 8). Em todos os casos, a transferência de película para MM produziu crescimento.

PAPA (1973) também conseguiu heterocário entre mutantes da linhagem PC 7, isolada de pecan, não verificando incompatibilidade entre os mesmos. No presente trabalho, as três linhagens usadas apresentam-se compatíveis, pois formaram heterocário em todas as combinações possíveis.

5.3.2 - Diplóides

Diplóides foram isolados de todos os heterocários obtidos (Tabela 9). Poder-se-ia pensar que esse fungo, tendo conídios multinucleados, e se esses núcleos fossem de constituição gênica diferente em um mesmo conídio, isso permitiria sua germinação e crescimento em MM. No entanto, nesse caso, a linhagem seria instável, pois esse binucleado daria baixa viabilidade em subseqüentes subculturas para MM. Como, no presente caso, os possíveis diplóides foram sempre de bom crescimento em MM, é de se supor que realmente eles sejam $2N$ e não $N+N$.

PAPA e LEAICH (1975) propuseram que, em *A. flavus*, uma maneira pela qual se pode analisar os conídios para verificação do diplóide, seria através da condição uninucleada destes. Esses autores analisaram 500 cadeias de conídios e observaram uma porcentagem média de 0,04% de cadeias binucleadas por conidióforo. No presente estudo, esta particularidade foi evidenciada somente para o diplóide constituído dentro da mesma linhagem (A_6 e pro pab e A_6 e ade), que teve uma porcentagem de 98,74% de conídios uninucleados para 1,26% de conídios binucleados. Para os demais diplóides, este número variou (Tabela 12), mas deve-se salientar que estes são diplóides obtidos entre diferentes linhagens. A comparação entre o número de núcleos de diplóides e o número de núcleos de haplóides de *A. flavus* talvez seja um processo que permita distinguir diplóides nesse fungo, uma vez que o volume do conídio de *A. flavus* não pode ser utilizado para avaliação do estado diplóide, como acontece em outras espécies de *Aspergillus*, como no *A. nidulans*, onde o conídio diplóide tem volume maior que o haplóide (PONTECORVO e col. 1953).

5.3.3 - Haploidização

A (Tabela 10) mostra que, mesmo com pFA, poucos segregantes nos dois diplóides utilizados foram obtidos, indicando o estado heterozigoto dos diplóides originais. De fato, PA-

PA (1973), utilizando pFA , pode realizar com sucesso haploidização de certos genótipos. Por outro lado, observou que determinados genótipos tem aviabilidade reduzida. Obteve uma baixa frequência de recombinação entre genes de um mesmo grupo de ligação (0,0 a 0,08%) , o que reflete uma pequena ocorrência de permuta mitótica.

5.4 - Análise do número de núcleos em linhagens originais, mutantes e diplóides

5.4.1 - Selvagens

Duas linhagens selvagens analisadas apresentam-se com conídios uninucleados, binucleados, trinucleados e tetranucleados, apresentando a terceira o máximo de três núcleos por conídio. PAPA (1973) verificou em *A. flavus* um número máximo de três núcleos por conídios. Pela primeira vez, portanto, foi detectado, em *A. flavus* , conídios tetranucleados. No entanto, a análise de núcleos em conídios de linhagens mutantes revelou que somente o mutante A_5 a arg w continha conídios tetranucleados.

Para os diplóides, houve alteração no número de núcleos por conídio e, por exemplo, no diplóide (arg + w) (+ lys y), foram encontrados conídios com até quatro núcleos. Nota-

se pela Tabela 11, que existe grande variação em relação ao número de núcleos por conídios e que somente houve redução acentuada para o diplóide constituído dentro da mesma linhagem.

Os dados obtidos não mostram relação entre as marcas nutricionais e o número de núcleos.

Parace existir uma tendência dos diplóides para serem uninucleados e binucleados, como pode ser observado na Tabela 13. Marcas nutricionais podem influir, mas deve existir uma interação bastante complexa para o caráter número de núcleos.

5.5 - Produção de aflatoxina

As três linhagens usadas, diferem na produção de aflatoxina. A₅a não produz praticamente aflatoxina no meio de cultura e produz pequena quantidade de aflatoxina extraída do micélio; A₆e não produz aflatoxina e B₂d produz quantidade elevada em micélio e em meio de cultura.

A produção variou nas diferentes linhagens (mutantes, diplóides e segregantes haplóides) e essa variação não exhibe relação com alterações devidas a marcas nutricionais, indicando que o caráter deva ser complexo, possivelmente regido por vários genes.

Estudos com relação à produção de antibióticos em *Penicillium chrysogenum*, citados por SERMONTI (1969), que utilizou os próprios dados, bem como os de MacDONALD e col. (1953),

concluem que, como regra, há diminuição na produção de penicilina, existindo alguns auxotróficos que parecem não exibir efeitos, e outros que mostram pequenos aumentos na produção. Assim, "mutantes deficientes para vitaminas quase não afetam a produção de penicilina, e, às vezes, aumentam-na; já os auxotróficos para síntese de adenina bloqueiam quase que totalmente a produção de antibiótico, enquanto que os deficientes para aminoácidos afetam de modo intermediário, a produção, em relação aos efeitos mostrados pelas outras deficiências.

POLSINELLI e col (1953), estudando mutantes auxotróficos com relação a síntese de actinomicina, em *Streptomyces antibioticus*, verificaram que apenas mutações que afetam vias biossintéticas, cujos produtos são necessários para a síntese desse antibiótico, diminuem sua produção. Interpretaram estes resultados como sendo uma utilização diferente dos reservatórios de aminoácidos exógenos e endógenos pela célula.

PAPA (1977) obteve um mutante para maior produção de aflatoxina B₂, isolando um mutante morfológico e auxotrófico para a síntese de biotina e de piridoxina, com o mutagenico químico nitrosoguanidina.

Devido a esta complexidade para a produção de aflatoxina obtida no presente trabalho, pode ser sugerido que futuros trabalhos, seguindo a mesma linha de pesquisa, utilizem uma única linhagem, isolando-se mutantes para produção de aflatoxina, juntamente com marca nutricionais. Dessa maneira, pode-

rão ser estudados os genes envolvidos na produção dessa toxina.

5.5.1 - Segregantes

Pelos dados apresentados na Tabela 17, verifica-se u ma grande divergência na produção de aflatoxina pelos segregantes obtidos a partir de linhagens diplóides. Isso vem mostrar, mais uma vez, que o caráter de produção de aflatoxina é complexo considerando-se principalmente, que os diplóides foram sintetizados entre diferentes linhagens. Para que o caráter produção de aflatoxina seja melhor estudado, deve ser feito um estudo a partir de uma única linhagem. A partir dela, seriam obtidos mutantes para produção de aflatoxina e, assim, a linhagem seria isogênica, exceto para um gene principal envolvido na produção dessa toxina. O isolamento de diplóides e de segregantes, poderiam então elucidar alguns aspectos genéticos da produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus*.

6 - RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi realizado com a finalidade de se estudar aspectos relacionados com o ciclo parassexual e com a produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus*.

Para isso, foram usadas três linhagens de *A. flavus*, isoladas de amendoim (A_{5a}, A_{6e} e B_{2d}), e foram obtidos mutantes auxotróficos e morfológicos. Procedeu-se à análise genética, utilizando-se o ciclo parassexual (heterocário, diplóides e segregantes haplóides). Determinou-se o número de núcleos em conídios, bem como a produção de aflatoxina das linhagens originais, diplóides, segregantes e mutantes.

Pelos resultados obtidos, as seguintes conclusões podem ser tiradas:

- a) Puderam ser obtidos mutantes pelo emprego de luz ultravioleta. Foram obtidos, com sucesso, mutantes morfológicos e auxotróficos (aminoácidos, vitaminas e purinas).

- b) Foram obtidos heterocários entre linhagens de diferentes origens, o que indica serem elas compatíveis. Também puderam ser obtidos diplóides entre linhagens diferentes.
- c) O número de núcleos presentes em conídios foi variado, aparecendo conídios com até quatro núcleos. Em diplóides, existe uma tendência para a ocorrência de conídios uninucleados e binucleados.
- d) O caráter produção de aflatoxina em *A. flavus*, revelou ser complexo e, possivelmente, muitos genes devem estar envolvidos.

7 - SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present work was carried out aiming the study of aspects related to the parasexual cycle and aflatoxin production in *Aspergillus flavus*. Three strains of *A. flavus* isolated from peanuts (A₅a , A₆e and B₂d) were used. Auxotrophic and morphological mutants were obtained. Genetic analysis was carried out through the parasexual cycle (heterokaryon, diploids and haploid segregants). The nuclei number of conidia was determined as well the aflatoxin production of original, mutant, diploid and segregant strains.

From the obtained results the following conclusions can be drawn:

- a - Mutants can be obtained by the use of ultraviolet light. Auxotrophic (Aminoacids, vitamins and purine mutants) and morphological mutants were obtained.

- b - Heterokaryons ~~were~~ obtained between strain of different origins which indicate that they are compatible. Diploids were also obtained between such strains.
- c - The number of nuclei present in conidia varied. Conidia with four nuclei were obtained. In diploids there is a tendency towards uninucleate and binucleated conidia.
- d - The production of aflatoxin in *A. flavus* is a complex character, possibly due to several genes.

8 - LITERATURA CITADA

- AZEVEDO, J. L., A. OLIVEIRA e A. J. ROCHA CAMPOS, 1976. Replicador Multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos - Summa Phytopathologica, 2: 237 - 241.
- BURNETT, J. H. 1975. Mycogenetics. John Wiley and Sons, London, 375 p.
- COONER, R. C., K. SARGENT e R. YEO. 1963. Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus oryzae* on sterilized peanuts. Biotechnology and Bioengineering, 5: 185 - 192.
- COOMES, T. J. e A. J. FEUELL, 1965. Recommended procedures for the detection and estimation of aflatoxin B₁ in groundnuts and groundnut materials. Tropical Products Institute, Report G 13, Londres.
- DAVIS, N. D., U. L. DIENER e D. W. ELDRIDGE. 1966. Production of aflatoxin B₁ and G₁ by *Aspergillus flavus* in semi syntetic medium. Applied Microbiology, 14: 378-380.

- DAVIS, N. D., U. L. DIENER e V. P. AGNIHOTRI; 1967.
Production of Aflatoxins B₁ and G₁ in chemically defined medium. Mycopathology et Micology Applicata, 31: 251 - 256.
- DAVIS, N. O. e U. L. DIENER, 1968. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* from various carbon sources. Applied Microbiology, 16: 158 - 160.
- DIENER, L. U. e N. O. DAVIS, 1969. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. In L. A. GOLDBLATT, Aflatoxin Cap. II - Academic Press, New York, London, 472. p.
- DONKERSLOOT, J. A., R. I. MATELES e S. S. YOUNG, 1972.
Isolation of "averufin" from a mutant of *Aspergillus parasiticus* impaired in aflatoxin biosynthesis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 47: 1051 . 1055.
- ELDRIDGE, D. W, 1964. Nutricional factors influencing the synthesis of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus*. Apud L. U. DIENER e D. N. DAVIS, 1969. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. In L. A. GOLDBLATT, Aflatoxin Cap. II Academic Press, New York, London, 472 p.
- FINCHAN, J. R. S. e P. R. DAY, 1971. Fungal Genetics. Blackweel Sci. Pbl. Oxford 3^a edição.
- FONSECA, H., A. MARTINELLI FILHO, H. DEL NERY e E. RONCATTO; 1974. Espécies de *Aspergillus* produtoras de Aflatoxina, na Região Araraquarense, SP. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 31: 519 - 536 .

GOLDBLATT, L. A., 1969. Aflatoxin. Food Science and Technology a series of monographs. Academic Press. New York, London, 472 p.

IKEDA, Y., C. ISHITANI e K. NAKAMURA, 1957. A high frequency of heterozygous diploids and somatic recombination induced in imperfect fungi by ultraviolet light. The Journal General Applied Microbiology, 3: 1 - 11.

IKEDA, Y., K. NAKAMURA, K. UCHIDA e C. ISHITANI, 1957. Two Attempts upon improving an industrial strain of *Aspergillus oryzae* through somatic recombination and polyploidization. The Journal General Applied Microbiology, 3: 93 - 101.

LEAICH, L. L. e K. E. PAPA, 1974. Aflatoxins in mutants of *Aspergillus flavus*. Mycopathologia et Mycologia Applicata, 52: 223 - 229.

LEAICH, L. L. e K. E. PAPA, 1975. Identification of diploids of *Aspergillus flavus* by the nuclear condition of conidia. Mycologia, 67: 674 - 678.

LEE, L. S., J. W. BENNETT, L. A. GOLDBLATT e R. E. LUNDIN, 1971. Norsolorinic acid from a mutant strain of *Aspergillus parasiticus*. Journal American Oil Chemistry Society, 48: 93 - 94.

LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with p-fluorophenylalanine. Nature. London, 190: 744.

- MACDONALD, K. O., J. M. HUTCHINSON e W. A. GILLET, 1963.
Isolation of auxotrophs of *Penicillium chrysogenum* and
their penicillin yields. Journal General Microbiology,
33: 365 - 374.
- MATELES, R. I. e J. C. ADYE, 1965. Production of aflatoxins
in submerged culture. Applied Microbiology, 13: 192 -
198.
- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregations induced by p-
fluorophenylalanine. *Aspergillus newsletter*, 2: 10.
- NESBITT, B. F., J. O. KELLY, K. SARGENT e A. SHERIDAN, 1962.
Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature,
195: 1062 - 1063.
- PAES DE BARROS, J., 1977. Análise Citogenética de Algumas
linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Disserta-
ção apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz
de Queiroz" - USP, para obtenção do título de Mestre em Ge-
nética e Melhoramento de Plantas. 81 p.
- PAPA, K. E., 1973. The Parasexual cycle in *Aspergillus*
flavus Mycologia, 65: 1201 - 1205.
- PAPA, K. E., 1977. Mutant of *Aspergillus flavus* producing
more aflatoxin B₂ than B₁. Applied and Environmental
Microbiology, 33: 206
- PAPA, K. E. e L. L. LEAICH, 1973. Parasexual analysis of
aflatoxin B₁ production in *Aspergillus flavus*. Genetics,
74: 208.

- PIZZIRANI, A. A., 1977. Características, propriedades estabilização de dissomícos em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" para obtenção do título de Mestre. 111 p. Piracicaba - SP.
- POLSINELLI, M. A., ALBERTINI, G. CASSANI e O. CIFERRI, 1963. Relation of biochemical mutations to actinomycin synthesis in *Streptomyces antibioticus*. Journal of General Microbiology 33: 238 - 246 .
- PONTECORVO, G. e ROPER, J. A., 1952. Genetics analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. Proceeding Journal Genetics Microbiology, 6: abstract.
- PONTECORVO, G., J. A. ROPER, L. M. HEMMONS, K. D. MACDONALD e A. W. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, 5: 141 - 238 .
- RAPER, K. B. e D. I. FENNEL, 1969. The Genus Aspergillus.
- ROBINOW, C. F. e C. E. CATEN, 1969. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. Journal of Cell Science, 5: 403 - 431.
- SARGENT, K., A. SHERIDAN, J. O. KELLY e R. B. A. CARNAGHAN, 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature, 192: 1096 - 1097.
- SERMONTI, G. 1969. Genetics of antibiotic producing microorganisms. John Wiley e Sons Ltda. London, 398 p.
- YUILL, E., 1950. The numbers of nuclei in conidia of *Aspergilli*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 33: 324 - 331.

9 - APÊNDICE

TABELA A.1. Leitura das cromatoplaças com luz ultravioleta: extratos originários de meio de cultura, de linhagens selvagens e mutantes haplóides.

Linhagem	Concentração (C) ou diluição (D) da amostra	Alíquotas em μ l				
		2,5	2,0	10,0	15,0	20,0
Selvagens						
A ₅ ^a	s/d	-	-	-	-	+
	s/d	-	-	-	-	+
	s/d	-	-	-	-	+
A ₆ ^e	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
B ₂ ^d	1:100	-	+	+	+	+
	1:100	-	+	+	+	+
	1:100	-	+	+	+	+
Mutantes						
A ₅ ^a <u>arg w</u>	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
A ₆ ^e <u>ade g</u>	5 X C	-	-	+	+	+
	5 X C	-	-	+	+	+
	5 X C	-	-	+	+	+
A ₆ ^e <u>pro pab g</u>	5 X C	-	-	-	+	+
	5 X C	-	-	-	+	+
	5 X C	-	-	-	+	+
B ₂ ^d <u>lys y</u>	1:100	-	+	+	+	+
	1:100	-	+	+	+	+
	1:100	-	+	+	+	+

+ = Presença de fluorescência azul da aflatoxina B₁.
- = Ausência de fluorescência.

TABELA A.2. Leitura das cromatoplaça com luz ultravioleta: extratos originários de meio de cultura, de diferentes diplóides

Linhagem	(1)	Alíquota em μ l				
		' 2,5	' 5,0	' 10,0	' 15,0	' 20,0
Diplóides						
<u>(arg + w)(+ lys y)</u>	1:100	-	+	+	+	+
	1:100	-	+	+	+	+
	1:100	-	+	+	+	+
<u>(pro pab + g)(++ lys y)</u>	1:100	-	+	+	+	+
	1:100	-	+	+	+	+
	1:100	-	+	+	+	+
<u>(ade + g)(+ lys y)</u>	1:10	-	-	+	+	+
	1:10	-	-	+	+	+
	1:10	-	-	+	+	+
<u>(pro pab + g)(++ arg w)</u>	5 X C	-	-	-	+	+
	5 X C	-	-	-	+	+
	5 X C	-	-	-	+	+
<u>(pro pab + g)(++ ade g)</u>	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-

+ " Presença de fluorescência azul da aflatoxina B₁.

- = Ausência de fluorescência.

(1) Concentração (C) ou diluição (D) da amostra.

TABELA A23. Leitura das cromatoplaças com luz ultravioleta; extratos originários de meio de cultura, de diferentes segregantes haplóides

Linhagem	Concentração (C) ou diluição (D) da amostra	Alíquotas μ l				
		2,5	5,0	10,0	15,0	20,0
<u>+ lys</u>	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
<u>+ +</u>	5 X C	-	-	-	+	+
	5 X C	-	-	-	+	+
	5 X C	-	-	-	+	+
<u>+ + +</u>	1:100	-	+	+	+	+
	1:100	-	+	+	+	+
	1:100	-	+	+	+	+
<u>pro + pab</u>	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-

+ = Presença de fluorescência azul da aflatoxina B₁.

- = Ausência de fluorescência.

TABELA A.4 Leitura das cromatoplaças com luz ultravioleta: extratos oriundos de micélio de linhagens, selvagens e mutantes haploides

Linhagem	Concentração (C) ou Diluição (D) da amostra	Alíquotas em μ l				
		2,5	5,0	10,0	15	20
A ₅ ^a	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
A ₆ ^e	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
B ₂ ^d	1:5 D	-	+	+	+	+
	1:5 D	-	+	+	+	+
	1:5 D	-	+	+	+	+
Mutantes						
A ₅ ^a <u>arg w</u>	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
A ₆ ^e <u>ade g</u>	5 X C	-	-	+	+	+
	5 X C	-	-	+	+	+
	5 X C	-	-	+	+	+
A ₆ ^e <u>pro pab g</u>	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
B ₂ ^d <u>lys y</u>	1:10D	-	+	+	+	+
	1:10D	-	+	+	+	+
	1:10D	-	+	+	+	+

+ = Presença de fluorescência azul da aflatoxina B₁.
- = Ausência de fluorescência.

TABELA A.5. Leitura das cromatoplaças com luz ultravioleta extratos oriundos de micélio de diplóides

Linhagem	(1)	Alíquotas em µl				
		2,5	5,0	10,0	15,0	20,0
<u>(lys + y)</u> (+arg <u>w</u>)	1:100	-	+	+	+	+
	1:100	-	+	+	+	+
	1:100	-	+	+	+	+
<u>(ade + g)</u> (+ <u>lys y</u>)	1:5 D	-	+	+	+	+
	1:5 D	-	+	+	+	+
	1:5 D	-	+	+	+	+
<u>(pro pab + g)</u> (+ + <u>lys y</u>)	1:5 D	-	+	+	+	+
	1:5 D	-	+	+	+	+
	1:5 D	-	+	+	+	+
<u>(pro pab + g)</u> (+ + <u>ade g</u>)	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
<u>(pro pab + g)</u> (+ + <u>arg w</u>)	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-
	5 X C	-	-	-	-	-

+ = Presença de fluorescência azul da aflatoxina B₁.

- = Ausência de fluorescência.

(1) = Concentração (C) ou Diluição (D) da amostra.

TABELA A.6. Leitura das cromatoplaças com luz ultravioleta:
de extratos oriundos de micélio de segregantes
haplóides

Segregante	(1)	Aliquotas em μ l				
		2,5	5,0	10,0	15,0	20,0
<u>+</u> <u>lys</u>	5 x C	-	-	-	-	-
	5 x C	-	-	-	-	-
	5 x C	-	-	-	-	-
<u>+</u> <u>+</u>	5 x C	-	-	-	-	-
	5 x C	-	-	-	-	-
	5 x C	-	-	-	-	-
<u>+</u> <u>+</u> <u>+</u>	1:100	-	+	+	+	+
	1:100	-	+	+	+	+
	1:100	-	+	+	+	+
<u>pro</u> <u>+</u> <u>lys</u>	5 x C	-	-	-	-	-
	5 x C	-	-	-	-	-
	5 x C	-	-	-	-	-

(+) = Presença de fluorescência azul da aflatoxina B₁

(-) = Ausência de fluorescência

(1) = Concentração (C) ou Diluição (D) da amostra

TABELA A.7. Peso do micélio das linhagens selvagens e mutantes haplóides, utilizados para extração de aflatoxina

Linhagem	Peso micélio em grama (g)
Selvagens	
A ₅ a	2,8075
	2,7650
	2,9088
A ₆ e	1,8750
	2,0150
	1,9350
B ₂ d	2,9050
	2,7050
	2,5350
Mutantes	
A ₅ a <u>arg</u> <u>w</u>	3,4650
	3,6477
	3,4503
A ₆ e <u>ade</u> <u>g</u>	2,5650
	2,4084
	2,8140
A ₅ e <u>pro</u> <u>pab</u> <u>g</u>	2,8350
	2,8550
	2,9120
B ₂ d <u>lys</u> <u>y</u>	3,1335
	3,0250
	2,7900

TABELA A.8. Peso do micélio de diferentes diplóides e segregantes haplóides.

Linhagem	Peso micélio em grama (g)
Diplóides	
<u>(arg + w)(+ lys y)</u>	2,7745 2,8385 2,8950
<u>(pro pab + g)(+ + lys y)</u>	2,7570 2,7350 2,3950
<u>(pro pab + g)(+ + arg w)</u>	3,3907 3,3050 3,0140
<u>(ade + g)(+ lys y)</u>	3,0339 2,8985 3,0785
<u>(pro pab + g)(+ + ade g)</u>	5,1200 5,0700 5,9700
Segregantes	
<u>+ lys</u>	3,2915 3,6350 2,1625
<u>+ +</u>	2,3780 2,8890 2,8963
<u>+ + +</u>	3,6615 3,4423 3,4513
<u>pro + lys</u>	3,4385 3,5420 3,2500

TABELA A.9 - Tipos de conídios de *A. flavus* e porcentagem dos diferentes tipos de conídios nas linhagens haplóides e diplóides.

Linhagem	Amos- tra	Unicleado		Binucleado		Trinucleado		Tetranucleado		Total
		Número	%	Número	%	Número	%	Número	%	
A_6 e <u>ade</u> (n)	I	25	48,08	26	50,00	1	1,92	0	0,00	52
	II	26	41,93	36	58,06	0	0,00	0	0,00	62
	III	17	27,00	49	72,06	2	2,94	0	0,00	68
	IV	28	50,91	25	45,45	2	3,64	0	0,00	55
			96	40,51	136	57,38	5	2,11	0	0,00
A_6 e <u>pro pab</u> (n)	I	43	29,86	95	65,97	6	4,17	0	0,00	144
	II	34	36,17	59	62,77	1	1,06	0	0,00	94
	III	42	36,84	72	63,16	0	0,00	0	0,00	114
	IV	47	39,17	73	60,83	0	0,00	0	0,00	120
			166	35,17	299	68,35	7	1,48	0	0,00
B_2^d <u>lys y</u>	I	9	30,00	12	40,00	9	30,00	0	0,00	30
	II	7	17,07	27	65,86	7	17,07	0	0,00	41
	III	6	15,67	17	47,22	13	35,11	0	0,00	36
	IV	20	32,26	32	51,61	10	16,13	0	0,00	62
			42	24,85	88	52,07	39	23,06	0	0,00
A_5^a <u>arg w</u> (n)	I	30	21,74	92	66,67	15	10,67	1	0,72	138
	II	54	41,86	59	45,74	14	10,65	2	1,55	129
	III	26	26,80	57	58,76	13	13,40	1	1,03	97
	IV	18	18,37	67	68,37	13	13,26	0	0,00	98
			128	27,71	275	59,52	55	11,90	4	0,87
		432	37,24	798	59,55	106	7,91	4	0,30	1.340
<u>(ade + g)</u> <u>(+ pro pab g)</u>	I	56	100,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	56
	II	53	100,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	53
	III	55	97,01	2	2,99	0	0,00	0	0,00	67
	IV	22	95,65	1	4,35	0	0,00	0	0,00	23
			236	98,74	3	1,26	0	0,00	0	0,00
<u>(ade + g)</u> <u>(+ lys y)</u>	I	12	57,14	9	42,86	0	0,00	0	0,00	21
	II	18	60,00	12	40,00	0	0,00	0	0,00	30
	III	11	64,71	6	35,29	0	0,00	0	0,00	17
	IV	7	31,82	15	68,18	0	0,00	0	0,00	22
			48	53,33	42	46,67	0	0,00	0	0,00
<u>(pro pab + g)</u> <u>(+ + lys y)</u>	I	6	19,35	18	58,06	5	16,13	2	6,45	31
	II	8	19,05	22	52,38	11	26,19	1	2,38	42
	III	19	22,35	47	55,29	19	22,35	0	0,00	85
	IV	10	24,39	18	43,90	12	29,27	1	2,44	41
			43	21,61	105	52,76	47	24,62	4	2,01
<u>(arg + w)</u> <u>(+ pro pab g)</u>	I	126	98,44	2	1,56	0	0,00	0	0,00	128
	II	61	90,00	9	10,00	0	0,00	0	0,00	90
	III	64	96,97	2	3,03	0	0,00	0	0,00	66
	IV	48	94,12	3	5,88	0	0,00	0	0,00	51
			319	95,22	16	4,78	0	0,00	0	0,00
<u>(arg + w)</u> <u>(+ lys y)</u>	I	8	19,05	23	54,76	11	25,19	0	0,00	42
	II	6	15,00	23	57,50	10	25,00	1	2,50	40
	III	5	14,29	20	57,14	9	25,71	1	2,86	35
	IV	8	22,22	18	50,00	10	27,78	0	0,00	36
			27	17,65	84	54,80	40	25,14	2	1,31
		673	65,24	250	24,61	87	8,56	6	0,59	1.016
		1.105	48,90	1.048	44,48	193	8,19	10	0,42	2.356

TABELA A.10. Resultado da análise dos setores haplóides do diplóide
 (arg + w)(+ lys y)

MM	MM + Tudo	MM + <u>arg</u>	MM + <u>lys</u>
-	+	-	+
+	+	+	+

TABELA A.11. Resultado da análise de setores haplóides do diplóide
 (pro pab + g)(+ + lys y)

MM	MM + Tudo	MM + <u>pro</u> <u>lys</u>	MM + <u>pro</u> <u>pab</u>	MM + <u>pab</u>	MM + <u>pro</u>	MM + <u>pab</u>	MM + <u>lys</u>
+	+	+	+	+	+	+	+
-	+	+	-	-	-	-	-