

RESISTÊNCIA À ARGININA EM LINHAGENS DEFICIENTES  
PARA A SÍNTESE DE LISINA EM *Aspergillus nidulans*

LAUDÉTE MARIA MACHADO BORDIGNON DE OLIVEIRA

Orientador: PROF. DR. 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 Microbiologia  
Agrícola.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Maio - 1978

Ao Professor

João Lúcio de Azevedo,

MINHA GRATIDÃO

Para

meus pais *Laudo e Ilda*  
e meu esposo *Paulo*

## AGRADECIMENTOS

*Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:*

- Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação, estímulo e amizade, durante toda a realização do presente trabalho e redação da tese;
- Ao Prof. Dr. Ernesto Paterniani, Diretor do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, pelas facilidades concedidas;
- Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela contribuição para a nossa formação científica;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro concedido, o qual possibilitou a execução deste trabalho;
- Aos meus pais Laudo e Ilda, ao meu esposo Paulo, pelo estímulo, amor e confiança que sempre me demonstraram;
- Aos Funcionários do Setor de Genética de Microrganismos, Srs. Antonio José Rocha Campos, Luiz Próspero, Rodolfo Fulini e Salvador Peixe, pela amizade e auxílio;
- Aos Amigos do Setor de Genética de Microrganismos e do Curso de Microbiologia Agrícola, pela constante amizade, apoio e colaboração;
- Ao Prof. Dr. José Octávio Machado, o "tio Zê", pela minha iniciação científica e estímulo constante;
- À Professora Maria Aparecida Freato Berti, pelo grande auxílio na correção do manuscrito.
- Às minhas amigas Aline A. Pizzirani, Eneida Assumpção e Júnia R. Brito pelo grande auxílio durante a impressão da tese.

## I N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO . . . . .	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. . . . .	03
2.1. Alguns aspectos sobre mutantes resistentes a drogas em <i>Aspergillus nidulans</i> . . . . .	03
2.2. Alguns aspectos sobre antagonismo e transporte de aminoácidos especialmente em <i>Aspergillus nidulans</i> . . . . .	12
3. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	17
3.1. Linhagens utilizadas. . . . .	17
3.1.1. Símbolos e fenótipos das linhagens utilizadas no presente trabalho . . . . .	19
3.2. Meios de cultura e soluções usadas. . . . .	19
3.2.1. Meio mínimo (MM) . . . . .	19
3.2.2. Meio completo (MC) . . . . .	20
3.2.3. Solução de vitaminas . . . . .	20
3.2.4. Solução de ácido nucleico de leveduras . . . . .	21
3.2.5. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo . . . . .	21
3.2.6. Meio mínimo de galactose . . . . .	21
3.2.7. Meio de acetato de amônio. . . . .	21
3.2.8. Solução salina . . . . .	22
3.2.9. Solução de tween . . . . .	22
3.2.10. Solução de p-fluorofenilalanina (pFA). . . . .	22
3.2.11. Solução de 1,4-dicloro-2,5-dimetoxil-benzeno (Cloroneb) . . . . .	22
3.2.12. Solução de arginina. . . . .	22
3.2.13. Solução de metano-sulfonato de etila (EMS) . . . . .	23
3.2.14. Solução de brometo de etídio (BE). . . . .	23
3.2.15. Soluções de lisina . . . . .	23
3.2.16. Suplementos adicionados ao meio mínimo . . . . .	23
3.2.17. Placas de análise . . . . .	24
3.2.18. Luz ultravioleta (UV). . . . .	24
3.3. Esterilização e incubação . . . . .	25

	<u>Página</u>
3.4. Ensaio das linhagens . . . . .	25
3.4.1. Purificação e teste da linhagem 118. . . . .	25
3.4.2. Determinação da resistência das linhagens. . . . .	26
a. Método de semeadura . . . . .	26
b. Método de inoculação por picada . . . . .	26
c. Método de inoculação por microcolônias. . . . .	26
3.4.3. Ensaio do nível de requisito para lisina.. . . .	27
3.5. Obtenção espontânea de mutantes resistentes à arginina . . . . .	27
3.6. Obtenção induzida de mutantes resistentes à arginina . . . . .	28
3.6.1. Tratamento com mutagênicos . . . . .	28
a. Tratamento com luz ultravioleta . . . . .	28
b. Tratamento com metano-sulfonato de etila . . . . .	29
c. Tratamento com brometo de etídeo. . . . .	29
c <sub>1</sub> . Determinação da concentração que resulta em 5 - 10% de sobrevivência. . . . .	29
c <sub>2</sub> . Determinação da sobrevivência das linhagens em diferentes tempos de tratamento . . . . .	29
3.7. Técnicas de análise genética. . . . .	30
a. Obtenção de heterocários . . . . .	30
b. Análise mitótica . . . . .	31
c. Análise meiótica . . . . .	31
3.8. Teste de heterocáριο. . . . .	33
3.9. Teste de alelismo . . . . .	34
3.10. Determinação da frequência de mutação . . . . .	34
a. Frequência de mutação após tratamento com luz ultravioleta . . . . .	34
b. Frequência de mutação após tratamento com metano-sulfonato de etila. . . . .	35
c. Frequência de mutação após tratamento com brometo de etídeo . . . . .	36
3.11. Ensaio das linhagens para determinação microbiológica de lisina . . . . .	36

	<u>Página</u>
4. RESULTADOS . . . . .	38
4.1. Ensaio das linhagens. . . . .	38
4.1.1. Purificação e teste da linhagem 118. . . . .	38
4.1.2. Resistência à arginina, nas linhagens 118. . . . .	39
4.1.3. Análises genéticas das linhagens 118 . . . . .	52
4.1.4. Ensaio do nível de requisito para lisina.. . . .	57
4.2. Obtenção espontânea de mutantes resistentes à arginina . . . . .	66
4.3. Obtenção induzida de mutantes resistentes à arginina . . . . .	67
4.3.1. Curvas de sobrevivência a mutagênicos. . . . .	67
a. Curvas de sobrevivência à luz ultravioleta . . . . .	67
b. Curvas de sobrevivência ao metano-sulfonato de etila . . . . .	70
c. Curvas de sobrevivência ao brometo de etídeo . . . . .	73
4.3.2. Seleção e ensaio de alguns mutantes induzidos por diferentes tratamentos mutagênicos . . . . .	77
4.4. Análise genética dos mutantes . . . . .	79
4.5. Teste de alelismo . . . . .	83
4.6. Teste de heterocário. . . . .	84
4.7. Frequência de mutação para resistência à arginina, após diferentes tratamentos mutagênicos . . . . .	85
4.8. Determinação microbiológica de lisina . . . . .	90
5. DISCUSSÃO . . . . .	94
5.1. Ensaio das linhagens 118 C e 118 M . . . . .	94
5.2. Obtenção de mutantes resistentes à arginina e sua análise genética. . . . .	97
5.3. O uso do sistema de resistência à arginina, em linhagens <i>lys<sup>-</sup></i> , para avaliação da potência de agentes mutagênicos . . . . .	100
5.4. O uso de linhagens <i>lys<sup>-</sup></i> , resistentes à arginina para dosagens microbiológicas de lisina . . . . .	101

	<u>Página</u>
6. RESUMO E CONCLUSÕES . . . . .	103
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS. . . . .	105
8. BIBLIOGRAFIA CITADA. . . . .	107



## LISTA DAS TABELAS

<u>Tabela</u>		<u>Página</u>
I	- Mutantes resistentes a drogas em <i>Aspergillus nidulans</i> . . . . .	11
II	- Médias dos tamanhos das colônias inoculadas por picada, em meio de cultura com concentrações crescentes de arginina, em 3 experimentos - Linhagem 118 M . . . . .	40
III	- Médias dos tamanhos das colônias inoculadas por picada, em meio de cultura com concentrações crescentes de arginina, em 3 experimentos - Linhagem 118 C . . . . .	40
IV	- Médias dos tamanhos das colônias crescidas em meio com concentrações crescentes de arginina e inoculadas pelo método de microcolônias, em 5 experimentos - Linhagem 118 M . . . . .	41
V	- Médias dos tamanhos das colônias crescidas em meio com concentrações crescentes de arginina, inoculadas pelo método de microcolônias, em 5 experimentos - Linhagem 118 C . . . . .	41
VI	- Médias e porcentagens relativas de conídios sobreviventes a concentrações crescentes de arginina, em 3 experimentos - Linhagem 118 M . . . . .	42
VII	- Médias e porcentagens relativas de conídios sobreviventes a concentrações crescentes de arginina, em 4 experimentos - Linhagem 118 C . . . . .	43
VIII	- Médias e porcentagens relativas de conídios sobreviventes a concentrações crescentes de arginina - Linhagem <i>proA<sub>1</sub> pabaA<sub>6</sub> yA<sub>2</sub></i> (controle) . . . . .	44
IX	- Análise meiótica da linhagem 118 M . . . . .	53
X	- Análise mitótica de linhagem 118 M . . . . .	54
XI	- Análise meiótica da linhagem 118 C . . . . .	55
XII	- Análise mitótica da linhagem 118 C . . . . .	56
XIII	- Diâmetros das colônias (cm) e porcentagens de crescimento da linhagem 118 C, em diferentes concentrações de lisina e após diferentes tempos de incubação . . . . .	58
XIV	- Diâmetros das colônias (cm) e porcentagens de crescimento da linhagem 118 M em diferentes concentrações de lisina após diferentes tempos de incubação . . . . .	59

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
XV - Diâmetros das colônias (cm) e porcentagem de crescimento de dois segregantes dos cruzamentos das linhagens originais com a MSE, frente a diferentes concentrações de lisina, após 3 dias de incubação . . . . .	60
XVI - Números e porcentagens relativas de conídios sobreviventes ao tratamento com ultravioleta para a linhagem 118 C . . . . .	68
XVII - Números e porcentagens relativas de conídios sobreviventes ao tratamento com ultravioleta para a linhagem 118 M . . . . .	68
XVIII - Números e porcentagens relativas de conídios sobreviventes ao tratamento com EMS para a linhagem 118 C . . . . .	71
XIX - Números e porcentagens relativas de conídios sobreviventes ao tratamento com EMS para a linhagem 118 M . . . . .	71
XX - Número de colônias viáveis, em diferentes concentrações de brometo de etídeo, para três linhagens	74
XXI - Números e porcentagens relativas de conídios sobreviventes ao tratamento com brometo de etídeo, para a linhagem 32 . . . . .	74
XXII - Números e porcentagens relativas de conídios sobreviventes ao tratamento com brometo de etídeo, para a linhagem 46 . . . . .	75
XXIII - Número de mutantes resistentes à arginina, coloração e auxotrofia para lisina; espontâneos ou induzidos por luz ultravioleta, metano-sulfonato de etila e brometo de etídeo . . . . .	78
XXIV - Análises mitóticas dos mutantes. . . . .	80
XXV - Análise meiótica dos mutantes . . . . .	81
XXVI - Análise mitótica e meiótica do mutante 6 . . . . .	82
XXVII - Títulos (conídios/ml) nos diferentes passos de quatro experimentos, para determinação do número de mutantes resistentes à arginina, após irradiação com luz ultravioleta para as duas linhagens.	87

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
XXVIII - Títulos (conídios/ml) nos diferentes passos de quatro experimentos, para determinação do número de mutantes resistentes à arginina, após tratamento com EMS para as duas linhagens . . . . .	88
XXIX - Títulos (conídios/ml) nos diferentes passos de quatro experimentos, para determinação do número de mutantes resistentes a arginina, após tratamento com B.E. para as duas linhagens . . . . .	88
XXX - Frequência de mutantes resistentes à arginina (em $10^6$ conídios), após tratamento com luz ultravioleta e metano-sulfonato de etila para a linhagem 118 C, e com brometo de etídeo para a linhagem 32..	89
XXXI - Frequência de mutantes resistentes à arginina (em $10^6$ conídios), após tratamento com luz ultravioleta e metano-sulfonato de etila para a linhagem 118 M, e com brometo de etídeo para a linhagem 46 . . . . .	89
XXXII - Raio das zonas de crescimento de duas linhagens em diferentes concentrações de lisina. . . . .	91
XXXIII - Raio das zonas de crescimento de duas linhagens em diferentes concentrações de lisina mais uma concentração constante de arginina . . . . .	91

## LISTA DAS FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
01 - Marcadores genéticos da linhagem MSE. . . . .	17
02 - Ascendência, marcadores e coloração das linhagens 118 C e 118 M . . . . .	39
03 - Tamanho da colônia em concentrações crescentes de arginina. Método: inoculação por picada - Linhagem 118 M . . . . .	45
04 - Tamanho da colônia em concentrações crescentes de arginina. Método: inoculação por picada - Linhagem 118 C . . . . .	46
05 - Tamanho da colônia em concentrações crescentes de arginina. Método: microcolônias - Linhagem 118 M ..	47
06 - Tamanho da colônia em concentrações crescentes de arginina. Método: microcolônias - Linhagem 118 C ..	48
07 - Comparação do método de inoculação por picada com o de microcolônias - Linhagem 118 M. . . . .	49
08 - Comparação do método de inoculação por picada com o de microcolônias - Linhagem 118 C. . . . .	50
09 - Curvas de sobrevivência a concentrações crescentes de arginina, para três linhagens . . . . .	51
10 - Porcentagem de crescimento das duas linhagens 118 C e 118 M, em diferentes concentrações de lisina, 3 dias após inoculação . . . . .	61
11 - Porcentagem de crescimento das duas linhagens 118 C e 118 M, em diferentes concentrações de lisina, 4 dias após inoculação . . . . .	62
12 - Porcentagem de crescimento das duas linhagens 118 C e 118 M, em diferentes concentrações de lisina, 5 dias após inoculação . . . . .	63
13 - Porcentagem de crescimento das duas linhagens 118 C e 118 M, em diferentes concentrações de lisina, 6 dias após inoculação. . . . .	64

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
14	- Porcentagem de crescimento de dois segregantes <i>lys</i> <sup>-</sup> , em três diferentes concentrações de lisina, após 3 dias de inoculação . . . . .	65
15	- Curvas de sobrevivência à irradiação ultravioleta para as duas linhagens: 118 C e 118 M . . . . .	69
16	- Curvas de sobrevivência ao tratamento com metano-sulfonato de etila para as linhagens 118 C e 118 M . . . . .	72
17	- Curvas de sobrevivência ao tratamento com brometo de etídeo, para as linhagens segregantes de 118 M e 118 C . . . . .	76
18	- Relação entre raio da zona de crescimento e concentração de lisina para a linhagem 118 C. . . . .	92
19	- Relação entre raio da zona de crescimento e concentração de lisina para o mutante 18 resistente à arginina com e sem adição de arginina ao meio de cultura . . . . .	93

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os principais tipos de mutantes utilizados em Genética de Microrganismos, salientam-se os que se distinguem por serem resistentes a agentes inibidores, enquanto que as linhagens, de onde eles se originaram, são sensíveis a estes agentes, em determinadas concentrações.

Em bactérias, por exemplo, mutantes resistentes a antibióticos ocupam papel de destaque, não só pela sua importância básica, como também pela aplicada.

Em fungos, resistência a agentes tóxicos tem sido usada como uma maneira de se obter uma variedade de mutantes com propriedades específicas, relacionadas a sistemas de transporte de metabólitos através da membrana celular, à regulação do metabolismo, à elucidação de caminhos biossintéticos e constituem também marcadores úteis para a seleção de segregantes, quando da análise genética, através do ciclo parassexual (CLUTTERBUCK, 1974).

Linhagens do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*, deficientes para a síntese de lisina, são muito sensíveis à presença de arginina no meio de cultura, comportando-se esta como inibidora do crescimento destas linhagens (PONTECORVO, 1949).

Um estudo preliminar sobre esta inibição e o isolamento de mutantes resistentes ao aminoácido arginina, foi desenvolvido (AZEVEDO e CAVENAGUE, 1968), verificando-se no caso que mutantes, mais resistentes que a linhagem original, podiam ser obtidos, tanto espontaneamente como induzidos por luz ultra-violeta.

O presente trabalho teve como objetivo principal ampliar esses estudos, através da obtenção de linhagens de *Aspergillus nidulans*, deficientes para a síntese de lisina, mas que fossem resistentes à arginina; além de realizar um mapeamento genético das mutações que conferem essa resistência.

Uma vez que vários genes parecem conferir resistência à arginina em linhagens deficientes para a síntese de lisina, esse sistema foi então ensaiado como possível indicador da potência de mutagênicos, à semelhança do que é feito no sistema de reversão da deficiência para a síntese de metionina em *Aspergillus nidulans* (SIDDIQI, 1962; LILLY, 1965).

Esse trabalho portanto, além do estudo da resistência em si, procurou fornecer um novo sistema para a detecção de mutagênicos, já que cada vez mais a população humana está exposta a novos compostos químicos, talvez mutagênicos potenciais, e os testes de mutagenicidade, usando mamíferos e células humanas, são relativamente poucos e dispendiosos (KAFFER e col., 1976).

Finalmente, um outro objetivo deste trabalho foi a verificação do possível uso desses mutantes, para dosagens microbiológicas de lisina em alimentos, especialmente cereais, uma vez que esse método já havia sido descrito (AZEVEDO e col., 1968), mas uma de suas limitações consistia no uso de arginase para evitar os efeitos inibidores da arginina em *Aspergillus nidulans*. Um método microbiológico simples, para dosagem de lisina em alimentos, poderia dispensar o uso de equipamentos mais sofisticados e nem sempre acessível, o que, aliás, tem sido feito para o ensaio de outros aminoácidos (AZEVEDO e col., 1968) e vitaminas (PRINCIVALLE, 1958; MASTROPIETRO e PRINCIVALLE, 1963; OLIVEIRA, 1967).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Alguns aspectos sobre mutantes resistentes a drogas em *Aspergillus nidulans*

Vários tipos de mutantes têm sido usados nas pesquisas genéticas em *Aspergillus nidulans*. Tais tipos incluem principalmente aqueles que diferem do tipo selvagem, com relação à morfologia, aos requisitos nutricionais e à utilização de fontes de carbono (PONTECORVO, 1953).

Esta revisão pretende relatar alguns casos descritos sobre mutantes resistentes a drogas, capazes de crescer na presença de substâncias que inibem o tipo selvagem. Estes mutantes podem ser utilizados para diversas finalidades, inclusive como marcadores úteis para seleção de segregantes, quando das análises genéticas (ROPER e KÄFER, 1957).

O *Aspergillus nidulans* é surpreendentemente resistente a uma variedade de substâncias consideradas inibidoras ou tóxicas. Diversas substâncias como o sulfato de cobre e os compostos arsenicais em altas concentrações não inibem suficientemente seu crescimento, para permitir a seleção.

A acriflavina foi, entre as muitas substâncias ensaiadas, a primeira a inibir efetivamente o crescimento do fungo. ROPER e KÄFER (1957) isolaram três mutantes de *Aspergillus nidulans*, resistentes à acriflavina. Em cada caso a resistência era devida à mutação em um só gene.

Dois dos mutantes eram alelos ( $AcrA_1$  e  $AcrA_3$ ), comportavam-se como semidominantes e foram mapeados a 23 unidades do



locus  $WA_3$ , no grupo de ligação II. A mutação  $actA_2$  era recessiva e estava localizada também no grupo de ligação II, mas no braço oposto, cerca de 25 unidades do marcador  $ad_1$ .

As três linhagens mostraram também maior resistência ao cristal violeta e ao verde malaquita.

WARR e ROPER (1965) obtiveram mutantes resistentes à verde malaquita, os quais se comportavam como recessivos e conferiam simultaneamente resistência à acriflavina.

Mutantes resistentes a análogos de metabólitos normais são particularmente interessantes, pois poderiam indicar as modificações dos mecanismos regulatórios do metabolismo normal e fornecer, também, mutantes defectivos no transporte de metabólitos, através da membrana celular.

Mutantes resistentes a análogos tóxicos são frequentemente incapazes de transportar, para seu interior, tanto o metabólito natural como o análogo.

Assim, mutantes de *Aspergillus nidulans*, resistentes a vários análogos de bases nitrogenadas têm sido descritos. MORPURGO (1962) descreveu mutantes resistentes a  $\delta$ -azaguanina induzidos por luz ultravioleta.

DARLINGTON e SCAZZOCHIO (1967) obtiveram mutantes resistentes a  $\delta$ -azaguanina, a 2-tioxantina e ao ácido 2-tioúrico, e defectivos em pelo menos um passo da absorção de purinas. As propriedades desses mutantes mostraram a existência de dois sistemas de absorção de purinas: um, que controla a absorção de hipoxantina, guanina e adenina, e o outro, de xantina e ácido úrico. Neste caso os mutantes parecem ter perdido a capacidade de metabolizar o componente tóxico e também o componente normal, do qual ele é um análogo.

PALMER, SCAZZOCHIO e COVE (1975), elucidaram o mecanismo de controle da biossíntese de pirimidinas, através do isolamento de mutantes resistentes a fluoropirimidinas. Enquanto alguns destes mutantes apresentavam alteração no transporte de pirimidinas exógenas, alguns mostravam alterações na regulação da biossíntese de pirimidinas. Análises genéticas mostraram que mu-

tações, conferindo resistência a fluoropirimidinas, podem ocorrer em pelo menos sete loci.

ARST e COVE (1969), estudando mutantes de *Aspergillus nidulans*, resistentes ao análogo da amônia, metilamônia, verificaram que deve existir apenas um gene envolvido na resistência e que tais mutações mostraram ser semidominantes, em heterocários e diplóides. Estas mutações levaram a uma liberação generalizada de aparentemente todas as atividades reprimidas por amônia, quando esta estava presente, mas o mecanismo de resistência não foi elucidado.

Os mutantes resistentes ao fluoroacetato são frequentemente encontrados, conforme se pode notar pela revisão feita por DORN (1967). Estes mutantes foram primeiramente obtidos e descritos por APIRION (1965) e uma de suas particularidades, o que os torna diferentes dos demais casos, é que a resistência lhes confere, também, a capacidade de utilização de fluoroacetato como fonte de carbono. Este fato torna-os de grande interesse para obter as frequências de mutação direta e reversa.

WARR e ROPER (1965) descreveram mutações dominantes responsáveis pela resistência ao iodoacetato em *Aspergillus nidulans*.

GEOGOPOULOS e GEORDALIS (1969), estudando mutantes resistentes ao iodoacetato, sugeriram que estes deveriam ser mutantes para permeabilidade.

Assim, um sistema de transporte mais facilmente saturável, no mutante, poderia concorrer para a resistência à toxicidade do iodoacetato.

ARMITT, McCULLOUGH e ROBERTS (1976) descreveram 10 novos loci que afetavam o metabolismo de acetato, com base na resistência ao fluoroacetato e não utilização de acetato como fonte de carbono. As enzimas ausentes, devido a mutações em sete dos loci, foram descritas e os loci mapeados.

Mutantes resistentes a análogos de aminoácidos são obtidos também frequentemente, sendo que os primeiros foram descritos por MORPURGO em 1962. Esses mutantes eram resistentes a

*p*-fluorofenilalanina, análogo da fenilalanina, e foram obtidos após tratamento com luz ultravioleta.

WARR e ROPER (1965) obtiveram também mutantes resistentes a *p*-fluorofenilalanina; observaram que o gene responsável pela resistência era recessivo e que suprimia requisito nutricional para ácido nicotínico.

SINHA (1967) relaciona a biossíntese de aminoácidos aromáticos com a resistência a *p*-fluorofenilalanina em *Aspergillus nidulans*. Esses mutantes apresentavam um requisito parcial para tirosina e fenilalanina, o qual foi explicado pela existência de um bloqueio metabólico no momento da hidroxilação da fenilalanina para dar tirosina. Neste trabalho, conseguiram-se evidências de que os dois processos envolvidos na síntese de tirosina, descritos em outros organismos, também existem no *Aspergillus nidulans*, e que o requisito parcial de tirosina, apresentado pelos mutantes resistentes a *p*-fluorofenilalanina, é resultado do bloqueio da hidroxilação da fenilalanina. Este bloqueio resultaria numa produção, em excesso, de fenilalanina, o que explicaria a resistência ao análogo pois, segundo RICHMOND (1962), tais análogos freqüentemente competem com o metabólito natural pelo centro ativo das enzimas.

SRIVASTAVA e SINHA (1976) descreveram seis novos loci, nos quais mutações conferiam resistência a *p*-fluorofenilalanina em *Aspergillus nidulans*. Dentre estes mutantes, três foram localizados no grupo de ligação VI e um, em cada um dos seguintes grupos: I, V e III.

PIOTROWSKA e col. (1976) isolaram mutantes recessivos, resistentes à *p*-fluorofenilalanina e à selenometionina, que se mostraram incapazes de transportar qualquer aminoácido neutro.

Isto indicou aos autores que aminoácidos neutros, tais como fenilalanina e metionina, deveriam ser, provavelmente, transportados pelo mesmo sistema.

DRAINAS e col. (1977) isolaram 11 mutantes resistentes ao análogo tóxico da asparagina, hidroxamato aspártico. Estes mutantes apresentavam atividade baixa ou não detectável de asparaginase, que foi medida pela formação de hidroxamato aspártico,

a partir de asparagina e hidroxalamina. Estas mutações mostraram ser recessivas e foram mapeadas no grupo de ligação VIII do *Aspergillus nidulans*.

Mutantes resistentes a fungicidas têm sido largamente descritos e estudados, devido a sua grande implicação prática.

WARR e ROPER, em 1965, já obtiveram mutantes resistentes ao actidione e ao teoquil. Enquanto a mutação para resistência ao actidione mostrou ser semidominante, aquela responsável pela resistência ao teoquil era recessiva.

THRELFALL (1968) isolou mutantes de *Aspergillus nidulans* resistentes aos fungicidas comerciais PCNB e TCNB. Essa resistência era dada por dois genes recessivos localizados no grupo de ligação III. A resistência destes mutantes a esses fungicidas foi considerada como devida a um decréscimo na capacidade dos mutantes, em acumular a substância tóxica.

Nove mutantes de *Aspergillus nidulans*, resistentes ao fungicida benlate, foram isolados por HASTIE e GEOGOPOULOS, (1971). Cinco mutantes mostraram ser mais resistentes, estando o gene para resistência localizado no grupo de ligação VIII. Os demais, menos resistentes, tinham o gene para resistência localizado no grupo de ligação II.

TUYL, DAVIDSE e DEKKER (1973) também isolaram mutantes resistentes ao benlate e tiabendazol, através de tratamento prévio com luz ultravioleta. Em ambos os casos, o gene, para resistência, estava localizado no grupo de ligação VIII. Foi proposto que estes fungicidas deveriam interferir na formação do fuso, através de complexos formados entre os fungicidas e as proteínas do fuso, o que resultaria na inibição da mitose.

Mutantes resistentes aos fungicidas Cloroneb, Vitavax e Dodine foram obtidos e analisados por SANTANA (1974), sendo que a resistência aos dois primeiros era devida a um único gene, e a resistência ao Dodine foi determinada como sendo possivelmente de natureza citoplasmática.

DEKKER (1976) em sua revisão sobre resistência

adquirida a fungicidas, ilustrada com diversos exemplos, e considerando as implicações práticas, descreveu, além da origem, os diferentes mecanismos que levam à resistência a fungicidas.

Van TUYL (1977), além de excelente revisão sobre o assunto, investigou o potencial de diferentes fungos em adquirir resistência a fungicidas, medido como frequência de mutação e grau de resistência.

Conseguiu mutantes resistentes a todos os fungicidas empregados: benomil, tiabendazol, cloroneb, imazalil, carboxina, cicloheximida e piramicina. As frequências de mutação variaram de  $10^{-7}$ , para piramicina e benomil, a  $2.10^{-4}$  para a resistência ao Cloroneb. A caracterização de mutantes resistentes foi feita especialmente em *Aspergillus nidulans*. Foi encontrado que, para alguns fungicidas, tais como cloroneb e oligomicina, somente um locus era responsável por todas as mutações para resistência; por outro lado, no caso da resistência a piramicina e carboxina, 2 e 3 genes respectivamente foram identificados, enquanto que, no caso da resistência à cicloheximida e ao imazalil, um sistema multigênico estava envolvido. Alto nível de resistência ao benomil e ao tiabendazol pareceu ser baseado em mutação em um locus. Vinte e três genes conferindo resistência foram assinalados em sete diferentes grupos de ligação, 16 dos quais foram mapeados.

DADVISE e FLACH (1977) isolaram mutantes resistentes ao fungicida MBC (metil benzimidazol carbamato) e descreveram o possível mecanismo de resistência a este agente. O efeito do MBC no micélio das linhagens mutantes de *Aspergillus nidulans* foi positivamente relacionado com a afinidade pelos sítios complexantes deste composto. Os mutantes resistentes ao MBC apresentavam, então, uma possível alteração na estrutura da tubulina, de modo que uma baixa afinidade da tubulina por MBC seria provavelmente o mecanismo comum de resistência, já que a ação fungicida deste composto se deveria a sua complexação com a tubulina do micélio fúngico.

Além dos casos de resistência a antibióticos já citados, alguns outros têm sido descritos. Mutantes espontâneos, resistentes à oligomicina, foram descritos por ROWLANDS e TURNER(1973).

Análises genéticas mostraram que, enquanto a maioria dos mutantes ensaiados tinha origem através de mutação nuclear, um deles tinha origem extranuclear.

Enquanto os mutantes nucleares não mostraram anormalidade no meio de cultura livre da droga, o mutante extranuclear exibiu uma capacidade de crescimento aumentada. Os mutantes nucleares mostraram dominância incompleta em diplóides e foram todos mapeados no grupo de ligação VII.

ROWLANDS e TURNER (1977) descreveram posteriormente um novo mutante extranuclear para resistência à oligomicina. Esta mutação, mitocondrial, foi transferida assexualmente para quatro linhagens, que apresentavam resistência nuclear à oligomicina. Em todos os casos, a mutação extranuclear, acrescentada à nuclear, levou a um aumento significativo do nível de resistência à oligomicina.

GUNATILLEKE e col. (1975) isolaram dois mutantes resistentes ao cloranfenicol, cujas mutações, quando ensaiadas, foram herdadas extranuclearmente e se recombinaram com mutações citoplasmáticas, para resistência à oligomicina e sensibilidade ao frio. Estas mutações eram estáveis e não afetavam crescimento ou morfologia em meio livre do antibiótico. Mutações nucleares para resistência ao cloranfenicol foram mapeadas em pelo menos três loci. Para um destes loci, mutações levaram pleiotropicamente à hipersensibilidade, à cicloheximida e ao ácido salicíhidroxâmico.

Além dos mutantes resistentes aos agentes inibidores citados acima, alguns outros bastante diferentes podem ser mencionados.

AZEVEDO e CAVENAGUE (1968) isolaram mutantes deficientes para a síntese de lisina e resistentes à arginina, após irradiação ultravioleta, numa frequência de 1 em  $7.1 \times 10^4$  conídios. A maioria das colônias isoladas apresentava morfologia normal, embora algumas apresentassem colônias miceliais e com crescimento residual. O caráter resistência mostrou-se bastante estável, através de uma série de sub-culturas.

ELORZA (1969) descreveu o isolamento e a caracterização de mutantes de *Aspergillus nidulans* resistentes à toxicida-

de dos íons metálicos, assim como as diferentes interações entre esses íons. Foram isolados mutantes capazes de crescer em concentrações tóxicas de  $Zn^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Ba^{++}$ ,  $Ni^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $Sn^{++}$  e  $Mn^{++}$ . A resistência destes mutantes aos metais, mostrou ser devida a uma conversão intracelular dos íons em um componente inativo. As análises genéticas mostraram que cada mutação era devida a um simples gene, que foi localizado no grupo de ligação correspondente. Toxicidade de  $Zn^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Ba^{++}$ ,  $Ni^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $Sn^{++}$  e  $Mn^{++}$  pode ser revertida para o tipo selvagem por quantidades definidas de  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Mg^{++}$  e  $Ca^{++}$ . Estas competições entre cátions, surgeriram a existência de um sistema comum, responsável pelo transporte de cátions nestes microrganismos.

ERLORZA e ARST (1971) isolaram mutantes resistentes à sorbose, os quais foram agrupados em dois loci. Em um locus, mutação conferia resistência cruzada com 2-deoxi-D-glicose, e seria resultado de um defeito no mecanismo de transporte de açúcar. No outro locus, a resistência resultaria da perda de fosfoglucomutase e seria acompanhada de pronunciada anormalidade morfológica, mas não da perda da capacidade de utilizar D-galactose.

Um sumário dos mutantes resistentes a drogas inibidoras em *Aspergillus nidulans* é apresentado na Tabela I.

Tabela I - Mutantes resistentes a drogas em *Aspergillus nidulans*.

Substância inibidora	Grupo de ligação	Observações	Referências bibliográficas
Acriflavina	II	recessiva 2 loci	ROPER e ROPER (1957).
Verde malaquita	-	recessiva	WARR e ROPER (1965).
β-azaguanina	-	-	MORPURGO (1962); DARLINGTON e SCAZZOCHIO (1967).
2-tioxantina	-	-	DARLINGTON e SCAZZOCHIO (1967).
Ácido 2-tiourico	-	-	DARLINGTON e SCAZZOCHIO (1967).
Fluoropirimidinas	-	7 loci	PALMER e col. (1975).
Metilamônia	-	semidominante	ARST e COVE (1969).
Fluoroacetato	-	10 loci	APIRION (1965); DOM (1967); ARMITT e col. (1976).
Iodoacetato	-	dominante	WARR e ROPER (1965); GEORGOPOULOS e GEORDALIS (1969).
p-fluorofenilalanina	I, V, VI, VIII	recessiva 10 loci	MORPURGO (1962); WARR e ROPER (1965); SINHA (1967); SRIVASTAVA e SINHA (1976); PIOTROWSKA e col. (1976).
Selenometionina	-	-	PIOTROWSKA e col. (1976).
Hidroxamato aspártico	VIII	recessivo	DRAINAS e col. (1977).
Teoquil	-	recessiva	WARR e ROPER (1965).
PCNB e TCNB	III	recessivas	THREFFALL (1968).
Benlate	II e VIII	recessiva	HASTIÉ e GEORGOPOULOS (1971); TUYL e col. (1973); TUYL (1977).
Cloroneb	-	recessiva 1 locus	SANTANA (1974); TUYL (1977).
Vitavax	-	1 locus	SANTANA (1974).
Dodine	-	extranuclear	SANTANA (1974).
Tiabendazol	VIII	1 locus	TUYL e col. (1973); TUYL (1977).
Imazalil	-	sistema multigênico	TUYL (1977).
MBC	-	-	DAVIDSE e FLACH (1977).
Actidione	-	semidominante	WARR e ROPER (1965).
Carboxina	-	dominante 3 loci	TUYL (1977).
Cicloheximida	-	dominante sistema multigênico	TUYL (1977).
Piramicina	-	recessiva 2 loci	TUYL (1977).
Oligomicina	VII	dominante não incompleta extranuclear	ROWLANDS e TURNER (1973 e 1977).
Cloranfenicol	-	3 loci nucleares extranucleares	GUNATILLEKE e col. (1975).
Arginina	-	-	AZEVEDO e CAVENAGUE (1968).
Íons metálicos	-	-	ELORZA (1969).
Sorbose	-	2 loci	ELORZA e ARST (1971).



## 2.2. Alguns aspectos sobre antagonismo e transporte de aminoácidos especialmente em *Aspergillus nidulans*

O crescimento de mutantes de microrganismos, dependentes de aminoácidos, pode ser inibido por um ou mais aminoácidos em um meio definido. Assim, linhagens do fungo *Aspergillus nidulans*, deficientes para a síntese de lisina, mostraram ser muito sensíveis à presença de arginina no meio de cultura, comportando-se esta como inibidora do crescimento dessas linhagens, provavelmente devido a um tipo de interação competitiva entre os dois aminoácidos (PONTECORVO, 1949). Nessa ocasião, observou-se que um mutante deficiente em lisina tinha seu crescimento reduzido pela metade, quando a relação molar de arginina/lisina era pouco maior que 1; e, se esta relação fosse dobrada em favor da arginina, o crescimento era totalmente inibido.

PONTECORVO e col. (1953) observaram também que lisina exógena inibia completamente o crescimento de auxotróficos para arginina em *Aspergillus nidulans*, nas relações molares de 2:1.

A inibição de linhagens deficientes em lisina, pela arginina, já tinha sido descrita anteriormente por DOERMANN (1944) em linhagens de *Neurospora crassa*.

GRENSON (1967) estudando a inibição da entrada de lisina na célula da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pela presença de arginina, tentou esclarecer a aparente contradição existente até então sobre a existência de uma permease única, com diferentes afinidades pelos diversos aminoácidos, ou a existência de vários sistemas específicos. Através de experimentos de competição e do estudo de mutantes, que perderam a capacidade de transportar arginina, o autor supôs a existência de um sistema de transporte de lisina, distinto da permease da arginina.

Analisando as velocidades de entrada de lisina em linhagens selvagens e mutantes, postulou que a lisina poderia entrar na célula por duas permeases diferentes, independentes: a permease da lisina, propriamente dita, que possuía grande afinidade com esse aminoácido, e a permease da arginina, que possuía uma afinidade, embora muito menor, com a lisina. Um sistema de transpor

te de metionina em *Penicillium crysogenum* (BENKO, WOOD e SEGEL, 1967) englobaria duas enzimas diferentes e independentemente reguladas: uma específica para a metionina e a outra, uma permease de aminoácidos não específica.

ROESS e De BUSK (1968) descreveram um sistema de transporte comum para os aminoácidos básicos em *Neurospora crassa*, sugerindo a competição pela permease, como uma simples explicação do antagonismo lisina-arginina.

CYBIS e WEGLENSKI (1969, 1972), trabalhando com *Aspergillus nidulans*, observaram que a lisina interferia no controle dos caminhos biossintéticos e catabólicos da arginina, e que a entrada de arginina era severamente restringida pela presença de lisina.

A ação da lisina apareceria possivelmente na repressão de enzimas biossintéticas e na indução de enzimas catabólicas da arginina, o que resultaria, na redução da arginina disponível para a síntese protéica, no caso de a arginina endógena não poder ser produzida.

Para a entrada no micélio, competiriam fortemente a lisina e a arginina e os resultados de ensaios de crescimento levaram a crer que a permease teria uma afinidade muito maior com a arginina do que com a lisina.

SINHA (1969), tendo por base que análogos de metabólitos essenciais são inibidores para uma grande variedade de microrganismos; que estes análogos são levados para dentro da célula pelo mesmo caminho e mecanismo de seus competidores naturais (RICHMOND, 1962), e que a seleção para resistência a esses análogos era uma maneira de se obter mutantes deficientes em permeases específicas, isolou mutantes resistentes à *p*-fluorofenilalanina. Esses mutantes eram deficientes no transporte de fenilalanina e outros aminoácidos e seus análogos. Parâmetros cinéticos do transporte de fenilalanina, nas linhagens selvagens e mutantes, sugeriram a existência de um único sistema de transporte para fenilalanina e aminoácidos relacionados, o qual seria responsável pela concentração destes dentro da célula.

Assim, não seria surpreendente que mutantes resis-

tentes a *p*-fluorofenilalanina fossem também resistentes a um grande número de análogos de aminoácidos relacionados.

SINHA (1970) observou que uma linhagem de *Aspergillus nidulans*, deficiente em fenilalanina, era inibida competitivamente por leucina, mas uma linhagem deficiente em leucina não era inibida por fenilalanina.

Experimentos de interações entre a resistência à *p*-fluorofenilalanina e o requisito de aminoácidos e de transporte indicaram a existência de, pelo menos, dois sítios nos quais leucina competiria com fenilalanina, sendo um deles sítio comum de entrada destes aminoácidos no micélio.

DHILLON e GARBER (1970) observaram que mutantes de *Aspergillus nidulans*, deficientes para a síntese de leucina, eram inibidos por metionina quando o meio mínimo era suplementado com leucina e metionina. Descobriram a existência de um sistema de transporte único para metionina e leucina, a qual mostrava uma afinidade maior com a metionina do que com a leucina.

O efeito inibidor da metionina foi atribuído à interferência com o transporte de leucina. Para as concentrações ensaiadas, fenilalanina não teve efeito no crescimento de mutantes deficientes em leucina, o que levou à suposição de que esta deve possuir um outro sistema, diferente do da leucina e do da metionina, para seu transporte, através da membrana celular.

ROBINSON, ANTHONY e DRABBLE (1973) descreveram que as atividades de permease do transporte de lisina, de arginina, de metionina e de fenilalanina eram menores durante a germinação dos conídios de *Aspergillus nidulans*, em meio com arginina, do que após germinação neste meio. Sugeriram que as permeases para estes aminoácidos seriam reguladas por amônia intracelular, de maneira que durante o crescimento, na presença de amônia, as baixas atividades de permease seriam suficientes para fornecer aminoácidos para a síntese protéica, mas não suficiente para qualquer aminoácido ser uma fonte maior de nitrogênio.

Em meio deficiente em amônia, uma atividade aumentada das permeases seria requerida para que os aminoácidos fossem capazes de fornecer todo o nitrogênio para o crescimento.

Além da permease, a síntese de duas enzimas envolvidas no caminho catabólico da arginina, arginase e ornitina P-transaminase, foi descrita por BARTNICK e col. (1973a e b) como sendo sensíveis a repressão por glicose e amônia.

PATEMAN, KINGHORN e DUNN (1974) descreveram um sistema de transporte que parece específico para glutamato e aspartato, em *Aspergillus nidulans*, e que seria regulado por amônia.

Um mutante deficiente para este sistema de transporte e também insensível à ação da amônia como repressora, foi atribuído a um defeito no mecanismo de transporte e não a uma mutação em algum gene do sistema de regulação.

KINGHORN e PATEMAN (1975) isolaram mutantes deficientes para o transporte de aminoácidos e incapazes de utilizar glutamato como fonte de carbono e nitrogênio.

Descreveram a existência de quatro genes não ligados. Os níveis de transporte de certos aminoácidos, as características de crescimento em certas fontes de carbono e nitrogênio e a toxicidade de análogos de aminoácidos indicaram que um dos tipos de mutantes teria um sistema defectivo de transporte de aminoácidos ácidos; outro apresentaria defectivos os sistemas de aminoácidos neutros e ácidos, e em outros os sistemas de transporte de aminoácidos ácidos, neutros e aromáticos é que seriam defectivos.

A existência de mutantes que apresentavam o sistema de aminoácidos ácidos defectivo, no qual o transporte de glutamato e aspartato era diminuído, sugeriu também a presença de um sistema específico para estes dois aminoácidos, à semelhança daquele descrito por PALL (1970) para *Neurospora crassa* e PATEMAN e col. (1974) para *Aspergillus nidulans*.

PIOTROWSKA e col. (1976) caracterizaram o transporte de arginina, lisina e ornitina como sendo realizado por uma permease de aminoácidos básicos em *Aspergillus nidulans*. Este sistema de transporte comum, responsável pela entrada de lisina, arginina e ornitina para o interior do micélio, seria dependente de energia. Foram descritos evidências de que lisina e arginina competiriam no mesmo sítio da permease, o qual teria igual afinidade com estes dois aminoácidos. Esta mesma permease seria respon-

sável pelo transporte de ornitina, mas provavelmente com uma afinidade bem mais baixa.

Esses autores propuseram ainda a existência de uma permease específica para o transporte de metionina, que transportaria também outros aminoácidos neutros, tais como serina, fenilalanina e leucina.

Além dos casos descritos em microrganismos, o antagonismo lisina-arginina tem sido notado em estudos de competição, onde uma série de aminoácidos falha na inibição da absorção de lisina radioativa, "*in vitro*", em segmentos intestinais de ratos de várias idades.

A arginina foi o único aminoácido a inibir a absorção de lisina, da mesma forma em que foi antagonizada por ela (BARTSOCAS, 1977).

TYIHAK, SZENE e LAPIS (1977) explicaram as funções antagônicas da lisina e arginina, como sendo devidas às suas diferentes reatividades, no processo molecular da célula.

Em culturas de tecidos, enquanto a lisina metilada induzia a uma proliferação celular, as argininas metiladas mostraram um efeito inibidor na proliferação.

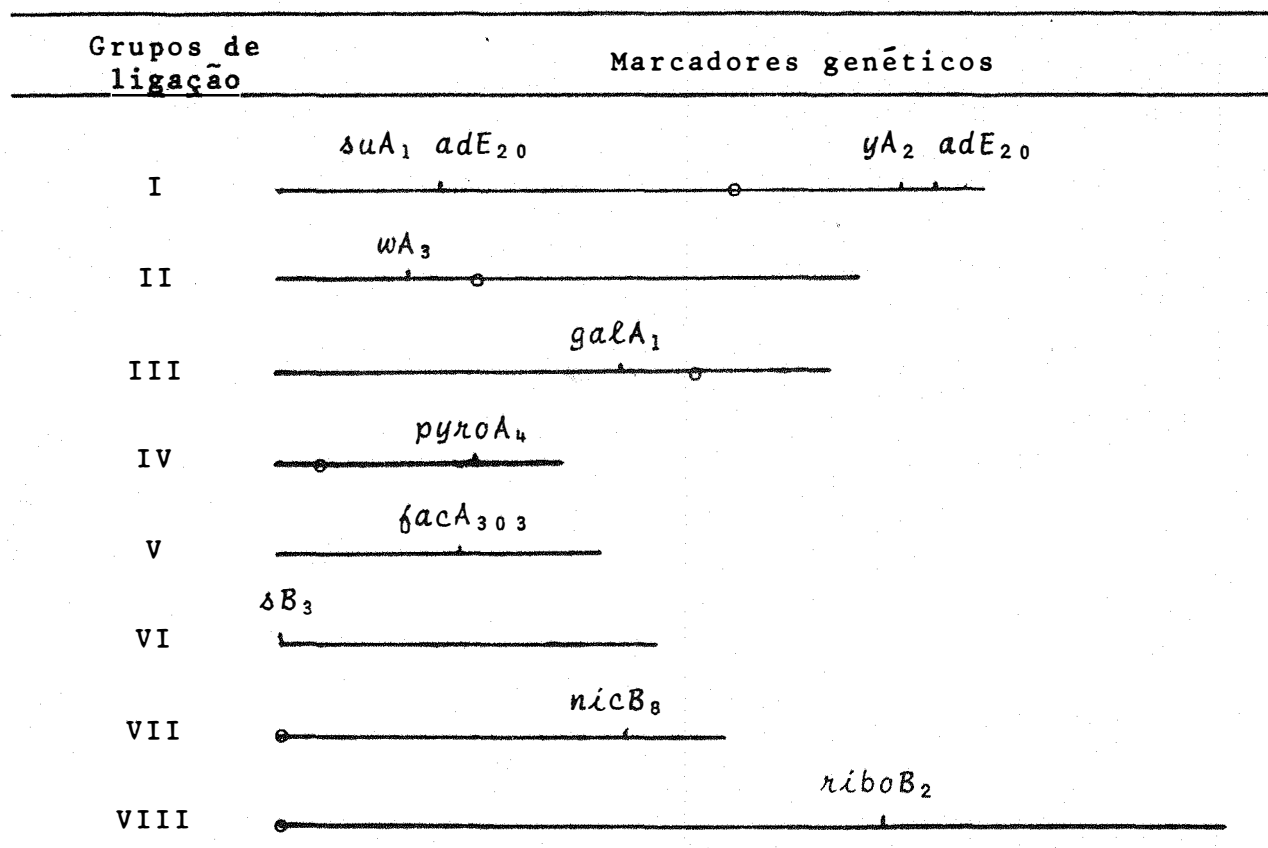
Assim, metilação de aminoácidos básicos poderia ter especial significância na regulação da proliferação celular.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens utilizadas

- a. Linhagem MSE (Master Strain E) contendo marcadores genéticos em todos os oito grupos de ligação (McCULLY e FORBES, 1965) como se observa na Figura 1.

Figura 1 - Marcadores genéticos da linhagem MSE.



Os centrômeros estão representados por o. Os fenótipos determinados pelos marcadores genéticos podem ser encontrados no item 3.1.1.

- b. Linhagem *proA*<sub>1</sub>, *pabaA*<sub>6</sub>, *yA*<sub>2</sub>.
- c. Linhagem 118 C (chartreuse) que apresenta os seguintes marcadores: *suA*<sub>1</sub>, *adE*<sub>20</sub>, *pabaA*<sub>6</sub>, *yA*<sub>2</sub>, *adE*<sub>20</sub>; *acrA*<sub>1</sub>; *lysA*<sub>1</sub>; *chaA* e é sensível a arginina.
- d. Linhagem 118 M (marrom) que apresenta os mesmos marcadores genéticos da linhagem 118 C, mas seus conídios mostram a coloração marrom e não chartreuse como na anterior.
- e. Linhagem *galA*<sub>1</sub>; *lysA*<sub>1</sub>;  $\Delta B_3$ ; *riboB*<sub>2</sub> segregante 33 do cruzamento 118 C x MSE e que apresenta coloração marrom intermediária (MI).
- f. Linhagem *pabaA*<sub>6</sub>; *facA*<sub>303</sub>; *lysA*<sub>1</sub>; *nicB*<sub>8</sub> segregante 41 do cruzamento 118 M x MSE e que apresenta a coloração marrom intermediária (MI).
- g. Linhagem *pabaA*<sub>6</sub>; *galA*<sub>1</sub>; *lysA*<sub>1</sub>;  $\Delta B_3$  segregante 46 do cruzamento 118 M x MSE, de coloração marrom intermediária (MI).
- h. Linhagem *pabaA*<sub>6</sub>; *facA*<sub>303</sub>; *lysA*<sub>1</sub>;  $\Delta B_3$  segregante 32 do cruzamento 118 C x MSE e que apresenta coloração branca.
- i. Linhagens mutantes resistentes à arginina.  
 Os mutantes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 28, 32 e 144 foram obtidos das linhagens 118 C ou 118 M, apresentam os mesmos marcadores que ambas, com exceção da auxotrofia para lisina e são resistentes à arginina.  
 Os mutantes 12, 13, 18, 24 e 90 foram obtidos das linhagens 118 C ou 118 M, apresentam os mesmos marcadores que ambas e são resistentes à arginina.

As quatro primeiras linhagens são originárias do Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra; a quinta linhagem surgiu espontaneamente no estoque da 118 chartreuse, enquanto as demais foram por nós obtidas no Setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

### 3.1.1. Símbolos e fenótipos das linhagens utilizadas no presente trabalho

S í m b o l o	F e n ó t i p o
<i>AcrA</i> <sub>1</sub>	Resistência à acriflavina.
<i>adE</i> <sub>20</sub>	Requisito para adenina.
<i>biA</i> <sub>1</sub>	Requisito para biotina.
<i>chaA</i>	Conídios chartreuse.
<i>facA</i> <sub>303</sub>	Incapaz de crescer em meio contendo acetato como única fonte de carbono.
<i>galA</i> <sub>1</sub>	Incapaz de crescer em meio contendo galactose como única fonte de carbono.
<i>lysA</i> <sub>1</sub>	Requisito para lisina.
<i>methG</i> <sub>1</sub>	Requisito para metionina.
<i>nicB</i> <sub>8</sub>	Requisito para ácido nicotínico.
<i>pabaA</i> <sub>6</sub>	Requisito para ácido <i>p</i> -aminobenzóico.
<i>proA</i> <sub>1</sub>	Requisito para prolina.
<i>pyroA</i> <sub>4</sub>	Requisito para piridoxina.
<i>riboB</i> <sub>2</sub>	Requisito para riboflavina.
<i>ΔB</i> <sub>3</sub>	Requisito para tiosulfato.
<i>ΔuA</i> <sub>1</sub> <i>adE</i> <sub>20</sub>	Supressor do mutante <i>adE</i> <sub>20</sub> .
<i>yA</i> <sub>2</sub>	Conídios amarelos.
<i>wA</i> <sub>3</sub>	Conídios brancos.

### 3.2. Meios de cultura e soluções usadas

#### 3.2.1. Meio mínimo (MM)

Preparado de acordo com PONTECORVO e col. (1953).

NaNO <sub>3</sub> . . . . .	6,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	1,5 g
KCl . . . . .	0,5 g



MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O . . . . .	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> . . . . .	traços
ZnSO <sub>4</sub> . . . . .	traços
Glicose . . . . .	.10,0 g
Ágar . . . . .	.15,0 g
Água destilada . . . . .	.1.000 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

### 3.2.2. Meio completo (MC)

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

Peptona . . . . .	2,0 g
Caseína hidrolizada . . . . .	1,5 g
Extrato de leveduras . . . . .	0,5 g
Solução de vitaminas . . . . .	1,0 ml
Ácido nucleico de leveduras . . . . .	2,5 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

### 3.2.3. Solução de vitaminas

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

A solução foi parcialmente esterilizada em banho-  
-maria por 15 minutos e guardada no refrigerador a 4<sup>o</sup>C, em frasco  
escuro, sob clorofórmio.

### 3.2.4. Solução de ácido nucleico de leveduras

Ácido nucleico de leveduras - 2 g em 15 ml de solução.  
1 N de HCl.

Ácido nucleico de leveduras - 2 g em 15 ml de solução.  
1 N de NaOH.

Ambas as soluções foram aquecidas a 100°C por 20 minutos, misturadas e o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 4%. Filtrou-se e completou-se o volume para 40 ml. A solução foi conservada no refrigerador a 4°C, sob clorofórmio.

### 3.2.5. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo

Adicionou-se ao meio mínimo líquido (sem ágar) 2% de meio completo, distribuiu-se em tubos (2,5 ml por tubo) e autoclavou-se.

### 3.2.6. Meio mínimo de galactose

Preparado da mesma forma que o meio mínimo (item 3.2.1.), substituindo-se apenas a glicose por galactose como fonte de carbono.

### 3.2.7. Meio de acetato de amônio

Preparado segundo APIRION (1962).

Acetato de amônio . . . . .	12,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	3,0 g
NaCl . . . . .	2,0 g
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O . . . . .	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> . . . . .	traços
ZnSO <sub>4</sub> . . . . .	traços

Ágar . . . . . 15,0 g  
Água destilada . . . . . 1.000 ml  
pH ajustado para 6,1 com NaOH 4%.

### 3.2.8. Solução salina

Preparou-se uma solução de cloreto de sódio 0,9%, dissolvendo-se o sal em água destilada. A solução foi colocada em frascos (9 ml por frasco).

### 3.2.9. Solução de tween

Adicionou-se tween 80 em água destilada na concentração de 0,1% (v/v). A seguir, distribuiu-se em tubos (2,5 ml por tubo) e autoclavou-se.

### 3.2.10. Solução de p-fluorofenilalanina (pFA)

Preparou-se uma solução de p-fluorofenilalanina 1% dissolvendo-se o mesmo em água destilada esterilizada. A seguir a solução foi colocada em banho-maria por 15 minutos e conservada no refrigerador a 4°C.

### 3.2.11. Solução de 1,4-dicloro-2,5 -dimetoxil-benzeno (Cloroneb)

Preparou-se uma solução de Cloroneb a 0,2% em água destilada. A solução foi colocada em banho-maria por 15 minutos e conservada a seguir, em refrigerador a 4°C

### 3.2.12. Solução de arginina

Preparou-se uma solução de arginina 1% em água destilada. Esta foi colocada em banho-maria por 15 minutos e a seguir conservada em refrigerador a 4°C.

### 3.2.13. Solução de metano-sulfonato de etila (EMS)

Preparou-se uma solução de EMS a 2%, adicionando-se o mesmo em água destilada esterilizada, imediatamente antes do uso.

### 3.2.14. Solução de brometo de etídio (BE)

Preparou-se uma solução com 10 mg de brometo de etídio em 50 ml de água esterilizada que foi então mantida em banho-maria por 15 minutos, conservando-se a seguir em frasco escuro a 4°C.

Nos experimentos para construção das curvas de sobrevivência ao BE, usou-se uma outra solução que foi preparada colocando-se 20 mg de BE em 20 ml de água. Esta foi mantida em banho-maria por 15 minutos e conservada em frasco escuro a 4°C. Usou-se 0,1 ml desta solução em 20 ml de meio de cultura, resultando uma concentração final de 5 µg brometo de etídio/ml meio.

### 3.2.15. Soluções de lisina

Foi preparada uma solução de lisina colocando-se 150 mg de lisina em 30 ml de água esterilizada (5.000 µg/ml). A solução foi conservada em banho-maria por 15 minutos e em seguida tomou-se 10 ml dessa solução e colocou-se em 10 ml de água esterilizada (2.500 µg/ml). Desta 2a. solução tomou-se 10 ml e diluiu-se em 10 ml de água esterilizada (1.250 µg/ml). Repetiu-se o procedimento até a obtenção de 156,25 µg lisina/ml água. Todas essas soluções foram colocadas por 15 minutos em banho-maria e conservadas a 4°C, em refrigerador.

### 3.2.16. Suplementos adicionados ao meio mínimo

Preparou-se o estoque de suplementos, adicionando-se cada um deles em água destilada esterilizada. As soluções

foram a seguir colocadas em banho-maria por 15 minutos e conservadas em refrigerador.

Solução estoque (100 ml H <sub>2</sub> O)	Quantidade adicionada por placa (20 ml de meio de cultura)	Concentração final no meio de cultura	
Acriflavina. . . . .	200,0 mg	0,1 ml	10,00 g/ml
Adenina. . . . .	500,0 mg	0,1 ml	25,00 g/ml
Arginina. . . . .	10,0 g	0,16 ml	800,00 g/ml
Ácido nicotínico. . . . .	10,0 mg	0,1 ml	0,50 g/ml
Ácido p-aminobenzóico..	5,0 mg	0,1 ml	0,25 g/ml
Biotina . . . . .	4,0 mg	0,1 ml	0,20 g/ml
Lisina. . . . .	1,0 g	0,1 ml	50,00 g/ml
Metionina . . . . .	1,0 g	0,1 ml	50,00 g/ml
Piridoxina. . . . .	5,0 mg	0,1 ml	0,25 g/ml
Riboflavina . . . . .	10,0 mg	0,1 ml	0,50 g/ml
Tiosulfato de sódio . .	2,0 g	0,1 ml	100,00 g/ml

### 3.2.17. Placas de análise

Para a análise genética das colônias, utilizaram-se: placas de Petri com meio completo, com meio mínimo, com meio mínimo suplementado com todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento e com meio mínimo suplementado com todos os requisitos, exceto aquele sob análise. Utilizaram-se também placas contendo meio de galactose e placas contendo meio de acetato, suplementadas de todos os requisitos nutricionais, além de placas de meio completo suplementado de acriflavina e placas com meio mínimo suplementado com todos os requisitos nutricionais e adicionais de arginina.

### 3.2.18. Luz ultravioleta (UV)

A fonte de luz ultravioleta foi uma lâmpada "mineralight (2.537 Å).

### 3.3. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e as soluções foram sempre esterilizados em autoclave por 15 minutos a uma atmosfera de pressão e a 120°C.

A temperatura de incubação foi de 37°C em todos os experimentos.

### 3.4. Ensaio das linhagens

#### 3.4.1. Purificação e teste da linhagem 118

Conídios da linhagem 118, estocadas em solo, à temperatura ambiente, foram transferidos, com o auxílio de uma alça de platina, para uma solução esterilizada de tween; as cadeias de conídios foram desagregadas por agitação e semeadas em meio completo (MC), com a finalidade de purificação da linhagem.

Como apareceram colônias de duas colorações diferentes, após purificação de cada uma delas, em placas de MC por meio de estrias, estas duas linhagens foram então testadas quanto aos requisitos nutricionais.

Preparou-se uma série de placas contendo meio mínimo (MM) adicionado de uma solução de conídios de cada uma das linhagens. No centro de algumas placas, foi então adicionada uma gota de uma solução de lisina, ou de ácido *p*-aminobenzóico; outros receberam uma gota de ambas as substâncias; algumas placas receberam uma gota de cada uma das 2 soluções em pontos extremos de sua área e, por último, algumas placas, sem qualquer adição, foram também incubadas, por 72 horas.

Foram também preparadas placas de MM suplementado de lisina e ácido *p*-aminobenzóico; outras placas continham só uma das duas substâncias e as últimas foram adicionadas de acriflavina, além das soluções de lisina e ácido *p*-aminobenzóico. Todas estas placas foram incubadas, por 72 horas, após a inoculação da linhagem no centro da placa, por picada com um fio de platina.

### 3.4.2. Determinação da resistência das linhagens

Três métodos foram utilizados para a determinação da resistência à arginina, para as duas linhagens:

#### a. Método de semeadura

Conídios de cada uma das linhagens foram transferidos, com o auxílio de uma alça de platina, para uma solução esterilizada de tween. As cadeias de conídios foram desagregadas por agitação e a densidade dos mesmos foi estimada através de um hematímetro.

Foram feitas diluições adequadas, em solução salina e 0,1 ml das suspensões foi semeado em placas de Petri, com MM suplementado com os requisitos das linhagens mais volumes crescentes de uma solução de arginina 1%.

O espalhamento dos conídios sobre a superfície foi feito através do uso de alça de Drigalski esterilizada. A contagem de número de colônias foi feita após 56 horas de incubação.

#### b. Método de inoculação por picada

Conídios de cada uma das linhagens foram transferidos, com o auxílio de um fio de platina, para o centro de placas contendo MM mais os requisitos nutricionais das linhagens e volumes crescentes de uma solução de arginina 1%. A medida do diâmetro das colônias foi feita após 96 horas de incubação.

#### c. Método de inoculação por microcolônias

Conídios das duas linhagens foram suspensos em soluções de tween e semeados em placas de Petri, contendo MM adicionado dos requisitos nutricionais das linhagens. Após incubação por 18 horas, microcolônias foram transferidas para o centro de uma série de placas de Petri, contendo MM suplementado com os requisitos nutricionais das linhagens mais concentrações crescentes de arginina.

As placas foram incubadas por sete dias, após o que

foi observado o crescimento das colônias e foi feita a medida de seus diâmetros.

### 3.4.3. Ensaio do nível de requisito para lisina

Com o intuito de se verificar se uma das linhagens necessitava de mais lisina que a outra, conídios das duas linhagens, 118 C e 118 M, foram inoculados por picada no centro de placas de Petri, contendo MM suplementado com biotina (AZEVEDO, 1970), ácido *p*-aminobenzóico e concentrações crescentes de lisina (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0 e 128 µg/ml). Foram preparadas duas placas para cada concentração de lisina ensaiada para cada linhagem, além de duas placas de MC utilizadas como controle.

As placas incubadas a 37°C e os diâmetros das colônias foram medidos a partir do 3º dia até o 6º dia, após a inoculação.

O mesmo procedimento foi repetido para duas linhagens MI e portanto *lys*, provenientes dos cruzamentos das linhagens 118 C e 118 M com a linhagem MSE (segregantes 33 e 41, respectivamente).

Estes mesmos segregantes foram cruzados entre si, formaram heterocário e os ascósporos de um peritécio híbrido foram repicados em placas de MM suplementado dos requerimentos das linhagens mais cada uma de diferentes concentrações de lisina (4,0; 8,0 ou 16 µg).

A medida do diâmetro das colônias foi feita após 72 horas de incubação.

### 3.5. Obtenção espontânea de mutantes resistentes à arginina

O isolamento dos mutantes espontâneos resistentes à arginina foi feito semeando-se 0,1 ml de uma solução, contendo cerca de  $10^7$  conídios/ml de cada uma das linhagens, em placas de



Petri, contendo MM suplementado com os requisitos nutricionais das mesmas e adicionados daquela concentração inibidora de arginina, para as linhagens originais.

Após 96 horas de incubação, as colônias que cresceram neste meio foram transferidas para placas de MC (26 colônias/placa).

Após 72 horas de incubação, estas colônias foram replicadas com o auxílio de um replicador de níquel-cromo para uma série de placas contendo MM; MM + lisina; MM + ácido *p*-aminobenzóico; MM + lisina + ácido *p*-aminobenzóico e MM + lisina + ácido *p*-aminobenzóico + arginina.

Novamente após 72 horas de incubação, foram anotadas as colônias que cresceram e as que não cresceram, em cada um dos meios utilizados.

Esta mesma metodologia utilizada para se retestar os requisitos nutricionais e se confirmar a resistência à arginina nos mutantes espontâneos, foi usada posteriormente para alguns dos mutantes induzidos por mutagênicos.

### 3.6. Obtenção induzida de mutantes resistentes à arginina

#### 3.6.1. Tratamento com mutagênicos

##### a. Tratamento com luz ultravioleta

Conídios de cada uma das linhagens foram transferidos, com o auxílio de uma alça de platina, para uma solução de tween. As cadeias de conídios foram desagregadas por agitação e a densidade dos mesmos foi estimada através de um hematímetro.

Cada uma das soluções foi então submetida à irradiação ultravioleta, por tempos crescentes de 0; 1; 2; 4 e 8 minutos, após os quais foram feitas diluições apropriadas.

Foi então semeado 0,1 ml de cada diluição em placas de Petri, contendo MC, as quais foram incubadas e a contagem do número de colônias foi feita após 56 horas.

### b. Tratamento com metano-sulfonato de etila

Suspensões de conídios das duas linhagens foram preparadas pela mesma metodologia descrita no ítem anterior (a) e a cada 2 ml da suspensão de conídios foram adicionados 4 ml de uma solução de metano-sulfonato de etila a 2% (método descrito por ROSATO, 1973). Após os tempos de 0; 2; 4 e 6 horas de incubação da solução a 37°C, em banho-maria, foram retiradas alíquotas de 1 ml da mesma, com as quais se prepararam as diluições apropriadas. Foi então semeado 0,1 ml de cada diluição em placas de Petri contendo MC, as quais, foram incubadas e a contagem do número de colônias foi feita 56 horas após a inoculação.

### c. Tratamento com brometo de etídeo

#### c<sub>1</sub>. Determinação da concentração que resulta em 5 - 10% de sobrevivência

Tendo-se preparada uma solução com 200 µg de brometo de etídeo por ml de água, tomou-se 0,5, 0,4, 0,3; 0,2, 0,1 e 0,5 desta e colocou-se em placas de Petri, contendo 20 ml de MC.

Foram assim preparadas placas de Petri contendo MC adicionado de 5, 4, 3, 2, 1 e 0,5 µg de brometo de etídeo/ml de meio, as quais foram semeadas com 0,1 ml de uma solução de conídios de aproximadamente 10<sup>3</sup> conídios/ml.

As placas foram incubadas por 72 horas após o que o número de colônias por placa foi contado.

#### c<sub>2</sub>. Determinação da sobrevivência das linhagens em diferentes tempos de tratamento

Determinada a concentração de brometo de etídeo que daria 5 - 10% de sobrevivência quando adicionada ao meio de cultura, passou-se a usar tal concentração, ou seja, 5 µg/ml meio e variar o tempo de incubação, para a construção das curvas de sobrevivência.

Conídios de cada uma das linhagens foram transferidos com o auxílio de uma alça de platina para tubos escuros, con-

tendo 20 ml de MM líquido suplementado de lisina, ácido *p*-aminobenzóico, tiosulfato (requisitos nutricionais das novas linhagens utilizadas) e posteriormente 0,1 ml de uma solução de brometo de etídeo, de forma que resultasse em 5 µg por ml meio.

Imediatamente antes da colocação do brometo de etídeo, uma alíquota desta suspensão foi retirada e a densidade dos conídios estimada, através de um hematímetro e se necessário, acertada até que desse aproximadamente  $1 \times 10^6$  conídios/ml meio.

Um ml desta mesma solução de conídios foi adicionado a um tubo de ensaio, contendo 9 ml de MM líquido suplementado de lisina, ácido *p*-aminobenzóico e tiosulfato. Este tubo serviria como controle, já que receberia a solução de conídios sem que a esta tivesse sido adicionado o brometo de etídeo.

Após cada um dos tempos de 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 horas de tratamento, foi retirado 1 ml da solução e diluída em solução salina.

Foi então semeado 0,1 ml das diluições apropriadas em placas de Petri contendo MC, as quais foram incubadas e a contagem do número de colônias foi feita após 72 horas.

### 3.7. Técnicas de análise genética

#### a.. Obtenção de heterocários

Utilizou-se o mesmo método descrito por PONTECORVO e col. (1953). Conídios de duas linhagens que requerem diferentes fatores de crescimento foram colocados em 2,5 ml de MM suplementado de 2% de MC líquido, o que permitiu apenas pequena germinação dos conídios.

Após 3 - 4 dias de incubação, formou-se uma película na superfície do meio a qual, transferida para placa contendo MM, originou setores heterocarióticos, os quais contêm núcleos geneticamente diferentes na mesma hifa, o que permitiu o crescimento.

### b. Análise mitótica

Esta análise foi realizada através do ciclo parassexual após obtenção de diplóides, segundo o método descrito por ROPER (1952).

Após se ter obtido o heterocário e este transferido para MM, onde houve formação de setores heterocarióticos, conídios destes setores (cerca de  $10^7$  conídios/ml) foram semeados em MM.

A maioria dos conídios destes setores heterocarióticos é haplóide e portanto não consegue se desenvolver, em MM. Entretanto, há formação de conídios diplóides heterozigotos em porcentagem muito baixa, devido à fusão rara de núcleos haplóides, que são capazes de crescer em MM.

As colônias diplóides assim obtidas foram induzidas à haploidização pelo método da *p*-fluorofenilalanina (*p*FA) (MORPURGO, 1961; LHOAS, 1961) ou pelo método do Cloroneb (AZEVEDO e SANTANA, 1975) que inibe o crescimento de diplóides, permitindo o crescimento dos setores haplóides que surgem como segregantes.

Segundo KÄFER (1961) a haploidização ocorre respectivamente através da aneuploidia com perdas sucessivas de cromossomos. A técnica consistiu em adicionar 1,5 ml da solução a 1% de *p*FA ou de 2,0 ml da solução de Cloroneb a 0,2% em 200 ml de MC.

A seguir, os diplóides foram inoculados em 4 pontos das placas e, após 7 - 10 dias de incubação, surgiram setores haplóides, identificados pela coloração diferente da do diplóide inoculado.

Os setores foram purificados em MC e a seguir inoculados um a um em 26 pontos fixos, numa placa de MC (AZEVEDO, OLIVEIRA e ROCHA CAMPOS, 1977).

Após 3 dias de incubação, essa placa serviu como placa mestra que foi replicada para as placas de análise, através de um replicador de níquel-cromo. As leituras das placas de análise foram feitas com 24, 48 e 72 horas de incubação, anotando-se as colônias que cresceram e as que não cresceram.

### c. Análise meiótica

Esta baseia-se no ciclo sexual do fungo, através da análise

de ascósporos produzidos em peritécios híbridos, segundo o método descrito por PONTECORVO e col. (1953).

Para a obtenção de peritécios, incubaram-se placas de meio mínimo contendo pedaços de heterocários, vedados com fita celulósica, por 8 - 10 dias, em estufa a 37°C.

Após este período, os maiores peritécios (BARACHO, VENCOSKY e AZEVEDO, 1970) foram isolados, retirados sob lupa e rolados em placas contendo meio mínimo, para retirar os conídios aderentes e as células de Hülle. Cada peritécio isolado foi então transferido para tubos de ensaio, contendo solução de tween, onde foi esmagado contra as paredes do tubo. Com a mesma pipeta utilizada para o esmagamento, as paredes do tubo foram lavadas, suspendendo desse modo os ascósporos na solução de tween. De cada suspensão semeou-se 0,1 ml em placas de MC, e a suspensão restante foi conservada em refrigerador. As placas foram incubadas por 72 horas, após o que foi possível verificar se os peritécios eram híbridos ou não.

Para cada cruzamento, um ou mais peritécios híbridos foram escolhidos e os ascósporos semeados em 10 placas contendo MC.

Após 3 a 4 dias foi feita a contagem das colônias de acordo com seus fenótipos para coloração. Placas mestras foram preparadas com essas colônias e, após 3 dias de incubação, estas foram replicadas para as placas de análise.

Após 24, 48 e 72 horas de incubação, fizeram-se leitura das mesmas, anotando-se as colônias que cresceram e as que não cresceram.

Através do número de colônias recombinantes, pôde-se calcular o valor de ligação entre dois loci e o desvio padrão correspondente, aplicando-se as fórmulas:

$$C = \frac{R}{T} \times 100,$$

onde: C = valor de ligação; R = número de colônias recombinantes e T = número de colônias analisadas.

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

onde: s = desvio padrão; p = frequência de recombinantes e N = número total de ascósporos analisados.

Calculando-se o  $\chi^2$  pode-se verificar também se os alelos en-

volvidos no cruzamento segregam na proporção de 1:1. Para isso usou-se a seguinte fórmula:

$$X^2 = \sum \frac{(FO - FE)^2}{FE}$$

onde: FO = frequência observada; FE = frequência esperada.

### 3.8. Teste de heterocário

O teste de heterocário foi efetuado com a finalidade de verificar se o caráter resistência à arginina passava de uma linhagem para outra, ou se perdia quando ambas estivessem em heterocariose e portanto verificar se o caráter era citoplasmático ou nuclear.

A técnica consistiu basicamente em se cruzar duas linhagens, uma linhagem mutante resistente à arginina, obtida por nós, com a linhagem MSE.

Por meio de uma alça de platina, conídios de duas linhagens foram transferidos para tubos de ensaio, contendo 2 ml de MM líquido adicionado de 2% de MC.

Os tubos foram agitados e incubados por 24 horas a 37°C, após o que foram agitados novamente e incubados por mais 48 horas.

Após este período de incubação, formou-se uma película na superfície do meio de cultura, que foi removida e colocada em placas de Petri contendo MM.

A seguir desagregou-se esta película em 4 pedaços, colocando-os em tal disposição na placa de Petri que um pedaço ficasse relativamente longe do outro.

As placas foram incubadas a 37°C por 96 horas, após o que visualizaram-se facilmente regiões heterocarióticas a partir dos pedaços de micélio, no meio de cultura.

Por meio de uma alça de platina foram transferidos conídios das regiões tipicamente heterocarióticas para tubos de ensaio contendo tween.

Após as diluições apropriadas, placas de MC foram semeadas com 0,1 ml desta suspensão e incubadas por 72 horas.

As colônias que cresceram foram então inoculadas em placas de MC (26 colônias/placa) e depois de crescidas, replicadas para placas de MM; MM + todos os requisitos nutricionais das duas linhagens, MM+tudo com exceção de um requisito característico de 1 das linhagens, MM + tudo menos um outro requisito característico da outra linhagem e MM + tudo mais arginina.

Após 48 horas de incubação anotaram-se as colônias que cresceram e as que não cresceram, em cada um dos meios utilizados.

### 3.9. Teste de alelismo

O teste de alelismo foi realizado com a finalidade de verificar se mutações localizadas no mesmo grupo de ligação eram ou não alélicas.

A técnica consistiu em cruzar as duas linhagens que apresentavam mutações no mesmo grupo de ligação. Para obter um heterocário balanceado, foram isolados segregantes meióticos que apresentavam diferentes requisitos nutricionais. A análise de cleistotécios híbridos forneceu evidências das relações de alelismo ou de ligação entre diferentes linhagens com genes supressores da mutação *lys*.

As técnicas para obtenção de heterocários e de cleistotécios estão descritas no item 3.4.3.

Os ascósporos provenientes de cleistotécios híbridos foram inoculados em placas de MC (26 colônias/placas) e, depois de crescidos neste meio, replicados para placas de Petri contendo MM adicionado de todos os requisitos nutricionais das duas linhagens, menos lisina.

As placas foram incubadas por 48 horas, após o que foram anotadas as colônias que cresceram e as que não o fizeram, neste meio de cultura.

### 3.10. Determinação da frequência de mutação

#### a. Frequência de mutação após tratamento com luz ultravioleta

Conídios de cada uma das linhagens, crescidas por 7 dias a 37°C, foram transferidos para uma solução de tween; as cadeias dos mesmos fo-

ram desagregados por agitação e a densidade medida através de um hamatímetro e acertada até que alcançasse aproximadamente  $1 \times 10^7$  conídios/ml. Com 1 ml dessa suspensão, foram feitas diluições em 9 ml de salina e na diluição apropriada; 0,1 ml foi semeado em cada uma de 10 placas de MC, para se determinar o título da solução inicial de conídios (passo a).

Um ml da solução original foi ainda semeado em 10 placas de MM suplementado dos requisitos nutricionais das linhagens mais aquela concentração inibidora de arginina para as linhagens originais. Esse passo (b) teve o objetivo a determinação da frequência de mutação espontânea para resistência à arginina.

Em seguida, 4 ml da solução inicial de conídios foram submetidos à irradiação ultravioleta por um período de tempo que desse 5% de sobrevivência.

Dez placas contendo MC foram então semeadas com 1 ml desta solução, após diluições apropriadas para se determinar o título da solução de conídios, após a irradiação (passo d).

Ainda 1 ml desta suspensão irradiada foi semeada (sem diluição) em dez placas de MM suplementado dos requisitos nutricionais das linhagens e adicionado daquela concentração inibidora de arginina. Esse passo (d) teve por objetivo a determinação da frequência de mutação para resistência à arginina após irradiação.

#### b. Frequência de mutação após tratamento com metano-sulfonato de etila

O procedimento para este experimento foi semelhante àquele usado para determinação da frequência de mutação induzida por luz ultravioleta, descrito no ítem anterior. Somente o tratamento das linhagens com o mutagênico foi modificado, pois no tratamento com EMS, 2 ml da solução original de conídios (sem diluição) foram adicionados de 4 ml de uma solução de EMS 2% e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  em banho-maria por um período de tempo, mostrado pela curva de sobrevivência, que daria 5% de sobrevivência para as linhagens ensaiadas.



### c. Frequência de mutação após tratamento com brometo de etídeo

Também o procedimento para este experimento foi bastante semelhante àquele descrito para a determinação da frequência de mutação induzida por luz ultravioleta (item a).

Aqui, o tratamento com o mutagênico foi diferente. Assim, um ml da solução inicial de conídios (sem diluição) foi colocado em um tubo de ensaio escuro, contendo 9 ml de MM líquido, suplementado com os requisitos nutricionais das linhagens ensaiadas e de brometo de etídeo (5 µg/ml meio).

Esta suspensão foi deixada à temperatura ambiente pelo tempo fixado pela curva de sobrevivência, que fornecesse aproximadamente 5% de conídios sobreviventes.

### 3.11. Ensaio das linhagens para determinação microbiológica de lisina

Cada uma das linhagens ensaiadas, a 118 C e um mutante deficiente para a síntese de lisina e ácido *p*-aminobenzóico mas resistente à arginina (mutante 18), foi inoculada por picada no centro de placas de MC e incubadas por 7 dias a 37°C. Após este tempo, conídios de cada linhagem foram transferidos separadamente para tubos de ensaio, contendo 5 ml de tween, usados para desagregar as cadeias de conídios. Após agitação, as suspensões foram diluídas em solução salina para dar aproximadamente 10<sup>7</sup> conídios/ml, contados com o auxílio de um hematímetro.

Quatro ml de cada uma dessas suspensões foram adicionados a frascos contendo 800 ml de MM, mantidos a 45°C em banho-maria e adicionados de 0,4 ml de uma solução de biotina (AZEVEDO, 1970) e 4 ml de ácido *p*-aminobenzóico por frasco.

Após homogeneizado, 30 ml deste meio foram colocados em cada uma de 25 placas de Petri, de 10 cm de diâmetro.

Após o meio ter solidificado, foi feito um orifício no centro das placas para retirada de meio de cultura, através

de um furador de rolha (o mesmo para todas as placas).

Dentro de cada orifício, 0,1 ml de uma das soluções contendo 5.000, 2.500, 1.250, 625, 312,5, 156,25 ou 0 de lisina foi adicionado.

Foram feitas três repetições para cada concentração de lisina, para cada uma das linhagens.

Após 68 horas, o raio da zona de crescimento foi medido com o auxílio de um compasso, tendo uma das extremidades adaptada a uma rolha de cortiça que se encaixava no orifício no centro das placas.

Este mesmo procedimento foi posteriormente repetido, com uma única diferença, ou seja, a adição de uma solução de arginina no MM suplementado com biotina e ácido p-aminobenzóico, numa concentração tal que resultasse em 800 µg arginina/ml meio.

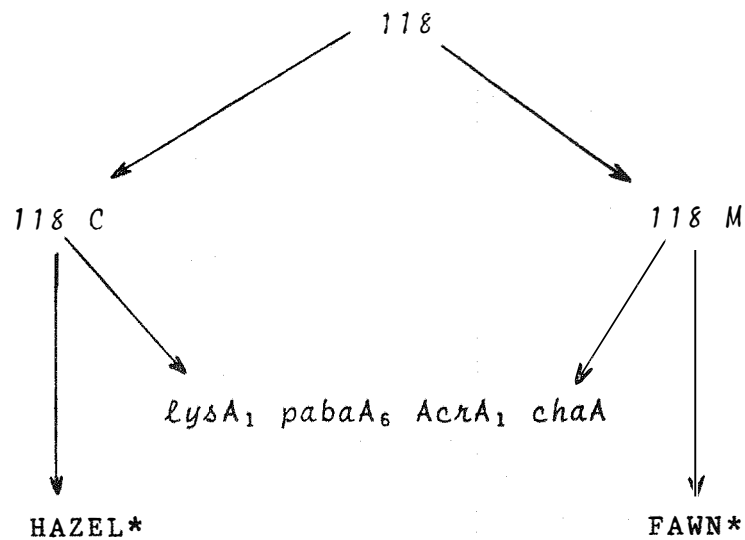


Figura 2 - Ascendência, marcadores e coloração das linhagens 118 C e 118 M.

\*Segundo a tabela de cores de RAYNER, 1970.

#### 4.1.2. Resistência à arginina, nas linhagens 118

A redução do tamanho das colônias das duas linhagens, provocada por concentrações crescentes de arginina, está mostrada nas Tabelas II, III, IV e V e nas Figuras 3, 4, 5 e 6, sendo que as duas primeiras figuras e tabelas se referem aos dados obtidos por inoculação por picada e as últimas a inoculação por microcolônias.

A comparação destes dois métodos de inoculação para cada linhagem se encontra nas Figuras 7 e 8.

Com os dados referentes ao método de semeadura, foi possível a construção de curvas de sobrevivência para as duas linhagens e para uma linhagem *proA1 pabaA6 yA2* tomada como controle.

As Tabelas VI, VII, VIII e a Figura 9 mostram as porcentagens de conídios sobreviventes e as curvas de sobrevivência das referidas linhagens submetidas a concentrações crescentes de arginina.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Ensaio das linhagens

#### 4.1.1. Purificação e teste da linhagem 118

Observando-se as colônias crescidas, quando da semeadura da linhagem 118 para purificação, notou-se o aparecimento de colônias de duas colorações nitidamente diferentes, uma delas semelhante à coloração chartreuse, característica da linhagem originalmente estocada e a outra com uma tonalidade marrom. Concionamos chamar a primeira de 118 C e a segunda 118 M.

As duas linhagens se comportavam da mesma maneira nos ensaios de requisitos nutricionais, ou seja, ambas não apresentaram crescimento quando eram semeadas em MM ou em MM suplementado com lisina ou ácido *p*-aminobenzóico, e cresciam bem quando ao MM tinham sido adicionados os dois requisitos juntos.

Apresentavam também crescimento em meio de cultura onde além dos requisitos nutricionais, era adicionada acriflavina, mostrando assim que além das deficiências para a síntese de lisina e ácido *p*-aminobenzóico, apresentavam também resistência à acriflavina.

A ascendência das linhagens 118 C e 118 M estão na Figura 2.

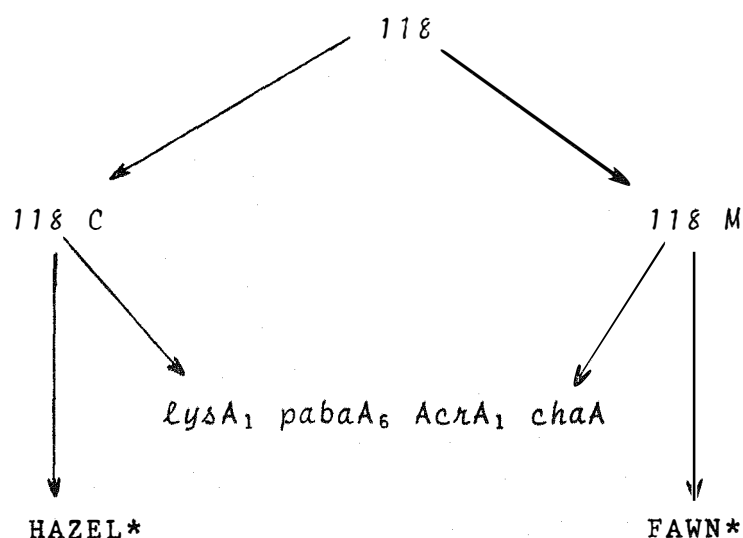


Figura 2 - Ascendência, marcadores e coloração das linhagens 118 C e 118 M.

\*Segundo a tabela de cores de RAYNER, 1970.

#### 4.1.2. Resistência à arginina, nas linhagens 118

A redução do tamanho das colônias das duas linhagens, provocada por concentrações crescentes de arginina, está mostrada nas Tabelas II, III, IV e V e nas Figuras 3, 4, 5 e 6, sendo que as duas primeiras figuras e tabelas se referem aos dados obtidos por inoculação por picada e as últimas a inoculação por microcolônias.

A comparação destes dois métodos de inoculação para cada linhagem se encontra nas Figuras 7 e 8.

Com os dados referentes ao método de semeadura, foi possível a construção de curvas de sobrevivência para as duas linhagens e para uma linhagem *proA<sub>1</sub> pabaA<sub>6</sub> yA<sub>2</sub>* tomada como controle.

As Tabelas VI, VII, VIII e a Figura 9 mostram as porcentagens de conídios sobreviventes e as curvas de sobrevivência das referidas linhagens submetidas a concentrações crescentes de arginina.

Tabela II - Médias dos tamanhos das colônias inoculadas por picada, em meio de cultura com concentrações crescentes de arginina, em 3 experimentos.

Linhagem 118 M

Concentração de arginina (µg/ml meio)	Tamanho da colônia (cm)			Média dos 3 experimentos
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
0	3,5	3,5	3,1	3,4
50	4,0	3,2	3,4	3,5
100	2,6	3,0	2,8	2,8
150	2,3	1,6	2,5	2,1
200	2,3	1,8	2,3	2,1
250	2,1	1,7	1,9	1,9
300	1,3	0,0	0,0	0,4
350	0,0	1,1	0,0	0,3
400	0,0	0,0	0,0	0,0
450	0,0	0,0	0,0	0,0
500	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela III - Médias dos tamanhos das colônias inoculadas por picada, em meio de cultura com concentrações crescentes de arginina, em 3 experimentos.

Linhagem 118 C

Concentração de arginina (µg/ml meio)	Tamanho da colônia (cm)			Média dos 3 experimentos
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
0	2,6	3,2	3,4	3,1
50	3,0	3,5	3,6	3,4
100	4,0	3,3	3,5	3,6
150	3,0	3,1	3,0	3,0
200	2,5	2,3	2,7	2,5
250	2,3	2,4	2,1	2,3
300	2,5	1,3	2,4	2,0
350	0,0	1,6	1,9	1,1
400	2,0	1,1	1,2	1,4
450	0,0	0,8	0,0	0,2
500	0,0	0,5	0,4	0,3

Tabela IV - Médias dos tamanhos das colônias crescidas em meio com concentrações crescentes de arginina e inoculadas pelo método de microcolônias, em 5 experimentos.

Linhagem 118 M

Concentração de arginina (µg/ml meio)	Tamanho da colônia (cm)					Média dos 5 experimentos
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	
0	2,8	3,4	3,4	3,4	3,7	3,3
50	2,8	3,3	3,0	3,1	3,4	3,1
100	2,6	3,6	2,4	2,5	2,9	2,8
150	2,8	3,3	2,0	2,0	2,5	2,5
200	2,0	3,0	1,9	1,7	2,2	2,1
250	0,0	2,2	0,0	1,5	1,8	1,1
300	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	0,3
350	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,2
400	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
450	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
500	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela V - Médias dos tamanhos das colônias crescidas em meio com concentrações crescentes de arginina, inoculadas pelo método de microcolônias, em 5 experimentos.

Linhagem 118 C

Concentração de arginina (µg/ml meio)	Tamanho da colônia (cm)					Média dos 5 experimentos
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	
0	3,0	3,9	3,0	4,0	3,7	3,5
50	3,4	3,5	2,6	3,5	4,1	3,4
100	3,2	4,0	2,7	3,9	3,8	3,5
150	2,8	3,4	2,3	3,4	3,3	3,0
200	2,5	3,0	2,3	3,3	3,3	2,8
250	1,9	2,0	2,0	2,6	3,1	2,3
300	0,9	1,2	0,0	1,0	0,8	0,7
350	0,0	0,0	0,0	1,8	0,0	0,3
400	0,0	0,0	0,0	1,6	0,0	0,3
450	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
500	0,0	1,2	0,0	1,7	1,0	0,7

Tabela VI - Médias e porcentagens relativas de conídios sobreviventes a concentrações crescentes de arginina, em 3 experimentos.

Linagem 118 M

Concentração de arginina ( $\mu\text{g/ml}$ meio)	Conídios viáveis/ml			Porcentagem relativa dos sobreviventes			
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Média
0	$3,7 \times 10^6$	$8,8 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	100,0	100,0	100,0	100,0
50	$4,7 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$8,6 \times 10^5$	12,7	25,0	33,0	23,5
100	$4,6 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	12,4	1,1	8,8	7,4
200	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	$2,0 \times 10^2$	0	0	0,007	0,0023
600	0	$1,0 \times 10^2$	0	0	0,001	0	0,0033
800	0	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	0	0,001	0,003	0,0013



Tabela VII - Médias e porcentagens relativas de conídios sobreviventes a concentrações crescentes de arginina, em 4 experimentos.

Linagem 118 C

Concentração de arginina ( $\mu\text{g/ml}$ meio)	Conídios viáveis/ml				Porcentagem relativa dos sobreviventes				
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Média
0	$4,0 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$11,6 \times 10^6$	$9,6 \times 10^6$	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
50	$4,8 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$13,1 \times 10^6$	$8,1 \times 10^6$	120,0	77,2	112,9	84,3	98,6
100	$5,4 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$13,6 \times 10^6$	$9,9 \times 10^6$	135,0	81,8	117,2	103,1	109,2
200	$4,9 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$11,1 \times 10^6$	$6,9 \times 10^6$	122,5	56,8	95,6	71,8	36,6
400	0	$2,1 \times 10^4$	$15,0 \times 10^5$	$4,6 \times 10^4$	0	0,47	12,9	0,47	3,4
600	0	0	$1,0 \times 10^2$	0	0	0	0	0	0
800	0	0	$2,0 \times 10^2$	0	0	0	0,001	0	0,0002

Tabela VIII - Médias e porcentagens relativas de conídios sobreviventes a concentrações crescentes de arginina.

Linhagem *proA<sub>1</sub> pabaA<sub>6</sub> yA<sub>2</sub>* (controle)

Concentração de arginina (µg/ml meio)	Conídios viáveis/ml	Porcentagem relativa de sobreviventes
0	$6,2 \times 10^6$	100%
50	$5,0 \times 10^6$	80,6%
100	$5,1 \times 10^6$	82,2%
200	$4,3 \times 10^6$	69,3%
400	$5,0 \times 10^6$	80,6%
600	$6,5 \times 10^6$	104,8%
800	$4,5 \times 10^6$	72,5%

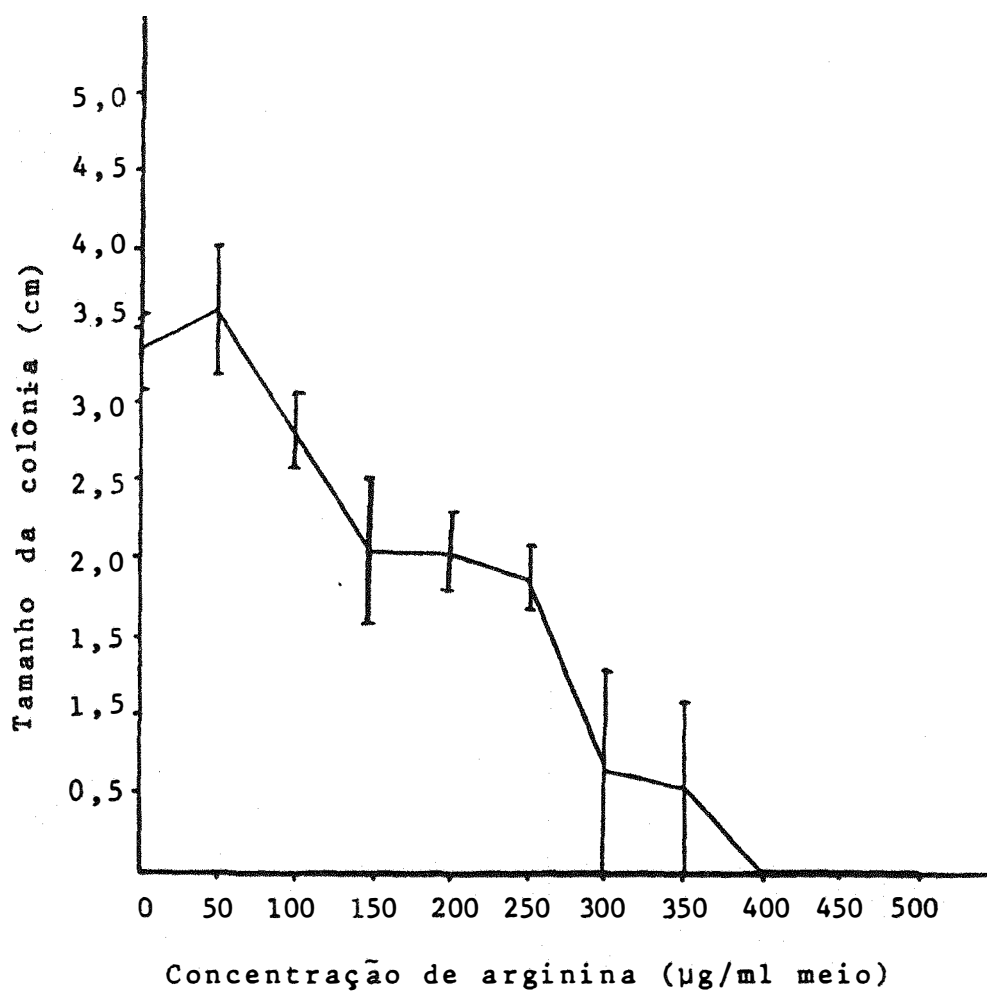


Figura 3 - Tamanho da colônia em concentrações crescentes de arginina.

Método: inoculação por picada.

Linhagem 118 M.

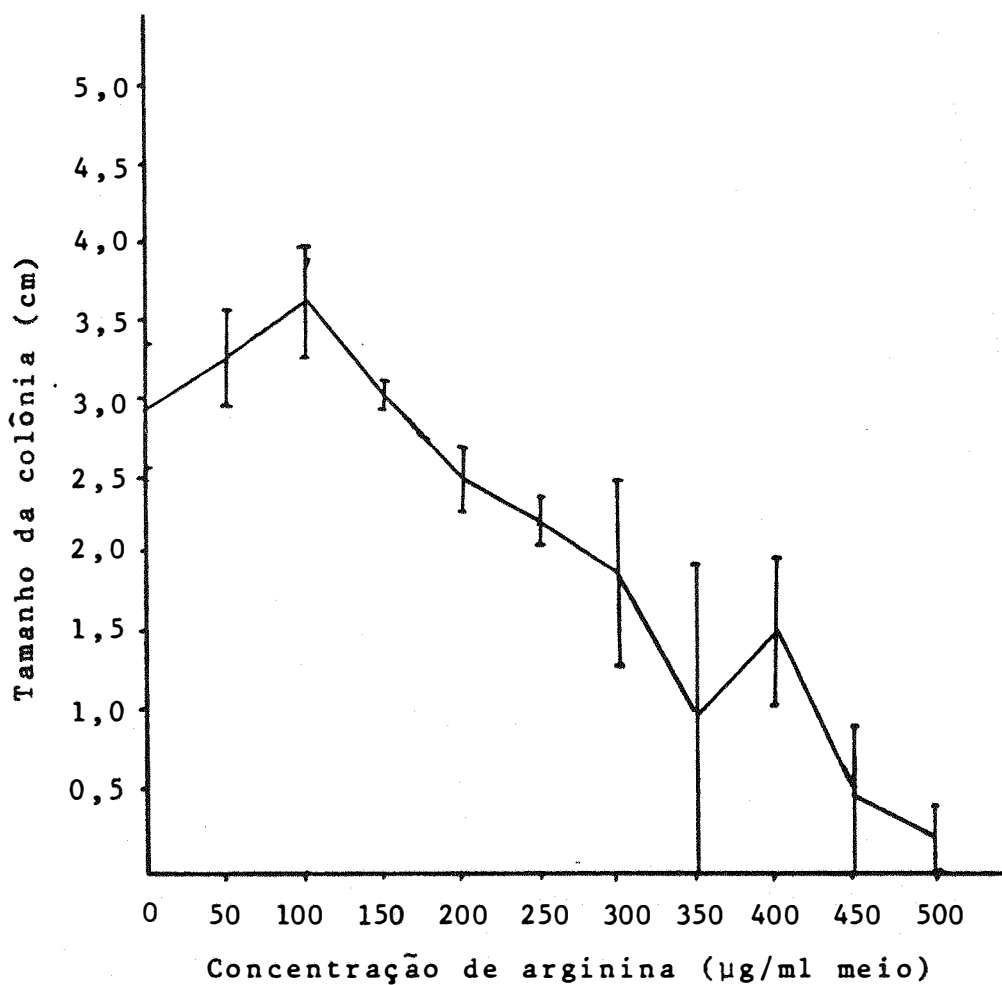


Figura 4 - Tamanho da colônia em concentrações crescentes de arginina.

Método: inoculação por picada.

Linhagem 118 C.

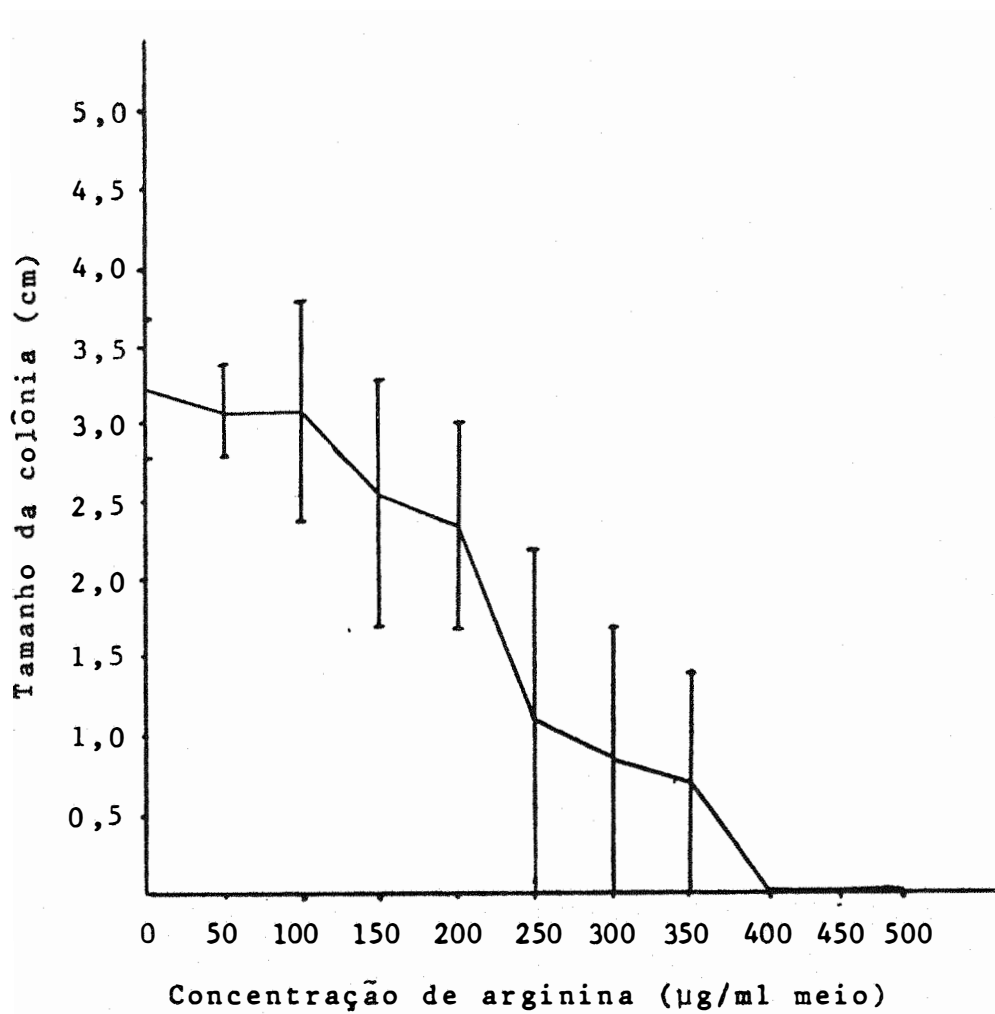


Figura 5 - Tamanho da colônia em concentrações crescentes de arginina.

Método: microcolônias.

Linhagem 118 M.

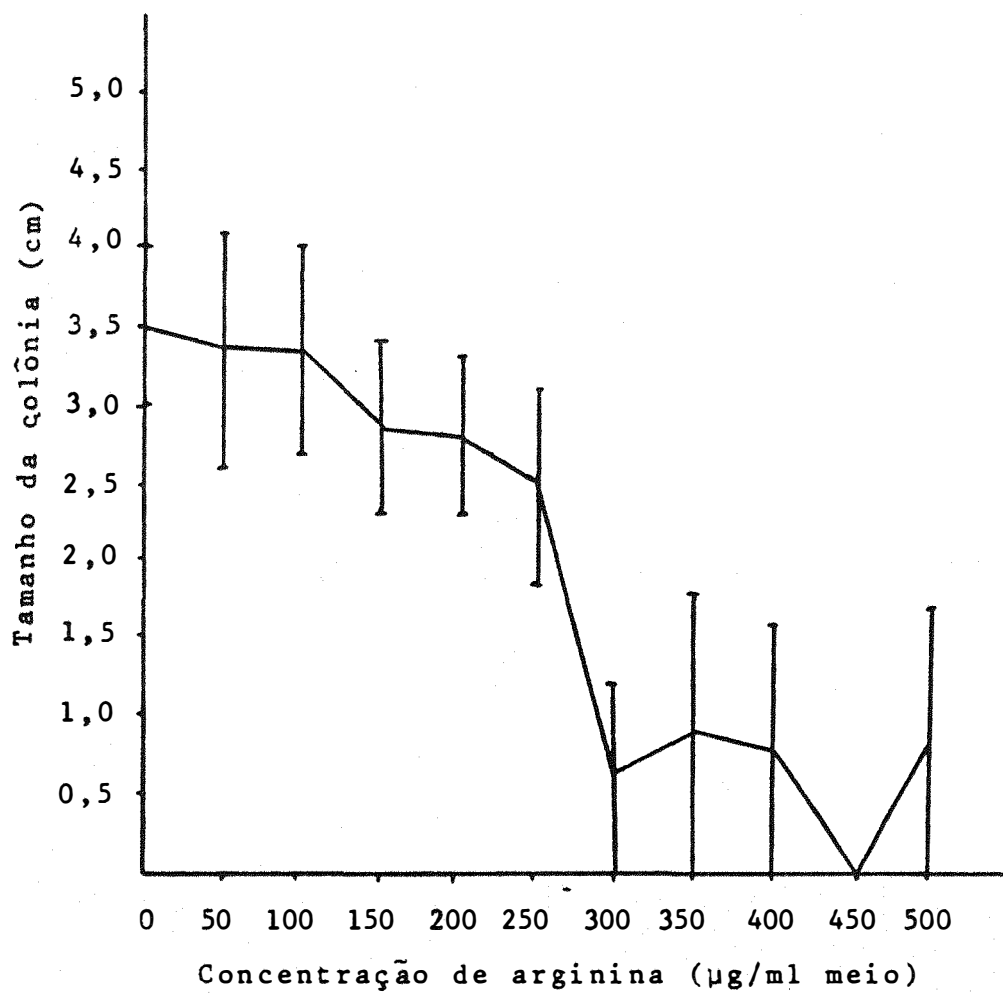


Figura 6 - Tamanho da colônia em concentrações crescentes de arginina.

Método: microcolônias.

Linhagem 118 C.

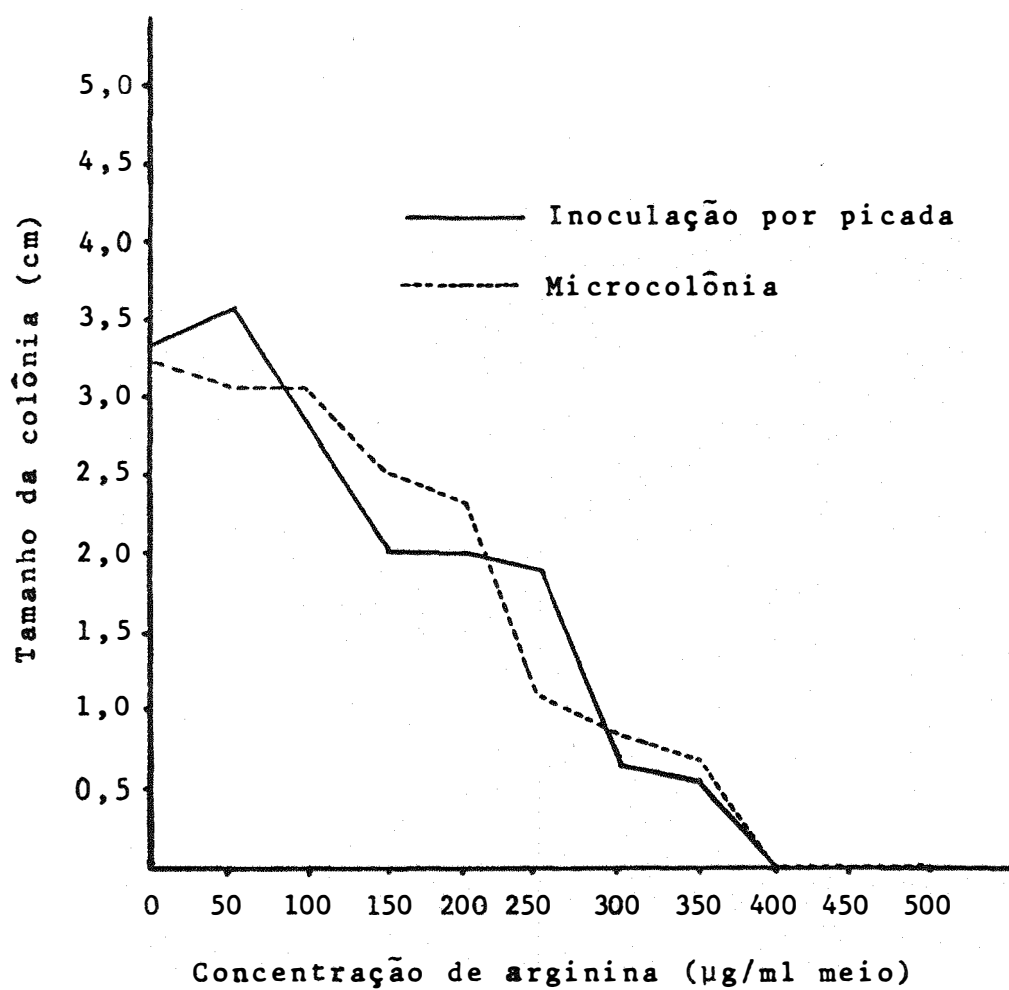


Figura 7 - Comparação do método de inoculação por picada com o de microcolônias.  
Linhagem 118 M.

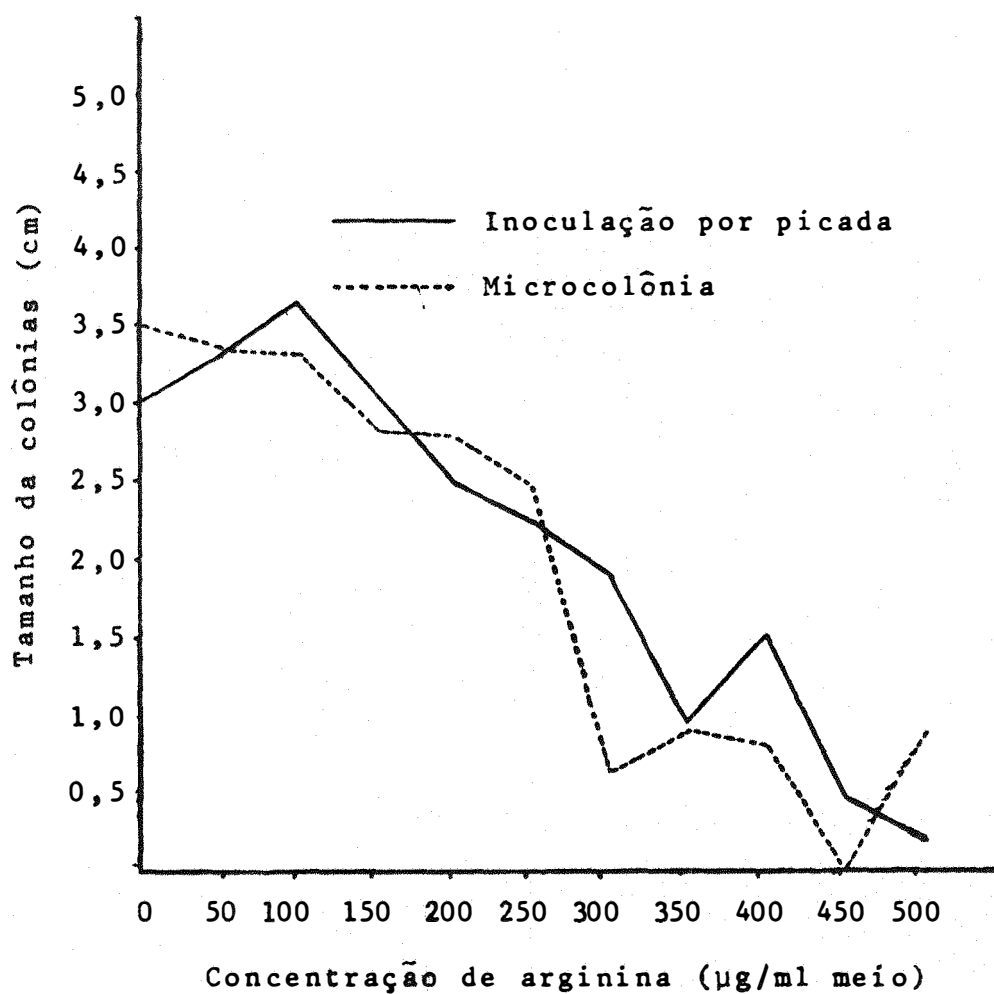
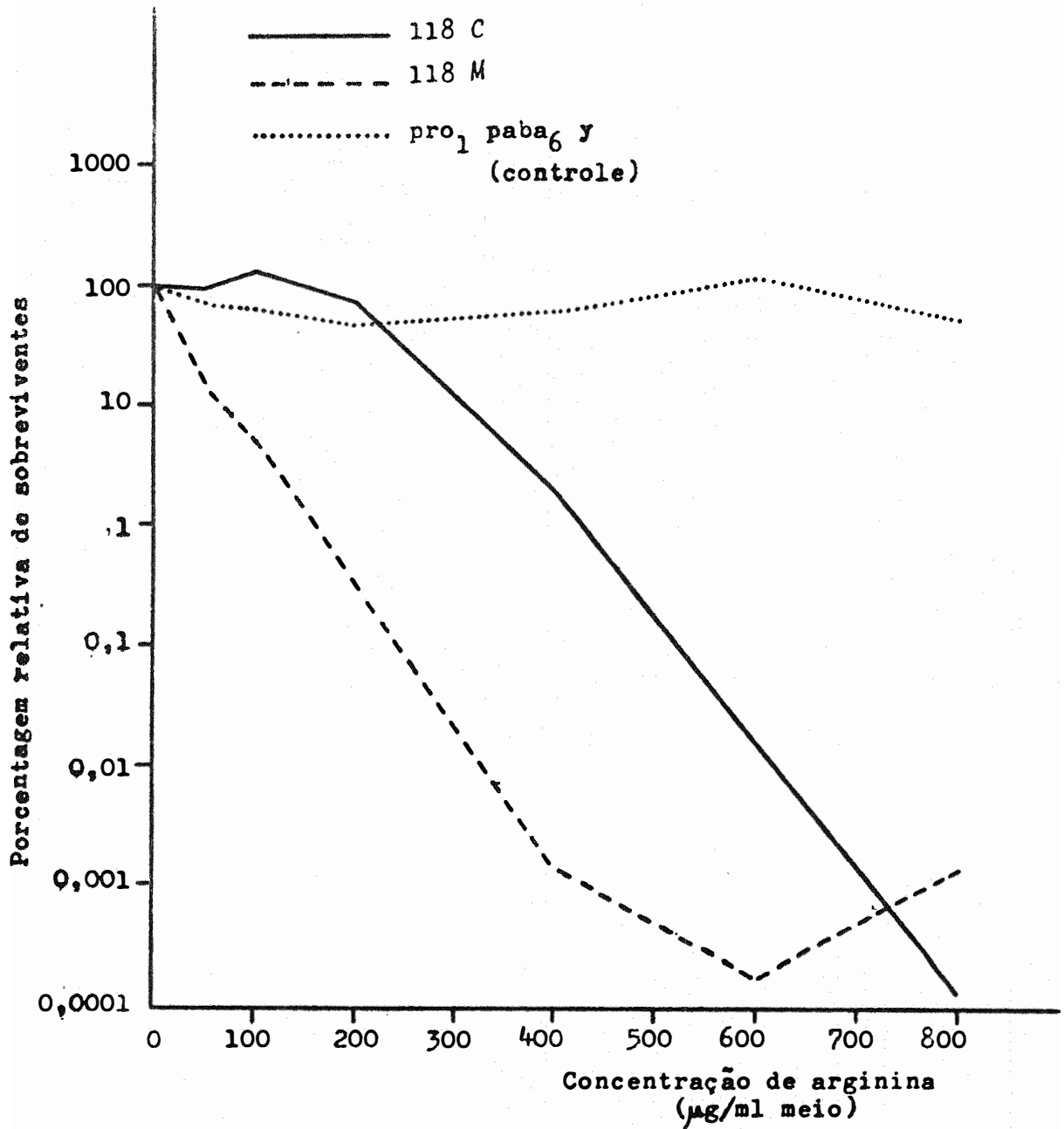


Figura 8 - Comparação do método de inoculação por picada com o de microcolônias.

Linhagem 118 C.





**FIGURA 9** - Curvas de sobrevivência à concentrações crescentes de arginina, para três linhagens.

#### 4.1.3. Análises genéticas das linhagens 118

A análise genética das linhagens 118 C e 118 M foi realizada, cruzando-se cada uma delas com a linhagem MSE, numa tentativa para a elucidação do fenômeno do aparecimento da linhagem marrom, com os mesmos marcadores da 118 chartreuse, no estoque desta última.

As Tabelas IX e XI mostram os segregantes meióticos dos cruzamentos 118 M x MSE e 118 C x MSE, respectivamente, e os valores de  $X^2$  para a segregação 1:1 dos alelos envolvidos.

Foram calculados ainda os valores de recombinação entre os genes  $AcrA_1$  e  $WA_3$  para as duas linhagens, e seus valores também constam das Tabelas IX e XI.

As Tabelas X e XII mostram os resultados das análises mitóticas das duas linhagens cruzadas com a MSE. Nestas, constam, para cada marcador, o número de colônias, subdividido em 3 classes, de acordo com a coloração das mesmas. Na classe denominada de normais constam as colônias brancas, amarelas e chartreuse; na denominada MI, colônias que, apesar de apresentarem conídios brancos, têm uma coloração marrom intermediária, a qual corresponde ao "*Vinaceus buff*" da tabela de cores de RAYNER (1970).

Na 3a. classe estão aqueles segregantes ME; marrom escuro - que corresponde a cor "Fawn" da tabela de RAYNER - e que apresentam conídios chartreuse.

Tabela IX - Análise meiótica da Linhagem 118 M

Grupo de ligação	marcadores	segregantes	$\chi^2$ (p/segregação 1:1)
I	<i>paba</i>	25	1,98 n.s.
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	36	
II	<i>w</i>	196	0,21 n.s.
	<i>w</i> <sup>+</sup>	167	
	<i>acr</i> <sup>R</sup>	17	
	<i>acr</i> <sup>+</sup>	44	
III	<i>gal</i>	28	0,40 n.s.
	<i>gal</i> <sup>+</sup>	33	
IV	<i>pyro</i>	26	1,32 n.s.
	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	35	
V	<i>fac</i>	32	0,14 n.s.
	<i>fac</i> <sup>+</sup>	29	
	<i>lys</i>	11	
	<i>lys</i> <sup>+</sup>	50	
VI	<i>s</i>	29	0,14 n.s.
	<i>s</i> <sup>+</sup>	32	
VII	<i>nic</i>	29	0,14 n.s.
	<i>nic</i> <sup>+</sup>	32	
VIII	<i>ribo</i>	24	2,76 n.s.
	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	37	

n.s. - não significativo

\* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

\*\* - significativo ao nível de 1% de probabilidade

C ACrA<sub>1</sub> - WA<sub>3</sub> = 24,59% ± 5%

Tabela X - Análise mitótica de linhagem 118 M

118 M x MSE				
Grupo de ligação	Marcadores	N	Número de setores	
			ME	MI
I	<i>paba</i>	19	7	8
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	20	6	8
II	<i>w</i>	32	0	16
	<i>w</i> <sup>+</sup>	7	13	0
III	<i>gal</i>	27	6	9
	<i>gal</i> <sup>+</sup>	12	7	7
IV	<i>pyro</i>	9	0	2
	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	30	13	14
V	<i>fac</i>	30	12	11
	<i>fac</i> <sup>+</sup>	9	1	5
VI	<i>lys</i>	4	0	16
	<i>lys</i> <sup>+</sup>	35	13	0
VII	<i>s</i>	23	9	6
	<i>s</i> <sup>+</sup>	16	4	10
VIII	<i>nic</i>	0	0	0
	<i>nic</i> <sup>+</sup>	39	13	16
VIII	<i>ribo</i>	16	1	4
	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	23	12	12

Tabela XI - Análise meiótica da linhagem 118 C

118 C x MSE			
Grupo de ligação	marcadores	segregantes	X <sup>2</sup> (p/segregação 1:1)
I	<i>paba</i>	31	0,06 n.s.
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	29	
II	<i>w</i>	164	0,62 n.s.
	<i>w</i> <sup>+</sup>	150	
III	<i>acr</i>	24	2,40 n.s.
	<i>acr</i> <sup>+</sup>	36	
IV	<i>gal</i>	31	0,06 n.s.
	<i>gal</i> <sup>+</sup>	29	
V	<i>pyro</i>	31	0,06 n.s.
	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	29	
VI	<i>fac</i>	26	1,06 n.s.
	<i>fac</i> <sup>+</sup>	34	
VII	<i>lys</i>	16	13,06**
	<i>lys</i> <sup>+</sup>	44	
VIII	<i>s</i>	34	1,06 n.s.
	<i>s</i> <sup>+</sup>	26	
IX	<i>nic</i>	31	0,06 n.s.
	<i>nic</i> <sup>+</sup>	29	
X	<i>ribo</i>	26	1,06 n.s.
	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	34	

n.s. - não significativo

\*\* - significativo ao nível de 1% de sobrevivência

C ACrA<sub>1</sub> - WA<sub>3</sub> \* 21,66% ± 5%

Tabela XII - Análise mitótica da linhagem 118 C

118 C x MSE				
Grupo de ligação	Marcadores	Número de setores		
		Normais	ME	MI
I	<i>paba</i>	19	1	10
	<i>paba</i> <sup>+</sup>	21	0	19
II	<i>w</i>	32	0	29
	<i>w</i> <sup>+</sup>	8	1	0
III	<i>gal</i>	17	1	17
	<i>gal</i> <sup>+</sup>	23	0	12
IV	<i>pyro</i>	3	0	3
	<i>pyro</i> <sup>+</sup>	37	1	26
V	<i>fac</i>	33	1	7
	<i>fac</i> <sup>+</sup>	7	0	22
	<i>lys</i>	5	0	29
	<i>lys</i> <sup>+</sup>	35	1	0
VI	<i>s</i>	14	1	17
	<i>s</i> <sup>+</sup>	25	0	12
VII	<i>nic</i>	2	1	2
	<i>nic</i> <sup>+</sup>	38	0	27
VIII	<i>ribo</i>	5	0	29
	<i>ribo</i> <sup>+</sup>	36	1	0

#### 4.1.4. Ensaio do nível de requisito para lisina

Ainda, numa tentativa de explicação para as diferentes colorações apresentadas pelas 2 linhagens, 118 C e 118 M, de mesmos marcadores genéticos ensaiou-se as mesmas, quanto às suas necessidades de lisina.

As Tabelas XIII e XIV mostram os diâmetros das colônias de cada uma dessas linhagens, após 3, 4, 5 e 6 dias da inoculação em diferentes concentrações de lisina. Apresentam também a porcentagem de crescimento dessas colônias, em relação ao crescimento em MC.

As Figuras 10, 11, 12 e 13 mostram as porcentagens de crescimento em relação à concentração de lisina, nos diferentes dias, sendo que o crescimento em MC foi considerado como 100% de crescimento. A Tabela XV e a Figura 14 mostram as porcentagens de crescimento de dois segregantes dos cruzamentos 118 C x MSE e 118 M x MSE; respectivamente nº 33 e 41, ambos MI e *lys<sup>-</sup>* nas concentrações de 4,0; 8,0 e 16,0 µg lisina e após 3 dias da inoculação, já que a diferença entre as duas linhagens parentais é mais marcante neste pontos.

Dos 35 ascósporos ensaiados, originados de um cleistotécio, resultante do cruzamento dos dois segregantes entre si, inoculados em placas com uma concentração de lisina de 8,0 µg/placa e que tiveram seus diâmetros medidos após 3 dias da inoculação, conseguiu-se 20 colônias com o diâmetro maior que 2 cm (de 2,0 a 2,4 cm) e 15 colônias com diâmetro menor que 2,0 cm (de 1,9 a 1,5 cm).

O resultado do  $\chi^2$  de 0,70 (n.s.) nos indicou uma provável segregação 1:1, mostrando que existem dois tipos de deficiência para a síntese de lisina, uma mais drástica (proveniente do segregante da 118 M) e outra menos drástica (proveniente do segregante da 118 C).

Tabela XIII - Diâmetros das colônias (cm) e porcentagens de crescimento da linhagem 118 C, em diferentes concentrações de lisina e após diferentes tempos de incubação.

Tempo de incubação (dias)	Concentração de lisina (µg/20 ml MM)							Controle MC	
	2,0	4,0	8,0	16,0	32,0	64,0	128,0		
3	Repetições	0,9; 0,7	0,9; 1,0	2,0; 2,3	2,0; 2,1	2,0; 2,3	2,0; 1,9	1,8; 1,9	2,7; 2,8
	$\bar{X}$	0,80	0,95	2,15	2,05	2,15	1,95	1,85	2,75
	%	29,09	34,54	78,18	74,54	78,18	70,90	67,27	100
4	Repetições	0,7; 1,0	1,0; 1,1	2,8; 2,1	2,7; 2,4	3,1; 2,9	2,5; 2,6	2,5; 2,2	4,5; 4,7
	$\bar{X}$	0,85	1,05	2,45	2,55	3,00	2,55	2,35	4,60
	%	18,47	22,82	53,26	55,43	65,21	55,43	51,08	100
5	Repetições	0,7; 1,0	1,2; 1,1	3,0; 2,2	2,6; 2,9	3,7; 3,9	3,2; 3,2	2,9; 2,6	5,7; 5,9
	$\bar{X}$	0,85	1,15	2,60	2,75	3,80	3,20	2,75	5,80
	%	14,65	19,82	44,82	47,41	65,51	55,17	47,41	100
6	Repetições	0,7; 1,0	1,3; 1,1	3,2; 2,2	2,7; 3,0	5,2; 4,9	4,2; 4,2	3,7; 3,5	7,3; 7,5
	$\bar{X}$	0,85	1,20	2,70	2,85	5,05	4,20	3,60	7,40
	%	11,48	16,21	36,48	38,51	68,24	56,75	48,64	100



Tabela XIV - Diâmetros das colônias (cm) e porcentagens de crescimento da linhagem 118 M em diferentes concentrações de lisina após diferentes tempos de incubação.

Tempo de incubação (dias)	Concentração de lisina (µg/20 ml MM)										Controle MC	
	2,0	4,0	8,0	16,0	32,0	64,0	128,0					
3	Repetições	0,5; 0,6	1,3; 1,1	1,7; 2,0	2,3; 2,2	3,1; 2,9	3,0; 3,0	2,6; 2,6				3,8; 3,6
	$\bar{X}$	0,55	1,20	1,85	2,25	3,00	3,00	2,60				3,70
	%	14,86	32,70	50,00	60,81	81,08	81,08	70,27				100
4	Repetições	0,7; 0,6	1,0; 1,5	2,2; 1,9	2,7; 2,7	3,5; 3,9	4,0; 4,0	3,5; 3,4				5,7; 5,4
	$\bar{X}$	0,65	1,25	2,05	2,70	3,70	4,00	3,45				5,55
	%	11,71	22,52	36,93	48,64	66,66	72,07	62,16				100
5	Repetições	0,8; 0,7	1,1; 1,6	2,0; 2,4	3,0; 2,9	4,1; 4,7	4,8; 4,8	4,2; 4,0				7,0; 6,8
	$\bar{X}$	0,75	1,35	2,20	2,95	4,40	4,80	4,10				6,90
	%	10,86	19,56	31,88	42,75	63,76	69,56	59,42				100
6	Repetições	0,8; 0,7	1,7; 1,2	2,5; 2,2	2,9; 3,2	5,2; 6,4	6,2; 6,2	5,2; 5,0				8,5; 8,3
	$\bar{X}$	0,75	1,45	2,35	3,05	5,80	6,20	5,10				8,40
	%	8,92	17,26	27,97	36,30	69,04	73,80	60,71				100

Tabela XV - Diâmetros das colônias (cm) e porcentagem de crescimento de dois segregantes dos cruzamentos das linhagens originais com a MSE, frente a diferentes concentrações de lisina, após 3 dias de incubação.

Concentração de lisina ( $\mu\text{g/ml}$ )	Segregante da 118 C x MSE			Segregante da 118 M x MSE		
	Diâmetros das colônias		% de cres- cimento	Diâmetros das colônias		% de cres- cimento
	Repet.	$\bar{X}$		Repet.	$\bar{X}$	
4,00	0,90	1,00	37,00	1,20	1,10	30,00
	1,10			1,00		
8,00	2,20	2,25	83,00	1,90	1,80	50,00
	2,30			1,70		
16,00	2,20	2,15	79,00	2,30	2,20	61,00
	2,10			2,10		
MC	2,70	2,70	100,00	3,60	3,60	100,00
	2,70			3,60		

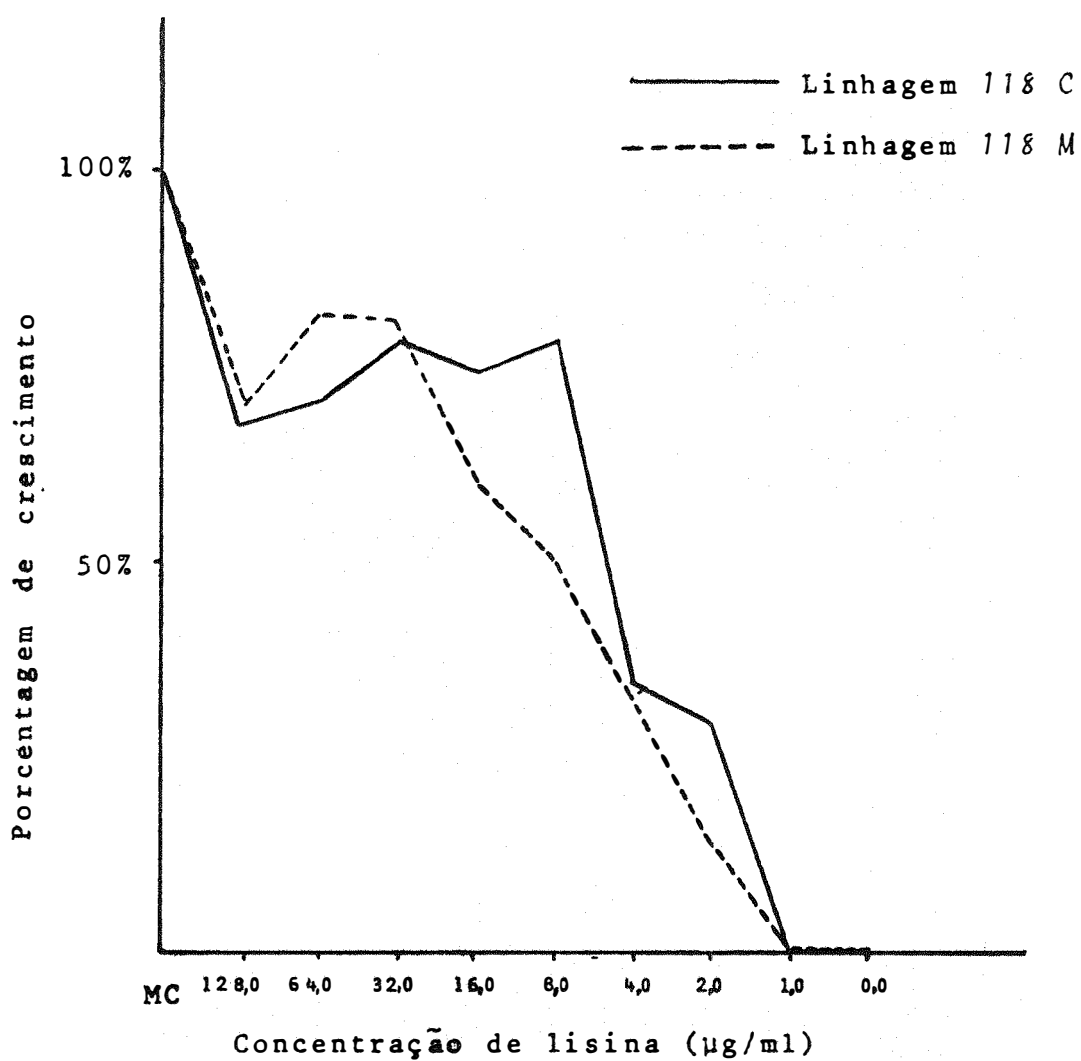


Figura 10 - Porcentagem de crescimento das duas linhagens 118 C e 118 M, em diferentes concentrações de lisina, 3 dias após inoculação.

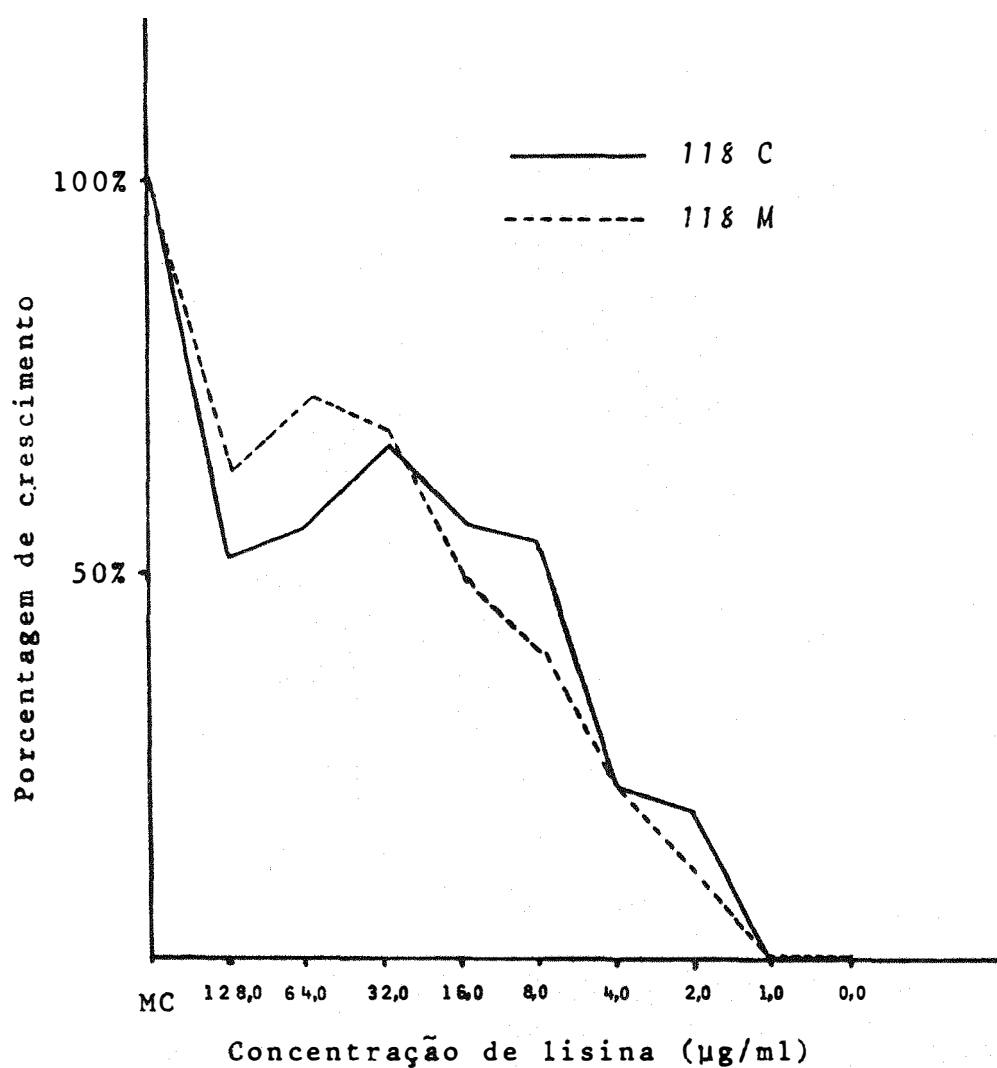


Figura 11 - Porcentagens de crescimento das duas linhagens 118 C e 118 M em diferentes concentrações de lisina, 4 dias após inoculação.

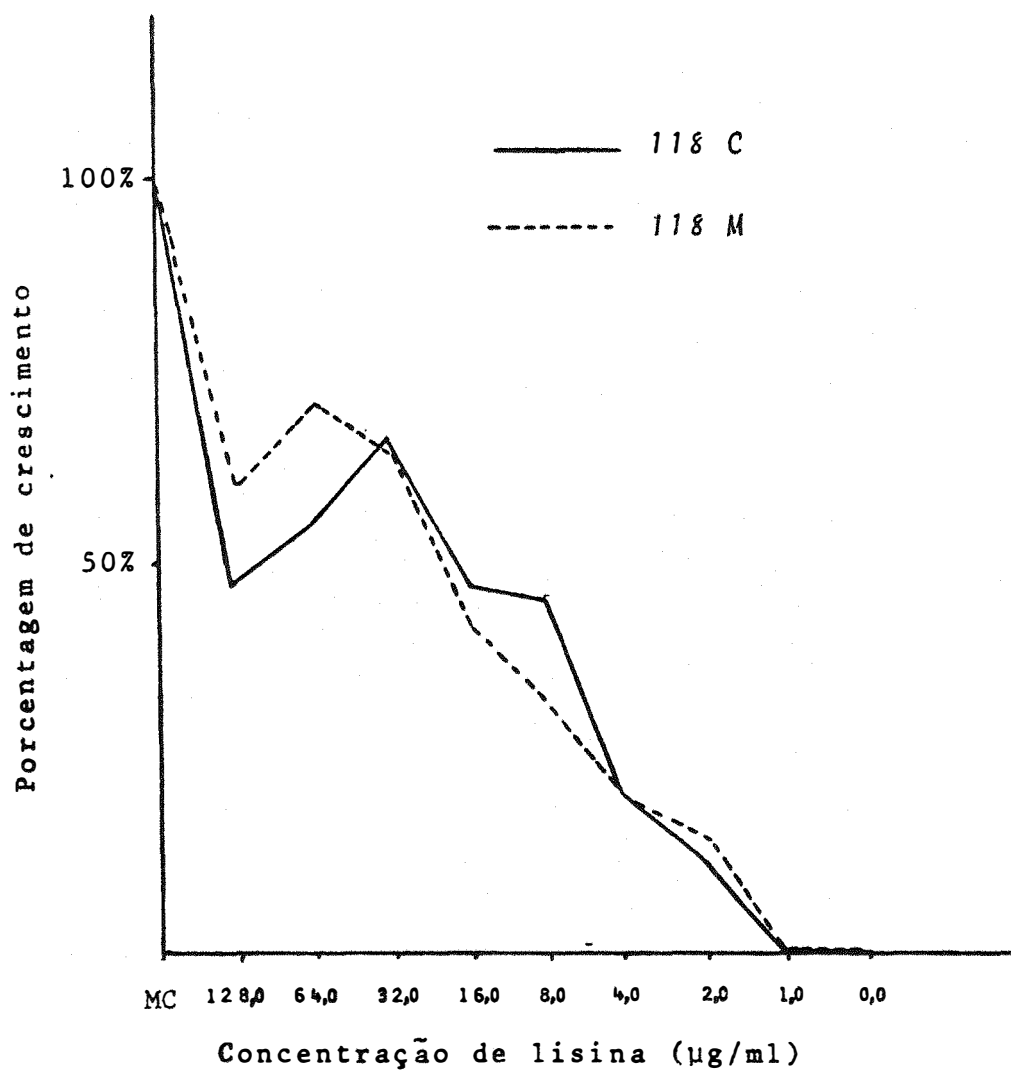


Figura 12 - Porcentagem de crescimento das duas linhagens 118 C e 118 M em diferentes concentrações de lisina, 5 dias após inoculação.

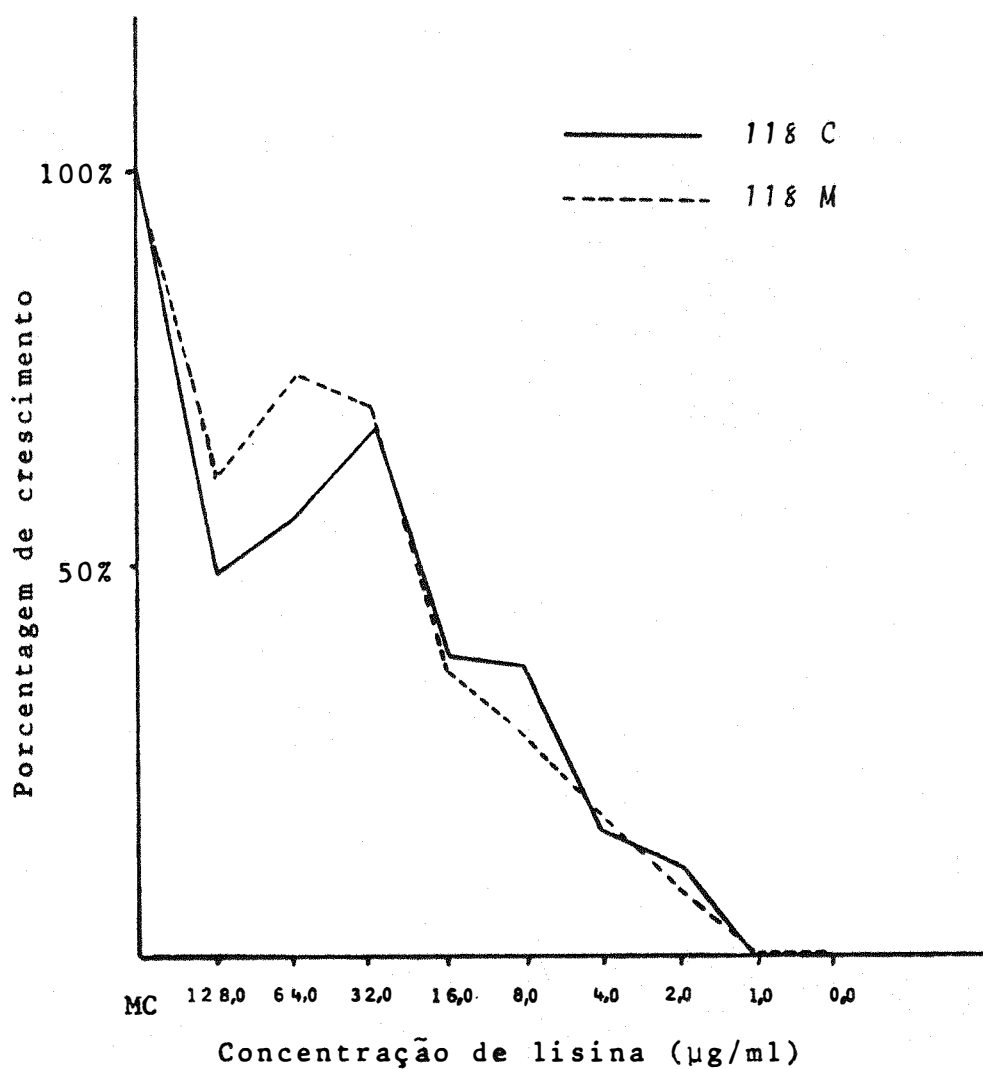


Figura 13 - Porcentagem de crescimento das duas linhagens 118 C e 118 M em diferentes concentrações de lisina, 6 dias após inoculação.

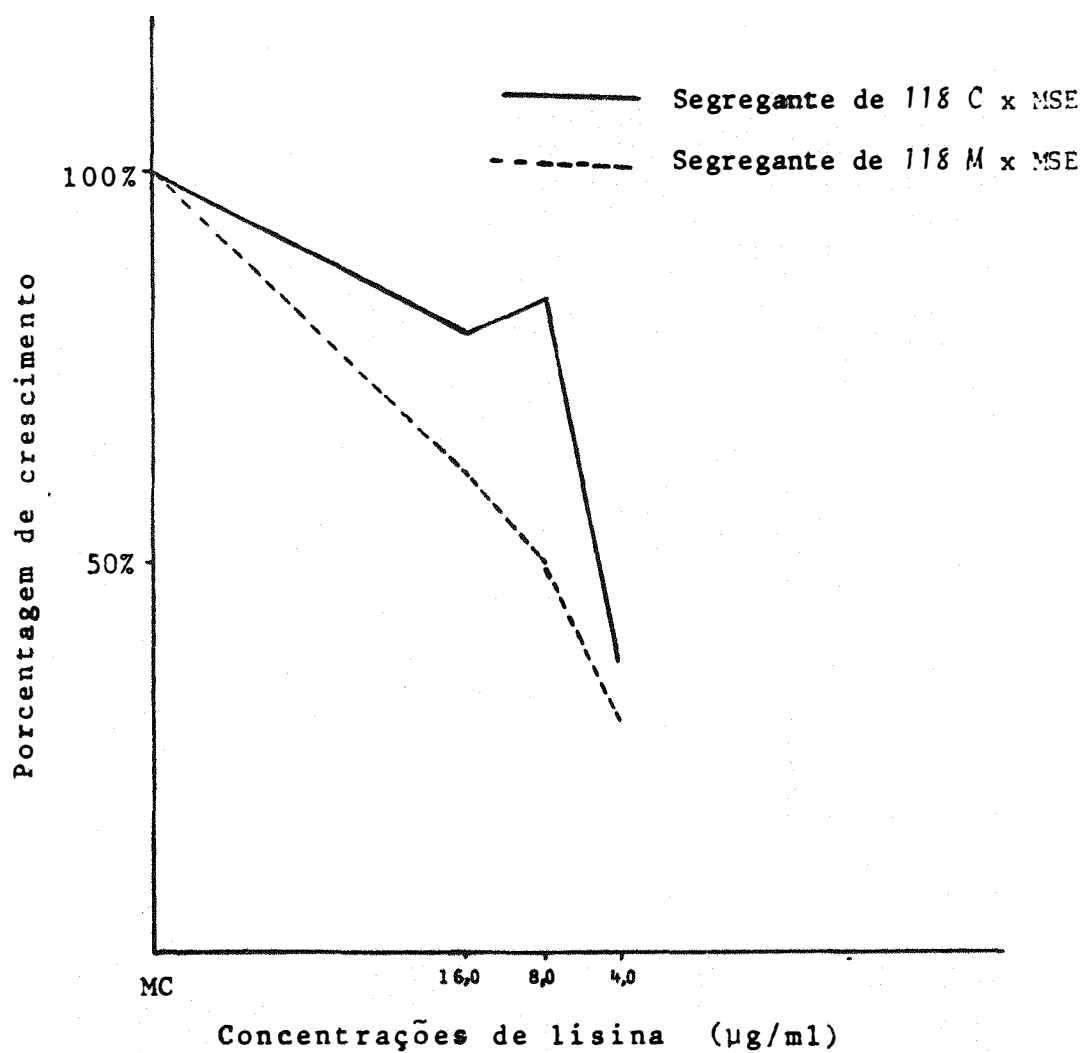


Figura 14 - Porcentagem de crescimento de dois segregantes *lys*<sup>-</sup>, em três diferentes concentrações de lisina, após 3 dias de inoculação.

#### 4.2. Obtenção espontânea de mutantes resistentes à arginina

Pelo método de semeadura, foi determinado que a concentração de arginina a ser usada para o isolamento dos mutantes seria a de 800 µg/ml de meio, concentração esta que mostrou ser bastante efetiva na inibição do crescimento dos conídios das duas linhagens.

De quatro experimentos feitos inicialmente, conseguiu-se isolar 63 mutantes que apresentavam a capacidade de crescer em 800 µg de arginina/ml meio de cultura.

Estes mutantes foram retestados, quanto à resistência à arginina, e ensaiados quanto aos seus requisitos nutricionais. Todos esses mutantes além de crescerem em MM suplementado de lisina e ácido p-aminobenzóico, cresceram também neste meio adicionado de arginina e em MM suplementado só com ácido p-aminobenzóico.

Um desses mutantes apresentava morfologia completamente diferente daquela da linhagem original, apresentando coloração branca e colônia compacta com reduzida conidiação. Este mutante, juntamente com outros quatro de morfologia normal, não tinha a propriedade de crescer em MM suplementado só com ácido p-aminobenzóico, indicando que, ao contrário da maioria, era ainda deficiente para a síntese de lisina.

Todos os mutantes foram também ensaiados pela mesma metodologia anterior para níveis mais altos de arginina: 1.000, 1.200, 1.400 e 1.600 µg/ml de meio de cultura, e todos apresentaram crescimento.



#### 4.3. Obtenção induzida de mutantes resistentes à arginina

##### 4.3.1. Curvas de sobrevivência a mutagênicos

###### a. Curvas de sobrevivência à luz ultravioleta

Em virtude do tratamento dos conídios à exposições crescentes de luz ultravioleta, foi possível a construção de curvas de sobrevivência para as duas linhagens ensaiadas.

As Tabelas XVI e XVII mostram: a média de conídios viáveis por placa, as diluições usadas, o número de conídios viáveis por ml e a porcentagem relativa de sobreviventes para cada linhagem.

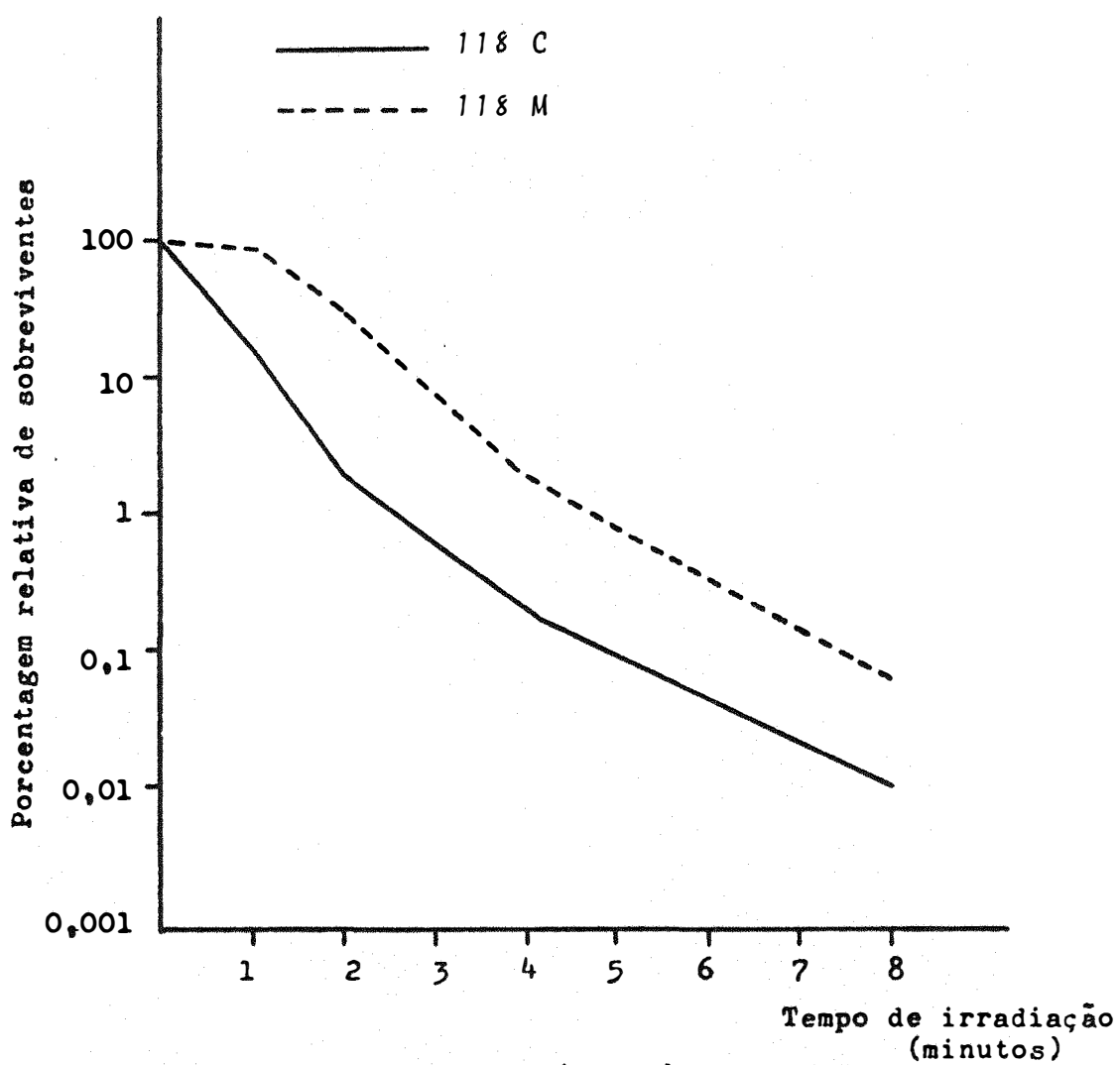
A Figura 15 mostra as curvas de sobrevivência das referidas linhagens, submetidas à luz ultravioleta, em tempos crescentes.

Tabela XVI - Números e porcentagens relativas de conídios sobreviventes ao tratamento com ultravioleta para a linhagem 118 C.

Tempo de irradiação (minutos)	Diluição	$\bar{X}$ colônias/placa	Conídios viáveis (ml)	Porcentagem relativa de sobreviventes
0	$10^{-3}$	139,6	$16,96 \times 10^5$	100,00
1	$10^{-3}$ $10^{-2}$	58,0 221,5	$4,00 \times 10^5$	28,77
2	$10^{-3}$ $10^{-2}$	4,0 55,5	$0,48 \times 10^6$	3,45
4	$10^{-2}$ $10^{-1}$	8,0 4,0	$0,052 \times 10^5$	0,37
8	$10^{-1}$ s.d.	1,5 1,3	$0,0014 \times 10^5$	0,01

Tabela XVII - Números e porcentagens relativas de conídios sobreviventes ao tratamento com ultravioleta para a linhagem 118 M.

Tempo de irradiação (minutos)	Diluição	$\bar{X}$ colônias/placa	Conídios viáveis (ml)	Porcentagem relativa de sobreviventes
0	$10^{-3}$ $10^{-2}$	26,6 164,6	$2,15 \times 10^5$	100,000
1	$10^{-3}$ $10^{-2}$	25,0 129,0	$1,89 \times 10^5$	90,470
2	$10^{-3}$ $10^{-2}$	9,5 114,5	$1,04 \times 10^5$	49,520
4	$10^{-2}$ $10^{-1}$	9,5 55,5	$0,075 \times 10^5$	3,570
8	$10^{-1}$ s.d.	1,5 1,8	$0,0016 \times 10^5$	0,076



**FIGURA 15-** Curvas de sobrevivência à irradiação ultra-violeta para as duas linhagens: 118 C e 118 M.

b. Curvas de sobrevivência ao metano-sulfonato de etila

Com os resultados do tratamento dos conídios das duas linhagens com metano-sulfonato de etila, foram construídas as curvas de sobrevivência ao mesmo (Figura 16).

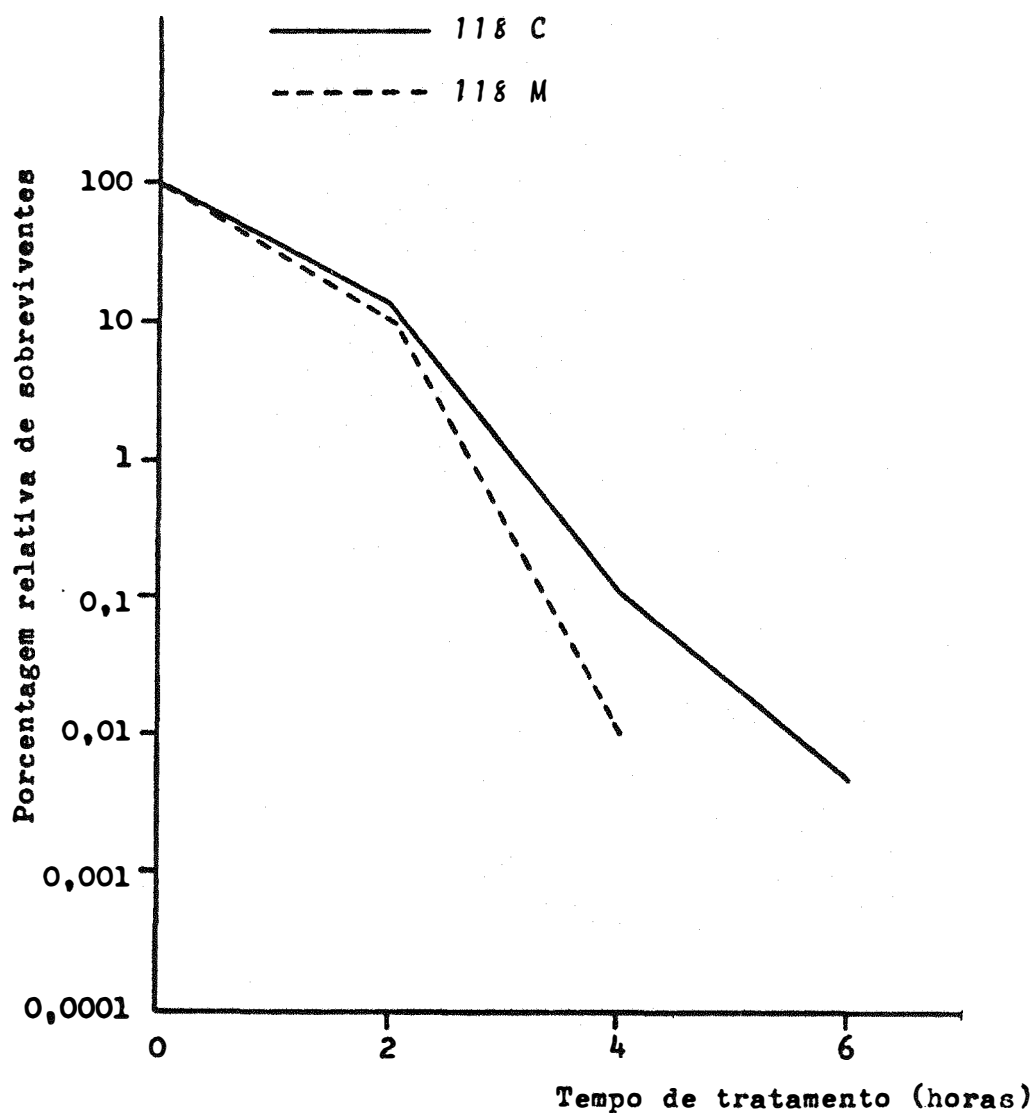
As Tabelas XVIII e XIX mostram: a média de conídios por placa, as diluições usadas, o número de conídios viáveis por ml e a porcentagem relativa de conídios sobreviventes para ca da linhagem.

Tabela XVIII - Números e porcentagens relativas de conídios sobreviventes ao tratamento com EMS para a linhagem 118 C.

Tempo de tratamento (horas)	Diluição	$\bar{X}$ colônias/placa	Conídios viáveis (ml)	Porcentagem relativa de sobreviventes
0	$10^{-3}$	30,33	$3,03 \times 10^6$	100,000
2	$10^{-3}$	5,33	$0,61 \times 10^5$	20,130
	$10^{-2}$	69,33		
4	$10^{-2}$	0,50	$0,004 \times 10^5$	0,132
	$10^{-1}$	3,00		
6	$10^{-2}$	0,00	0,0002	0,006
	$10^{-1}$	0,00		
	s.d.	2,00		

Tabela XIX - Números e porcentagens relativas de conídios sobreviventes ao tratamento com EMS para a linhagem 118 M.

Tempo de tratamento (horas)	Diluição	$\bar{X}$ colônias/placa	Conídios viáveis (ml)	Porcentagem relativa de sobreviventes
0	$10^{-3}$	27,00	$2,7 \times 10^5$	100,000
2	$10^{-3}$	3,33	$0,30 \times 10^5$	11,110
	$10^{-2}$	28,33		
4	$10^{-2}$	0,00	$0,00033 \times 10^5$	0,012
	$10^{-1}$	0,33		
6	$10^{-2}$	0,00	0,00000	0,000
	$10^{-1}$	0,00		
	s.d.	0,00		



**FIGURA 16-** Curvas de sobrevivência ao tratamento com metano-sulfonato de etila para as linhagens 118 C e 118 M.

### c. Curvas de sobrevivência ao brometo de etídeo

Testando-se inicialmente a concentração de brometo de etídeo, que resultaria em 5 - 10% de sobrevivência nas linhagens 118 C, observou-se em três experimentos consecutivos, que não havia uma diminuição significativa no número de colônias sobreviventes, quando se aumentava a concentração de brometo de etídeo no meio de cultura.

Pensou-se então que poderia estar ocorrendo, nesta linhagem, resistência cruzada entre acriflavina e brometo de etídeo, ambas acridinas.

Como as linhagens 118 C e 118 M apresentam resistência à acriflavina, selecionaram-se então segregantes do cruzamento de cada uma das linhagens 118 C e 118 M com a MSE, que ainda conservassem os marcadores *lys* e *paba*, mas que fossem sensíveis à acriflavina.

Os segregantes ensaiados foram os de número 32 e 46, originados respectivamente dos cruzamentos 118 C x MSE e 118 M x MSE.

Os resultados obtidos acham-se na Tabela XX e, tendo-os por base, fixou-se a concentração de brometo de etídeo a ser usada na obtenção da curva de sobrevivência em diferentes tempos de tratamento, em 5,0 µg/ml de meio de cultura.

Em virtude do tratamento dos conídios das linhagens 32 e 46 a exposições crescentes ao brometo de etídeo, foi possível construir-se curvas de sobrevivência para as linhagens ensaiadas.

As Tabelas XXI e XXII mostram: a média de conídios viáveis por placa, as diluições usadas, o número de conídios viáveis por ml e a porcentagem relativa de sobreviventes para cada linhagem.

A Figura 17 mostra as curvas de sobrevivência das referidas linhagens, submetidas a um tempo de exposição crescente ao brometo de etídeo.

Tabela XX - Número de colônias viáveis, em diferentes concentrações de brometo de etídeo, para três linhagens.

Linhagens	Concentrações de brometo de etídeo ( $\mu\text{g/ml}$ meio)						
	0,0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
118 C (exp. 1)	5	9	6	7	8	13	6
118 C (exp. 2)	120	84	59	59	59	67	86
118 C (exp. 3)	60	62	58	66	74	76	79
Segregante 32	92	80	50	50	44	11	9
Segregante 46	101	103	115	82	74	61	3

Tabela XXI - Números e porcentagens relativas de conídios sobreviventes ao tratamento com brometo de etídeo, para a linhagem 32.

Tempo de tratamento (horas)	Diluição	$\bar{X}$ colônias/placa	Conídios viáveis (ml)	Porcentagem relativa de sobreviventes
0,0	$10^{-4}$	5,5	$3,90 \times 10^5$	100,00
	$10^{-3}$	23,0		
0,5	$10^{-4}$	2,5	$2,85 \times 10^5$	73,07
	$10^{-3}$	22,0		
1,0	$10^{-4}$	1,0	$1,27 \times 10^5$	32,69
	$10^{-3}$	15,5		
2,0	$10^{-4}$	0,0	$0,80 \times 10^5$	22,22
	$10^{-3}$	8,0		
4,0	$10^{-3}$	6,5	$0,76 \times 10^5$	19,48
	$10^{-2}$	87,0		
6,0	$10^{-3}$	4,0	$0,24 \times 10^5$	6,11
	$10^{-2}$	24,0		
	$10^{-1}$	76,0		
8,0	$10^{-3}$	4,0	$0,23 \times 10^5$	5,96
	$10^{-2}$	22,0		
	$10^{-1}$	78,0		



Tabela XXII - Números e porcentagens relativas de conídios sobreviventes ao tratamento com brometo de etídeo, para a linhagem 46.

Tempo de tratamento (horas)	Diluições	$\bar{X}$ de colônias/placa	Conídios viáveis (ml)	Porcentagem relativa de sobreviventes
0,0	$10^{-4}$	4,5	$3,25 \times 10^5$	100,00
	$10^{-3}$	20,0		
0,5	$10^{-4}$	3,0	$2,45 \times 10^5$	75,38
	$10^{-3}$	19,0		
1,0	$10^{-4}$	2,0	$1,80 \times 10^5$	55,38
	$10^{-3}$	16,0		
2,0	$10^{-4}$	0,0	$0,45 \times 10^5$	13,85
	$10^{-3}$	4,5		
4,0	$10^{-3}$	2,5	$0,39 \times 10^5$	12,15
	$10^{-2}$	54,0		
6,0	$10^{-3}$	2,0	$0,15 \times 10^5$	4,52
	$10^{-2}$	18,0		
	$10^{-1}$	61,0		
8,0	$10^{-3}$	2,0	$0,14 \times 10^5$	4,19
	$10^{-2}$	15,0		
	$10^{-1}$	59,0		

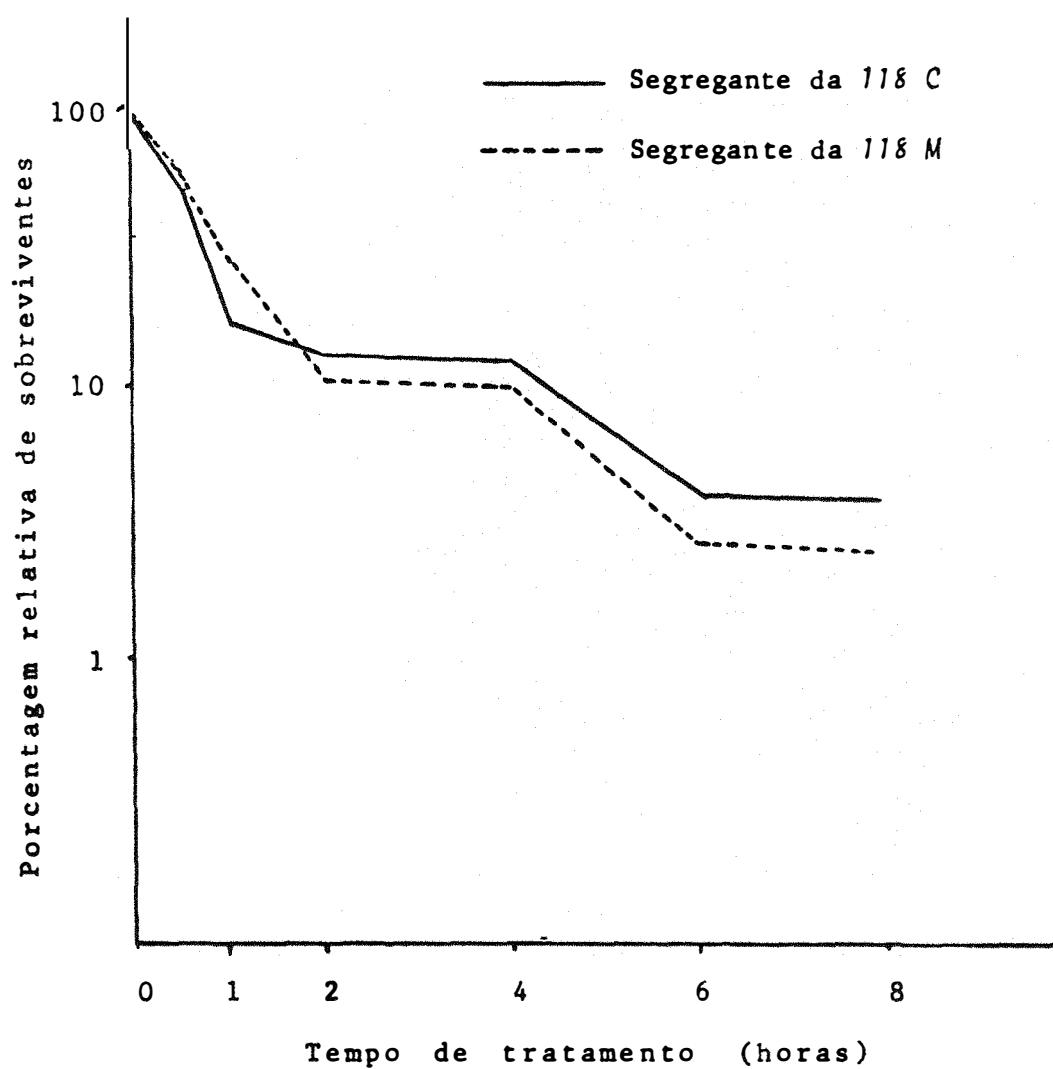


Figura 17 - Curvas de sobrevivência ao tratamento com brometo de etídeo, para as linhagens segregantes de 118 M e 118 C.

#### 4.3.2. Seleção e ensaio de alguns mutantes induzidos por diferentes tratamentos mutagênicos

Dos mutantes resistentes à arginina, obtidos após tratamentos com mutagênicos, foram selecionados alguns, ao acaso, e reensaiados quanto aos requisitos nutricionais e quanto à resistência à arginina.

Foram ensaiados 83, 45 e 81 mutantes, obtidos após tratamento com luz UV, EMS e BE, respectivamente.

A Tabela XXIII mostra o número de mutantes resistentes à arginina, coloração e auxotrofia para lisina dos mesmos, obtidos tanto espontaneamente como induzidos por mutagênicos.

Enquanto a maioria dos mutantes apresentava morfologia da colônia semelhante a das linhagens originais (c), outros apresentavam morfologia alterada - colônias brancas e miceliais somente quando crescidas em meio suplementado de arginina e voltando à morfologia normal quando essa estivesse ausente (W → C) - enquanto alguns conservavam esta morfologia alterada, mesmo quando semeados em meio de cultura sem arginina (W).

Todos os mutantes ensaiados mostraram conservar a auxotrofia para ácido *p*-aminobenzóico, embora não se possa dizer o mesmo em relação à auxotrofia para lisina. Foram também ensaiados para concentrações maiores de arginina e mostraram crescimento até a última concentração ensaiada, ou seja, 1.600 µg arginina/ml meio cultura.

Tabela XXIII - Número de mutantes resistentes à arginina, coloração e auxotrofia para lisina; espontâneos ou induzidos por luz ultravioleta, metano-sulfonato de etila e brometo de etídeo.

Origem dos mutantes	Coloração	Prototróficos para lisina	Auxotróficos para lisina
espontânea	C	58	4
	W→C	0	0
	W	0	1
após irradiação UV	C	9	20
	W→C	2	34
	W	1	17
após tratamento EMS	C	45	0
	W→C	0	0
	W	0	0
após tratamento BE	C	51	0
	W→C	0	0
	W	0	0

C = Colônias com coloração semelhante às linhagens originais; W→C = Colônias brancas e miceliais só na presença de arginina; W = Colônias sempre brancas e miceliais.

#### 4.4. Análise genética dos mutantes

Alguns dos mutantes resistentes à arginina foram submetidos à análise genética.

Todos os mutantes analisados apresentavam morfologia normal; alguns tinham se tornado capazes de crescer em meio deficiente em lisina (mutantes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 28, 32 e 144) enquanto outros conservavam a auxotrofia para lisina (12, 13, 18, 24 e 90).

Enquanto os mutantes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 12 são mutantes espontâneos, os 13, 18, 24, 28, 32 e 90 foram induzidos por UV e o 144 induzidos por EMS.

Todos esses mutantes foram cruzados com a linhagem MSE.

Partindo-se da verificação da existência de segregantes *lys* dos cruzamentos dos mutantes 1, 2, 3, 4, 5, 8, 28, 32 e 144 com a MSE, pensou-se que o que talvez estivesse levando a prototrofia para lisina fosse supressão gênica e não reversão verdadeira, já que neste último caso só se esperariam segregantes *lys*<sup>+</sup>.

Para o mapeamento desses supressores, lançou-se mão dos segregantes mitóticos *lys* e mapeou-se o seu supressor naquele grupo de ligação que apresentasse seu marcador, sempre em associação ao gene *lys* numa combinação parental.

Assim, por exemplo, no mutante 5, todos os 15 segregantes mitóticos *lys* eram deficientes para piridoxina (marcador do grupo de ligação IV) e como isto não acontecia com mais nenhum marcador, calculou-se o valor de recombinação dos genes *su lysA*<sub>1</sub> e *pyroA*<sub>4</sub> com base nos dados da análise meiótica e mapeou-se o *sup lysA*<sub>1</sub>, a aproximadamente 23 unidades de recombinação do marcador *pyroA*<sub>4</sub> no cromossomo IV.

As Tabelas XXIV e XXV mostram respectivamente os dados resumidos das análises mitóticas e meióticas dos mutantes 1, 2, 3, 4, 5, 8, 28, 32 e 144.

A Tabela XXVI mostra os resultados resumidos da análise meiótica e da mitótica para o mutante 6.

Quanto aos mutantes 12, 13, 18, 24 e 90, que conservaram a auxotrofia para lisina e ainda assim tornaram-se resistentes à arginina, suas análises genéticas não nos permitiram mapear o gene ou genes que lhes conferem tal resistência.

Tabela XXIV - Análises mitóticas dos mutantes.

Mutante	Origem	Grupo de ligação envolvidos na supressão	Marcadores	Segregantes
1	118 C - esp.	III	<i>galA</i> <sub>1</sub> <i>galA</i> <sub>1</sub> <sup>+</sup>	<i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>galA</i> <sub>1</sub> = 10 <i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>galA</i> <sub>1</sub> <sup>+</sup> = 0
2	118 C - esp.	VII	<i>nicB</i> <sub>8</sub> <i>nicB</i> <sub>8</sub> <sup>+</sup>	<i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>nicB</i> <sub>8</sub> = 14 <i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>nicB</i> <sub>8</sub> <sup>+</sup> = 2
3	118 M - esp.	II	<i>WA</i> <sub>3</sub> <i>WA</i> <sub>3</sub> <sup>+</sup> <i>AcrA</i> <sub>1</sub> <i>AcrA</i> <sub>1</sub> <sup>+</sup>	<i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>WA</i> <sub>3</sub> = 21 <i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>WA</i> <sub>3</sub> <sup>+</sup> = 0 <i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>AcrA</i> <sub>1</sub> = 0 <i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>AcrA</i> <sub>1</sub> <sup>+</sup> = 21
4	118 C - esp.	II	<i>WA</i> <sub>3</sub> <i>WA</i> <sub>3</sub> <sup>+</sup> <i>AcrA</i> <sub>1</sub> <i>AcrA</i> <sub>1</sub> <sup>+</sup>	<i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>WA</i> <sub>3</sub> = 11 <i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>WA</i> <sub>3</sub> <sup>+</sup> = 0 <i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>AcrA</i> <sub>1</sub> = 1 <i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>AcrA</i> <sub>1</sub> <sup>+</sup> = 10
5	118 C - esp.	IV	<i>pyroA</i> <sub>4</sub> <i>pyroA</i> <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>pyroA</i> <sub>4</sub> = 15 <i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>pyroA</i> <sub>4</sub> <sup>+</sup> = 0
8	118 M - esp.	III	<i>galA</i> <sub>1</sub> <i>galA</i> <sub>1</sub> <sup>+</sup>	<i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>galA</i> <sub>1</sub> = 9 <i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>galA</i> <sub>1</sub> <sup>+</sup> = 1
28	118 C - UV	III	<i>galA</i> <sub>1</sub> <i>galA</i> <sub>1</sub> <sup>+</sup>	<i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>galA</i> <sub>1</sub> = 22 <i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>galA</i> <sub>1</sub> <sup>+</sup> = 2
32	118 M - UV	VIII	<i>riboB</i> <sub>2</sub> <i>riboB</i> <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>riboB</i> <sub>2</sub> = 10 <i>lysA</i> <sub>1</sub> <i>riboB</i> <sub>2</sub> <sup>+</sup> = 2
144	118 C - EMS	VI	$\delta B$ <sub>3</sub> $\delta B$ <sub>3</sub> <sup>+</sup>	<i>lysA</i> <sub>1</sub> $\delta B$ <sub>3</sub> = 14 <i>lysA</i> <sub>1</sub> $\delta B$ <sub>3</sub> <sup>+</sup> = 3

Tabela XXV - Análise meiótica dos mutantes.

Mutante	Grupo de ligação envolvido na supressão	Marcadores	Nº de segregantes analisados	Valor de recombinação	Desvio padrão
1	III	<i>galA</i> <sup>1</sup> <i>galA</i> <sup>1+</sup>	54	24%	0,09
2	VII	<i>nicB</i> <sup>8</sup> <i>nicB</i> <sup>8+</sup>	74	23%	0,26
3	II	<i>AcrA</i> <sup>1</sup> <i>AcrA</i> <sup>1+</sup>	64 (p/Acr)	25%	0,10
		<i>WA</i> <sup>3</sup> <i>WA</i> <sup>3+</sup>	152 (p/W)	32%	0,05
4	II	<i>AcrA</i> <sup>1</sup> <i>AcrA</i> <sup>1+</sup>	113 (p/Acr)	25%	0,07
		<i>WA</i> <sup>3</sup> <i>WA</i> <sup>3+</sup>	226 (p/W)	34%	0,09
5	IV	<i>pyroA</i> <sup>4</sup> <i>pyroA</i> <sup>4+</sup>	42	23%	0,11
8	III	<i>galA</i> <sup>1</sup> <i>galA</i> <sup>1+</sup>	69	22%	0,07
28	III	<i>galA</i> <sup>1</sup> <i>galA</i> <sup>1+</sup>	99	21%	0,06
32	VIII	<i>riboB</i> <sup>2</sup> <i>riboB</i> <sup>2+</sup>	100	31%	0,08
144	VI	$\Delta B^3$ $\Delta B^3+$	79	20%	0,07

Tabela XXVI - Análise mitótica e meiótica do mutante 6

Grupo de ligação	marcadores	Segregantes	
		análise mitótica	análise meiótica
V	<i>lysA<sub>1</sub></i>	0	0
	<i>lysA<sub>1</sub><sup>+</sup></i>	25	78



#### 4.5. Teste de alelismo

Para verificar se os genes supressores da deficiência para lisina, mapeados no grupo de ligação III nos mutantes 1, 8 e 28, eram ou não alélicos, cruzou-se primeiramente o mutante 1 com uma linhagem segregante do cruzamento do mutante 28 x MSE, que apresentava os marcadores apropriado para a obtenção de um heterocário balanceado. Além do gene supressor e do gene *lysA*<sub>1</sub>; este segregante apresentava os marcadores *ribB*<sub>2</sub>, *ΔB*<sub>3</sub>, era branco, enquanto o mutante 1 apresentava também *pabaA*<sub>6</sub> e *AcrA*<sub>1</sub> e tinha coloração chartrense.

Foram analisados 104 ascósporos provenientes de um peritécio híbrido, quanto a suas capacidades de crescer em meio onde faltasse lisina, e todos eles mostraram que podem crescer neste meio.

Este mesmo segregante do cruzamento 28 x MSE foi cruzado com o mutante 8 e, também dos 104 ascósporos analisados, todos mostraram crescimento em meio onde faltasse lisina.

Dois outros genes supressores, de outros dois mutantes (3 e 4), foram mapeados no grupo de ligação II.

O mutante foi então cruzado com um segregante mitótico do cruzamento mutante 4 x MSE.

Da mesma forma que os mutantes anteriores, e mutante 3 apresentava, além do marcador *lysA*<sub>1</sub> e do gene supressor da deficiência para lisina, os marcadores *pabaA*<sub>6</sub> e *AcrA*<sub>1</sub> e era chartrense.

O segregante de mutante 4 x MSE apresentava, além dos marcadores citados acima para o mutante 3, as deficiências para síntese de piridoxina e tiosulfato e apresentava coloração branca.

Dos 90 ascósporos analisados, quanto à capacidade de crescer em meio de cultura onde faltasse somente lisina, 17 deles não cresceram. Esses resultados indicam que estes genes supressores não são alelos.

Calculou-se, então, o valor de recombinação entre

os dois supressores e este deu um resultado de aproximadamente 37%.

Fez-se, também, o teste  $X^2$  para a segregação 3:1 - característica de dois genes que segregam independentemente - e o valor encontrado de 1,79 indica que existe 95% de probabilidade de que estes genes estejam segregando independentemente.

#### 4.6. Teste de heterocário

Inicialmente, fizeram-se testes de heterocário entre as linhagens 118 C e a MSE e entre o mutante 1 resistente à arginina e a MSE.

Dos dois cruzamentos resultaram colônias brancas e chartreuses, depois de semeados os conídios provenientes das regiões heterocarióticas.

Do cruzamento 118 C x MSE, das 52 colônias brancas ensaiadas, todas apresentavam crescimento em placas de Petri contendo MM + tudo, MM + tudo - *paba* e MM + tudo + arginina - e não cresceram em MM e MM + tudo - *ribo*.

Das colônias chartreuses ensaiadas, todas cresceram nos meios: MM + tudo e MM + tudo - *ribo*, e deixaram de crescer quando inoculadas em MM, MM + tudo - *paba* e MM + tudo + arginina.

Como se pode notar, os resultados foram os esperados, as colônias brancas conservavam a auxotrofia para riboflavina e a resistência à arginina (da MSE), e as chartreuses a auxotrofia para ácido *p*-aminobenzóico e a sensibilidade à arginina.

Do cruzamento entre o mutante 1 resistente à arginina e a MSE, todas as 45 colônias brancas ensaiadas continuaram deficientes para a síntese de riboflavina, resistentes à arginina e prototróficas para ácido *p*-aminobenzóico.

Das 52 colônias chartreuses analisadas, todas continuaram deficientes para a síntese de ácido *p*-aminobenzóico, prototróficas para riboflavina e resistentes à arginina.

Posteriormente, já no final deste trabalho, foram

realizados testes de heterocário entre alguns mutantes e a MSE, com o intuito de se verificar se a resistência à arginina apresentada por eles era citoplasmática.

Estes mutantes tinham sido anteriormente analisados pelas técnicas de análise genética de PONTECORVO e col. (1953) e, como os resultados desta análise mostravam que o caráter resistência parece que "se perdia", quando dos cruzamentos, passou-se então a se fazer o teste de heterocário e o teste de instabilidade mitótica para os mesmos.

Os mutantes 12, 13, 18, 24 e 90 foram cruzados com a MSE e as colônias chartreuses, provenientes das regiões heterocarióticas, foram colocadas em placas mestras e replicadas para placas contendo MM suplementado de biotina, lisina, ácido *p*-aminobenzóico e arginina (800 µg/ml meio).

Das 104 colônias chartreuses analisadas para cada uma das linhagens: 12, 13, 18, 24 e 90 que foram cruzados com a MSE, respectivamente 79, 54, 6, 24 e 21 colônias não cresceram no meio em que foram inoculadas.

Estes mesmos mutantes foram ensaiados quanto à instabilidade mitótica. Assim, foram feitos ensaios para a verificação da estabilidade do caráter resistência, através de subculturas em meio de cultura suplementado do agente inibidor.

Enquanto todas as 104 colônias, provenientes do mutante 18, cresceram na presença de arginina, 39 do mutante 12, 52 do mutante 90, 33 do 24, 46 do 13 e nenhuma da 118 C apresentou crescimento.

#### 4.7. Frequência de mutação para resistência à arginina, após diferentes tratamentos mutagênicos

As Tabelas XXVII e XXVIII mostram os títulos das suspensões de conídios e as frequências de mutantes resistentes à arginina, antes e após a irradiação com luz ultravioleta, e tratamento com metano-sulfonato de etila (ambos a 5% de sobrevivência) para as linhagens 118 C e 118 M.

A Tabela XXIX mostra os títulos das suspensões de conídios e as frequências de mutantes resistentes à arginina, antes e após tratamento com brometo de etídeo para as linhagens 32 e 46.

As Tabelas XXX e XXXI mostram as frequências de mutantes resistentes à arginina (em  $10^6$  conídios antes e após tratamentos com luz ultravioleta, metano-sulfonato de etila e brometo de etídeo, e os aumentos na frequência de mutantes, induzidos pelos mutagênicos.

Tabela XXVII - Títulos (conídios/ml) nos diferentes passos de quatro experimentos, para determinação do número de mutantes resistentes à arginina, após irradiação com luz ultravioleta para as duas linhagens

Passos	118 C		118 M	
	exp. 1	exp. 2	exp. 1	exp. 2
a- título antes irradiação	$7,9 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$
b- nº mutantes espontaneos	120	140	3	2
c- títulos após irradiação	$6,9 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
d- nº mut. após irradiação	280	360	5	3

Tabela XXVIII - Títulos (conídios/ml) nos diferentes passos de quatro experimentos, para determinação do número de mutantes resistentes à arginina, após tratamento com EMS para as duas linhagens.

Passos	118 C		118 M	
	exp. 1	exp. 2	exp. 1	exp. 2
a- título antes do tratamento	$4,65 \times 10^6$	$1,35 \times 10^6$	$3,21 \times 10^6$	$1,41 \times 10^6$
b- nº mut. espontaneos	229	26	23	72
c- título após tratamento	$0,63 \times 10^5$	$0,46 \times 10^5$	$0,07 \times 10^5$	$0,46 \times 10^5$
d- nº mut. após tratamento	104	52	8	19

Tabela XXIX - Títulos (conídios/ml) nos diferentes passos de quatro experimentos, para determinação do número de mutantes resistentes a arginina, após tratamento com B.E. para as duas linhagens.

Passos	Linhagem 32		Linhagem 46	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
a- Título antes do tratamento	$6,28 \times 10^6$	$4,11 \times 10^6$	$5,01 \times 10^6$	$6,32 \times 10^6$
b- nº mut. espontaneos	111	58	17	28
c- título após tratamento	$3,26 \times 10^5$	$2,78 \times 10^5$	$2,21 \times 10^5$	$2,96 \times 10^5$
d- nº mut. após tratamento	29	25	5	11

Tabela XXX - Frequência de mutantes resistentes à arginina (em  $10^6$  conídios), após tratamento com luz ultravioleta e metano-sulfonato de etila para a linhagem 118 C, e com brometo de etídeo para a linhagem 32.

Tratamento	Luz ultravioleta		Metano-sulfonato de etila		Brometo de etídeo	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
Controle	15,189	21,538	49,247	19,259	17,675	14,111
Após tratamento	405,797	631,578	1.650,793	1.130,434	88,957	89,928
Aumento na frequência de mutantes	26,716	29,323	33,520	58,696	5,032	6,572

Tabela XXXI - Frequência de mutantes resistentes à arginina (em  $10^6$  conídios), após tratamento com luz ultravioleta e metano-sulfonato de etila para a linhagem 118 M, e com brometo de etídeo para a linhagem 46.

Tratamento	Luz ultravioleta		Metano-sulfonato de etila		Brometo de etídeo	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
Controle	0,737	0,400	7,400	5,106	3,390	4,430
Após tratamento	33,333	23,076	1.142,857	413,043	22,624	37,162
Aumento na frequência de mutantes	45,227	57,690	154,440	80,833	6,673	8,388

#### 4.8. Determinação microbiológica de lisina

A Tabela XXXII mostra os raios das zonas de crescimento das duas linhagens em diferentes concentrações de lisina.

Com base nestes resultados, foi possível construir-se as curvas-padrões para o ensaio de lisina e estas curvas (Figuras 18 e 19) mostram que os raios das zonas de crescimento são funções lineares dos logarítmos das doses, para soluções de 156,25 a 5.000  $\mu\text{g/ml}$  de lisina.

A Tabela XXXIII mostra os raios das zonas de crescimento das duas linhagens em diferentes concentrações de lisina, mais uma concentração constante de arginina.

A Figura 18 mostra a relação entre raio da zona de crescimento e concentração de lisina para a linhagem 118 C.

A Figura 19 mostra também a relação entre raio da zona de crescimento e concentração de lisina para o mutante 18, com e sem adição de arginina ao meio de cultura.



Tabela XXXII - Raio das zonas de crescimento de duas linhagens em diferentes concentrações de lisina.

Concentração de lisina (µg/ml)	Raio das zonas de crescimento			
	118 C		Mutante 18	
	Repetições	$\bar{X}$	Repetições	$\bar{X}$
5.000,00	3,2; 3,2; 3,2;	3.200	3,4; 3,3; 3,2;	3.300
2.500,00	3,0; 3,0; 3,0;	3.000	3,0; 3,0; 3,1;	3.033
1.250,00	2,7; 2,8; 2,8;	2.766	2,6; 2,6; 2,7;	2.566
625,00	2,5; 2,3; 2,4;	2.400	2,3; 2,4; 2,4;	2.360
312,50	2,1; 2,2; 2,2;	2.166	2,1; 2,1; 2,1;	2.100
156,25	2,0; 1,9; 1,9;	1.933	2,0; 2,0; 2,0;	2.000
0	0 0 0	0	0 0 0	0.000

Tabela XXXIII - Raio das zonas de crescimento de duas linhagens, em diferentes concentrações de lisina mais uma concentração constante de arginina.

Concentração de lisina (µg/ml)	Concentração de arginina (µg/ml meio)	Raio das zonas de crescimento			
		118 C		Mutante 18	
		Repetições	$\bar{X}$	Repetições	$\bar{X}$
5.000,00	800	0 0 0	0	3,1; 3,2; 3,2;	3.166
2.500,00	800	0 0 0	0	2,8; 2,8; 2,8;	2.800
1.250,00	800	0 0 0	0	2,3; 2,3; 2,2;	2.266
625,00	800	0 0 0	0	2,0; 1,9; 1,9;	1.933
312,50	800	0 0 0	0	1,5; 1,5; 1,6;	1.533
156,25	800	0 0 0	0	1,1; 1,1; 1,0;	1.060
0	800	0 0 0	0	0 0 0	0.000

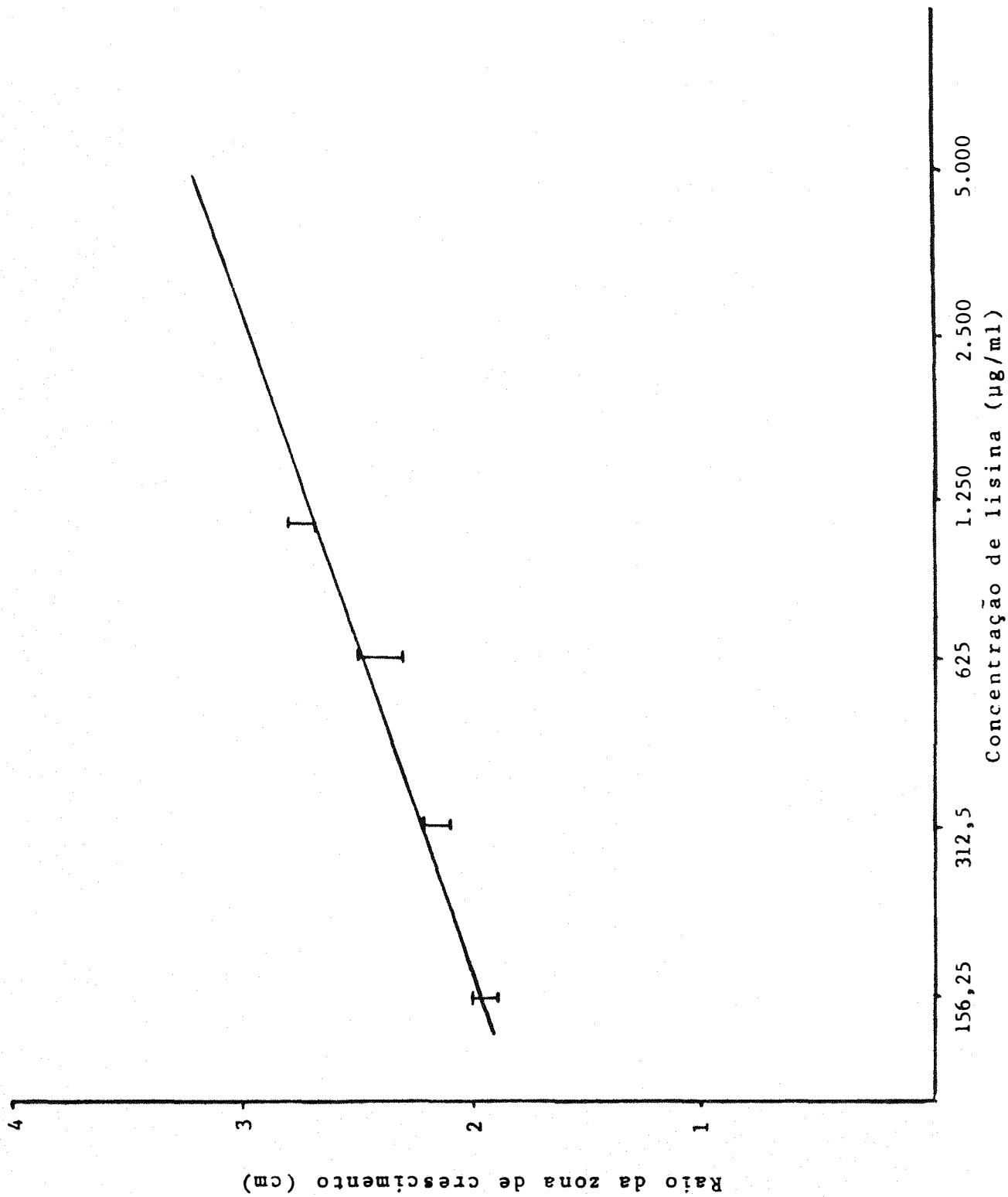


Figura 18 - Relação entre raio da zona de crescimento e concentração de lisina para a linhagem 178 C.

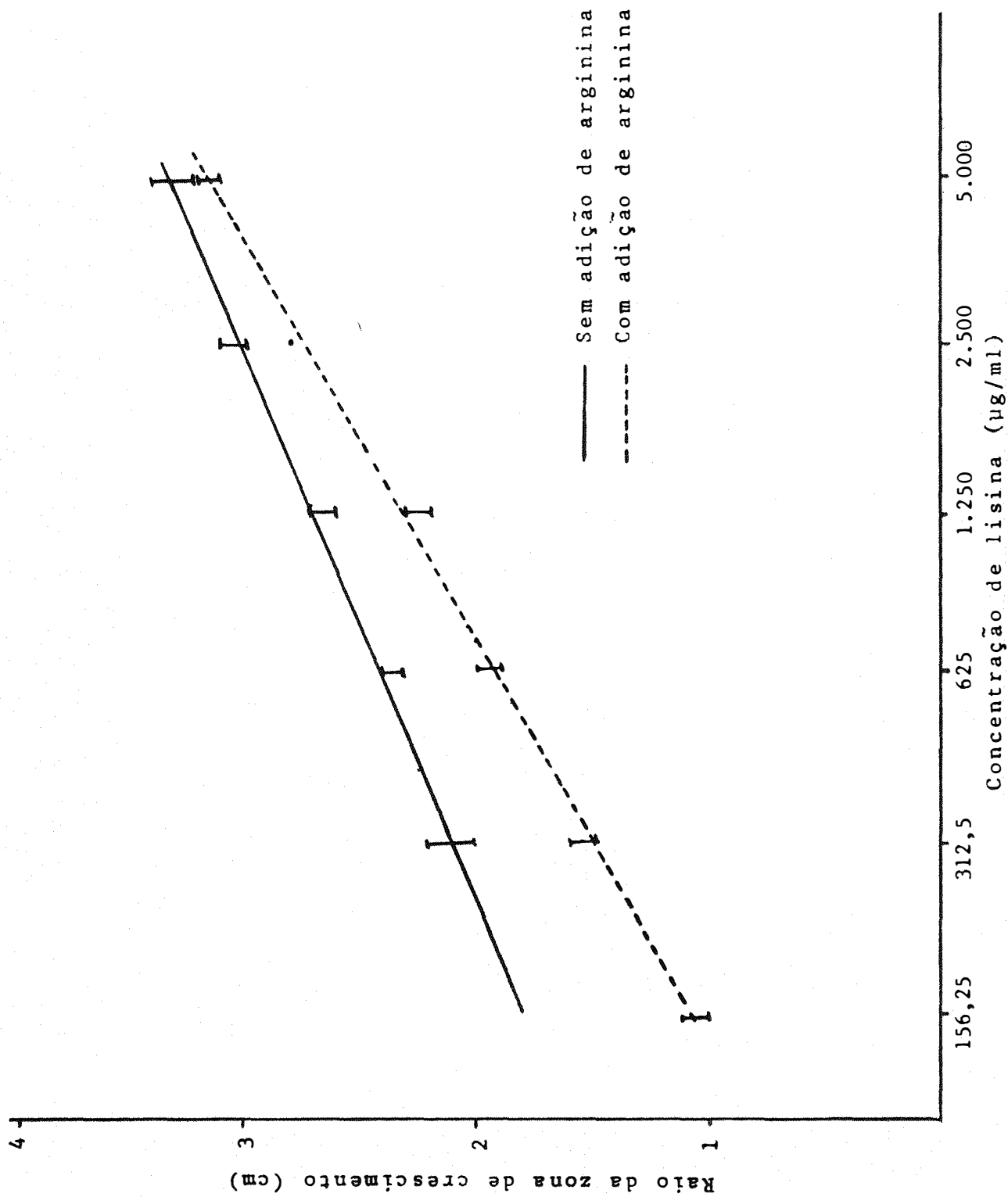


Figura 19 - Relação entre raio da zona de crescimento e concentração de lisina para o mutante 18 resistente à arginina com e sem adição de arginina ao meio de cultura.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Ensaio das linhagens 118 C e 118 M

Quando a linhagem deficiente para a síntese de lisina, denominada 118 e proveniente dos estoques existentes na Universidade de Sheffield, Inglaterra, foi semeada em meio completo através de seus conídios, verificou-se que dois tipos distintos de colônias eram obtidos. O primeiro tipo era constituído por colônias mais claras e o segundo por colônias mais escuras, que foram designadas por 118 C e 118 M, respectivamente. Este fato pode ser explicado como devido a uma mutação espontânea no estoque original. Linhagens haplóides de *Aspergillus nidulans* são bastante estáveis mas, casos de mutação espontânea em culturas estocadas são conhecidos, e um exemplo disto é o da linhagem MSE onde foi constatada a existência de mutantes com conídios binucleados em estoque originalmente uninucleado (PIZZIRANI, 1977). De qualquer modo, no presente caso, as duas linhagens, 118 M e 118 C se diferenciam apenas pela coloração das colônias, mantendo os mesmos requisitos nutricionais (Figura 2).

Uma vez que o presente trabalho tinha como um dos objetivos principais, estudar aspectos da resistência à arginina em linhagens deficientes para a síntese de lisina, a ocorrência dessa mutação espontânea permitiu que, na realidade, duas linhagens praticamente isogênicas, exceto para o caráter coloração das colônias, fossem analisadas. Os resultados obtidos com relação à resistência para a arginina nessas duas linhagens, revelaram diferenças marcantes entre elas.

Assim, a linhagem 118 M mostrou-se bem mais sensível à arginina do que a linhagem 118 C. As Tabelas de II a VII

e Figuras 3 a 9 indicam que, através dos vários métodos pelos quais a resistência à arginina foi ensaiada, sempre a linhagem 118 C mostrou-se mais resistente que a 118 M. As mesmas Tabelas e Figuras indicam também que resultados praticamente idênticos foram conseguidos tanto por inoculação por picada como pelo método das microcolônias, que portanto, se equivalem, o método de semeadura, no entanto, mostrou ser bem mais sensível para um teste como o realizado no presente trabalho, razão pela qual o controle feito com uma linhagem não dependente de lisina foi realizado por esta técnica (Tabela VIII). A Figura 9 mostra de maneira bastante clara que é a deficiência em lisina que provoca sensibilidade à arginina, pois a linhagem que não contém tal deficiência, teve sobrevivência inalterada. Este fato já havia sido estudado por PONTECORVO (1949) que mostrou que linhagens dependentes de lisina eram sensíveis à arginina; o mesmo não ocorrendo em linhagens que não necessitavam desse aminoácido, em *Aspergillus nidulans*.

Esses resultados podem ser interpretados à luz dos dados de vários autores, especialmente CYBIS e WEGLENSKI (1969, 1972) e PIOTROWSKA e col. (1976), que em *Aspergillus nidulans* mostraram uma forte competição entre lisina e arginina na sua entrada no micélio, possivelmente devido à existência de uma permease única, a qual teria maior ou igual afinidade com a arginina e lisina.

Assim, na presença dos dois aminoácidos, uma linhagem deficiente em lisina deve ter seu crescimento inibido, à medida que se aumente as concentrações de arginina no meio, o que realmente foi verificado no presente trabalho.

Com base nessas idéias, pode-se inclusive supor que a linhagem original 118 era a 118 M e que ocorreu uma mutação espontânea (118 C) no estoque, que teria vantagem relativa, graças a uma alteração na permease, resultando em maior afinidade pela lisina do que aquela apresentada pela permease original. Se esse for o caso, a linhagem 118 M deve requerer mais lisina para seu crescimento do que a 118 C e de fato isso foi verificado (Tabelas XIII e XIV e Figuras 10 a 13). Inclusive, a natureza genética dessa alteração foi constatada pelo cruzamento de dois segregantes, um proveniente da linhagem 118 M e outro da linhagem 118 C e que apresentavam as mesmas diferenças no requisito para lisina, que

as linhagens de onde se originaram (Tabela XV e Figura 14). Esse cruzamento deu colônias de dois tipos com relação ao requisito para lisina, segregando na proporção de 1:1. De fato, metade das colônias requeriam mais lisina para seu desenvolvimento que a outra metade, mostrando que esse caráter é regulado por um gene simples.

Uma análise genética meiótica e mitótica foi também realizada com ambas linhagens, 118 M e 118 C, através de cruzamento com a linhagem testadora MSE. As análises meióticas (Tabelas IX e XI) revelaram que em ambas linhagens os resultados foram os esperados, com segregação de 1:1 para os genes envolvidos, com exceção do gene *lysA*<sub>1</sub> e para um dos cruzamentos, com relação ao gene *ActA*<sub>1</sub>.

A distorção de segregação com relação à lisina, pode ser explicada devido a uma menor viabilidade de conídios contendo esse gene, quando semeados em MC, em comparação com conídios não requerendo lisina; o que levaria a uma maior quantidade de aparecimento de colônias prototróficas para lisina. Também seria de se esperar que no cruzamento envolvendo 118 M, essa seleção fosse maior que no cruzamento envolvendo 118 C, o que realmente ocorreu.

A outra distorção da segregação, obtida em um dos cruzamentos (118 M x MSE) para a segregação do gene *ActA*<sub>1</sub>, pode ser explicada pelo maior número de colônias brancas analisadas no caso, o que levaria a um maior aparecimento de colônias sensíveis à acriflavina, uma vez que *ActA*<sub>1</sub> e *WA*<sub>3</sub> estão ligados (Tabela IX).

Em todos os cruzamentos, segregantes dependentes de lisina eram sensíveis à arginina e segregantes que não requeriam lisina eram resistentes à arginina, o que indica que o gene *lysA*<sub>1</sub> é o único responsável por essa sensibilidade. Verificou-se também pela análise meiótica que a coloração do micélio e esporos de colônias segregantes, era influenciada pela interação entre genes para coloração de esporos e o gene *lysA*<sub>1</sub>. Analisando-se colônias que continham o gene *WA*<sub>3</sub> (esporos brancos), verificou-se, por exemplo que, colônias brancas eram sempre *lys*<sup>+</sup> quando provenientes do cruzamento 118 M x MSE, mas colônias brancas podiam ser *lys*<sup>+</sup> ou *lys*<sup>-</sup> quando vindas do cruzamento 118 C x MSE.

Um outro tipo de coloração distinguida entre segregantes com o gene  $UA_3$ , era a marrom intermediária (MI); nesse caso, todas colônias MI tanto no cruzamento 118 C x MSE como no cruzamento 118 M x MSE, eram  $lys^-$ .

Pela análise mitótica (Tabelas X e XII) algumas distorções com relação aos marcadores  $nic^-$  e  $pyro^-$  foram encontradas, mas essas não são devidas a fatores inerentes às próprias linhagens e sim ao efeito seletivo do agente haploidizador, o cloroneb, o qual selecionou no caso, setores  $nic^+$  e  $pyro^+$ . De fato, com p-fluorofenilalanina usada como haploidizador, surgiram setores  $nic^-$  e  $pyro^-$  nessas linhagens.

Quanto à predominância de setores brancos pode-se supor que seja devida à dificuldade de visualização de outros setores, principalmente os amarelos, já que os diplóides resultantes desses cruzamentos são também amarelos.

Os resultados das análises mitóticas vieram também confirmar aqueles das análises meióticas, que mostraram que todos os segregantes brancos da linhagem 118 M eram  $lys^+$  e, os da 118 C,  $lys^+$  ou  $lys^-$ .

Também, todos os segregantes MI mostravam o marcador  $lys^-$  e eram sensíveis à arginina.

Os segregantes ME do cruzamento 118 M x MSE eram todos  $lys^+$ , enquanto nada se pode dizer com relação aos mesmos do outro cruzamento, já que o número de setores ME que se conseguiu isolar não é suficiente para se chegar a qualquer conclusão.

Portanto, a diferença entre as linhagens 118 M e 118 C deve ser complexa, devido a interação de diferentes marcadores genéticos que ocasionam a coloração mais escura na 118 M.

## 5.2. Obtenção de mutantes resistentes à arginina e sua análise genética

Mutantes derivados de linhagens  $lys^-$ , capazes de resistir a concentrações de arginina que inibem o crescimento da linhagem original, já foram obtidos anteriormente (AZEVEDO e CAVENAGUE, 1968). Também haviam fortes indicações de que esses mu-

tantes poderiam ser obtidos com relativa facilidade, mesmo espontaneamente, pois quando dos ensaios de resistência à arginina nas linhagens 118 C e 118 M (Tabelas II a VII), inclusive em altas concentrações de arginina, algumas colônias (pelo método da semeadura) ou pequeno crescimento (método de inoculação por picada ou microcolônias) já havia sido verificado, indicando que isso poderia ser devido ao aparecimento de mutantes espontâneos.

Dos mutantes obtidos espontaneamente, verificou-se que a maioria deles era capaz de crescer em altas concentrações de arginina, devido ao desaparecimento do fenótipo *lys<sup>-</sup>*. Isto poderia ser atribuído a supressão do gene *lysA<sub>1</sub>* ou reversão verdadeira do mesmo, ao estado selvagem. Uma minoria no entanto, ainda mantinha o requisito para lisina e esses eram também resistentes à arginina.

A Tabela XXIII mostra que a luz ultravioleta produz um grande número de mutantes resistentes à arginina e que continham dependentes de lisina, mas que mutantes induzidos por EMS e BE são todos independentes de lisina. Alguns mutantes morfológicos foram também obtidos, especialmente após indução com UV.

Observando-se as curvas de sobrevivência à luz ultravioleta, para as linhagens 118 C e 118 M (Figura 15), pode-se notar que a linhagem marrom mostrou-se bem mais resistente que a chartreuse à ação letal da UV, fato este talvez explicado pela maior pigmentação dos conídios marrons, o que talvez dificultasse a infiltração dos raios ultravioletas no interior do conídio (DANTAS D'ARCE, 1972; PIZZIRANI, 1977).

Quando se observa as curvas de sobrevivência ao metano-sulfonato de etila (Figura 16), e ao brometo de etídeo (Figura 17), para as duas linhagens: 118 C, 118 M e seus segregantes 32 e 46, respectivamente, nota-se que ocorre o contrário: a linhagem 118 M e seu segregante 46 são mais sensíveis que a 118 C à ação letal do EMS e BE, levando-nos a crer que a linhagem 118 M deve permitir uma entrada mais efetiva desses mutagênicos nos conídios (PIZZIRANI, 1977).

Os dados do Quadro XIX indicam a resistência cruzada entre acriflavina e o brometo de etídeo, ambas acridinas.

A linhagem 118 C, que entre outros marcadores apre



sentava  $Ac7A_1$ , não mostrou diminuição significativa no número de sobreviventes quando se aumentou a concentração de brometo de etídeo, ao contrário do apresentado por outras duas linhagens sensíveis à acriflavina.

Uma análise genética em mutantes obtidos espontaneamente, bem como em alguns induzidos por UV e EMS revelou que, nos casos em que o fenótipo  $lys^-$  havia desaparecido, estava realmente havendo supressão do gene  $lysA_1$  por genes supressores. A análise genética mitótica desses mutantes mostrou a existência de pelo menos seis desses supressores (Tabela XXIV), uma vez que eles foram mapeados em seis dos oito grupos de ligação do *Aspergillus nidulans*. Um teste de alelismo mostrou que dois mutantes que tiveram seus supressores mapeados no grupo de ligação II não eram alelos e os três mutantes com supressores no grupo de ligação III eram alelos. No total, resultaram então, sete diferentes supressores em nove mutantes analisados. Pode-se supor então que, o número de supressores do gene  $lysA_1$  deva ser bem maior que este, o que poderá futuramente ser investigado, através da análise de novos mutantes. Em apenas um caso (Tabela XXVI) houve evidência de reversão verdadeira  $lysA_1 \rightarrow lysA_1^+$ .

Dos mutantes  $lys^-$  que tornaram-se resistentes à arginina, uma análise de colônias provenientes de esporos isolados, mostrou que a resistência era instável, uma vez que colônias sensíveis foram obtidas, em diferentes proporções, em cada linhagem.

Um teste de heterocário mostrou o mesmo fenômeno. Apenas a linhagem 18 mostrou-se estável, ou seja, todas as colônias derivadas da mesma, ainda eram resistentes a arginina. O teste de heterocário nessa linhagem revelou, no entanto, que o caráter era quase que totalmente perdido, o que surgiu herança citoplasmática para resistência à arginina na linhagem 18.

Portanto, pode-se concluir que resistência à arginina em linhagens  $lys^-$  pode surgir ou por supressão do gene  $lysA_1$ ; que é o caso mais comum, ou por reversão verdadeira do que  $lysA_1$ , ou finalmente, em linhagens que embora continuando dependentes de lisina podem crescer em concentrações inibitórias de arginina. A maioria dos mutantes desta última classe, não se mantêm resistentes por subculturas; sendo instáveis portanto. Em apenas um caso, estabilidade foi verificada, mas, mesmo assim, a resistência

não foi mantida, quando a linhagem, após heterocário com outra não dependente de lisina foi semeada em meio com arginina. Nesse último caso, um caráter citoplasmático que confere resistência, deve estar envolvido.

Casos de herança citoplasmática revelada através de testes de heterocário em *Aspergillus nidulans*, são relativamente comuns e além daqueles apresentados por JINKS (1964) foram descritos outros, como o da resistência ao fungicida Dodine (SANTANA, 1974) e de morfologia alterada (ROSATO, 1977). A esses deve então ser acrescentado o do mutante aqui descrito, cuja resistência à arginina é perdida quando em contacto com citoplasma não mutante.

### 5.3. O uso do sistema de resistência à arginina, em linhagens *lys<sup>-</sup>*, para avaliação da potência de agentes mutagênicos

Atualmente, uma grande preocupação é o da detecção de produtos mutagênicos em alimentos, defensivos, cosméticos, etc. Para tal, vários sistemas foram desenvolvidos através de detecção de substâncias mutagênicas utilizando-se bactérias, fungos, culturas de tecidos, etc. (LEGATOR, 1976). Dos sistemas que se valem dos fungos para detecção de produtos mutagênicos, o mais favorável é o desenvolvido por SIDDIQUI (1962) e LILLY (1965) e que foi utilizado por muitos outros autores (ALDERSON e col. 1966, 1967; GAJEWSKI e col. 1968; AYLING, 1969; PUTRAMENT e col. 1970; KLINCZUK, 1970; SCOTT e col. 1973; PSZEWSKI e col. 1973). Nesse sistema é ensaiada a frequência de reversão do gene *methG<sub>1</sub>*, que pode ser devida a supressão ou reversão verdadeira, estando pelo menos sete loci envolvidos.

Como verificado no presente trabalho, resistência à arginina pode ser obtida com facilidade, estando envolvidos genes supressores (pelo menos 7 supressores), reversão verdadeira e instabilidade, incluindo agentes citoplasmáticos. Dessa forma, parece que este sistema deve ser de valor no ensaio de produtos mutagênicos.

Uma análise foi feita então com três mutagênicos; dois dos quais comprovadamente mutagênicos e inúmeras vezes en-

saiados; a luz ultravioleta (revisão de DRAKE, 1969; ALDERSON e HARTLEY, 1969; SCOTT e ALDERSON, 1971; CLADWICK e LEENHOUTS, 1976) e o metano-sulfonato de etila (revisões de DRAKE, 1969 e FISHBEIN e col. 1970; SHARMA, 1970).

O brometo de etídeo foi também ensaiado neste trabalho e já havia sido descrito como mutagênico em *Escherichia coli* (CLARKE e SHANKEL, 1974), em plantas (LEVY e ASHRI, 1975), em *Salmonella typhimurium* (Mac GREGOR e JOHNSON, 1977), em leveduras (FISHBEIN e col. 1970).

Todos os mutagênicos ensaiados para se determinar a potência, foram utilizados a um nível de aproximadamente 5% de sobrevivência e os resultados mostraram que o EMS parece bem mais potente que a UV e esta mais potente que o BE, na indução desta mutação (Tabelas XXVII a XXIX).

Comparando-se o aumento na frequência de mutantes induzidos pelos mutagênicos nas duas linhagens (Tabelas XXX e XXXI) pode-se verificar que a linhagem 118 M e o segregante 46 de 118 M x MSE são bem mais sensíveis ao mesmo que a linhagem 118 M e o segregante 32 do cruzamento 118 C x MSE.

O sistema usado mostrou então a possibilidade de detecção de efeitos mutagênicos de agentes físicos e químicos e de ve ser de valia para testes com substâncias ainda não comprovadamente mutagênicos. Em particular, a linhagem 118 M parece ser a mais apropriada no caso, uma vez que uma maior frequência de mutação foi observada na mesma, em comparação com a linhagem 118 C.

#### 5.4. O uso de linhagens *lys*<sup>-</sup>, resistentes à arginina para dosagens microbiológicas de lisina

Os resultados referentes aos ensaios das linhagens para determinação microbiológica de lisina, mostram que embora as médias das zonas de crescimento, nas diferentes concentrações de lisina sejam muito semelhantes para as duas linhagens - a 118 C e o mutante 18 (Figuras 18 e 19) - elas diferem muito quando se adiciona arginina ao meio de cultura (Tabela XXXII). Essa adição tem por finalidade testar a interferência da arginina no crescimen

to das duas linhagens deficientes para a síntese de lisina, uma sensível e outra resistente à arginina.

Observando-se os resultados da Tabela XXXIII pode-se notar que enquanto a arginina quase não interfere no crescimento do mutante 18 (Figura 19), inibe completamente o crescimento da linhagem 118 C.

O uso de linhagem deficiente para a síntese de lisina, para efetuar dosagens microbiológicas em milho, já havia sido realizada (AZEVEDO e col. 1967).

No entanto, uma das dificuldades do método era a adição de arginase para neutralizar os efeitos tóxicos da arginina, também existente no milho. Através da utilização do mutante 18, obtido no presente trabalho, essa análise pode ser realizada sem a utilização da enzima arginase, o que vem facilitar o método de dosagem microbiológica da lisina.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se estudar linhagens deficientes para a síntese de lisina em *Aspergillus nidulans* com relação à resistência à arginina. Também procurou-se obter e mapear geneticamente mutações conferindo resistência à arginina.

O sistema foi estudado como possível indicador da potência de substâncias mutagênicas e finalmente, linhagem deficiente para lisina e resistente à arginina foi ensaiada para seu uso em dosagens microbiológicas.

Duas linhagens, 118 M e 118 C foram estudadas com relação à resistência à arginina. Mutantes resistentes foram obtidos espontaneamente e induzidos por ultravioleta, metano-sulfonato de etila e brometo de etídeo. Foi feita a análise genética dos mutantes e um deles, ainda deficiente em lisina mas, resistente à arginina, foi usado para dosagem microbiológica.

Dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- a) As duas linhagens apresentaram diferentes níveis de resistência à arginina e também diferentes requisitos para lisina, a 118 M sendo mais sensível e requerendo mais lisina que a 118 C. A competição entre arginina e lisina no mesmo sítio ativo de uma permease única explica a maior resistência da linhagem 118 C à inibição pela arginina. Cruzamentos indicaram, ainda, que um gene simples com dois estados alternativos é o responsável pela diferença de requisito para li

sina nas duas linhagens.

- b) Resistência à arginina obtida a partir de linhagens deficientes em lisina pode ocorrer por supressão do gene  $lys^-$ , por reversão verdadeira  $lys^- \rightarrow lys^+$  ou ainda a linhagem pode manter-se deficiente em lisina e ser resistente à arginina. De quinze mutantes resistentes analisados, nove foram devidos à supressão do gene  $lysA_1$ , sendo mapeados sete diferentes loci para essa supressão, um foi devido à reversão verdadeira e cinco conservaram auxotrofia para lisina, mas quatro eram instáveis com relação ao caráter resistência e o único estável mostrou que o tipo de herança do caráter era citoplasmático.
- c) O sistema mostrou-se favorável para detecção e potencialidade de mutagênicos. Dos mutagênicos ensaiados, o metano-sulfonato de etila foi o mais eficiente, seguindo-se a luz ultravioleta e finalmente o brometo de etídeo. A linhagem 118 M parece ser a mais apropriada para futuros ensaios, já que se mostrou mais sensível à mutação induzida que a 118 C.
- d) O ensaio para determinação microbiológica de lisina mostrou a eficiência da linhagem resistente à arginina para tal fim, eliminando-se assim a necessidade de arginase.

## 7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present research aimed the study of lysine deficient mutants of *Aspergillus nidulans* in relation to arginine resistance. Also mutants conferring resistance to arginine in lysine auxotrophic strains were found and genetically mapped. The system was studied as a possible indicator of mutagenic agents. Finally, a lysine auxotrophic strain resistant to arginine was used for microbiological assay of lysine.

Two strains, 118 M and 118 C were studied in relation to arginine resistance. Resistant mutants were obtained both spontaneously and induced by ultra-violet light, ethylmethane sulphonate and ethidium bromide. Genetic analysis of resistant mutants was carried out and one of them, was used microbiological assay.

From the obtained results the following conclusions could be drawn:

- a) The two used strains differ in relation to their resistance to arginine and requirement for lysine; strain 118 M was more susceptible to arginine and required more lysine when compared to strain 118 C. Competition between arginine and lysine for the same active site of a single permease can explain the greater resistance of 118 C strain to arginine. Crosses have shown that a single gene mutation is responsible for the different strains behaviour in relation to arginine resistance and requirement for lysine.

- b) Arginine resistance obtained from auxotrophic lysine strains can be due to suppression of the *lysA<sub>1</sub>* gene, backmutation of such gene and finally strains can become resistant to arginine without loss of the lysine auxotrophy. From fifteen analysed mutants, nine were due to suppressor genes which were mapped in seven distinct loci, one was due to true backmutation and five still were auxotrophic for lysine being four unstable and one stable; this last one have shown cytoplasmic interitance for the arginine resistant trait.
- c) The sistem have shown to be most appropriate for the dettection and to study the efficiency of mutagenic agents. From the mutagenic used, ethyl-methane sulphonate was the most effective followed by ultra-violet light and ethidium bromide. Strains 118 M seems to be the most favourable for such tests once it is more susceptible than 118 C to induced mutations.
- d) A lysine microbiological assay have shown that one of the arginine resistant strains was very appropriate for such purpose since the enzyme arginase do not need to be added.



## 8. BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALDERSON, T. e C. SCAZZOCHIO, 1967. A system for the study of interlocus specificity for both forward and reverse mutations at least eight gene loci in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 4:567-577.
- ALDERSON, T. e A.M. CLARK, 1968. Interlocus specificity for chemical mutagens in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London, 210:593-595.
- ALDERSON, T. e M.J. HARTLEY, 1969. Specificity for spontaneous and induced forward mutation at several gene loci in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 8:255-264.
- APIRION, D., 1965. The two-way selection of mutants and revertants in respect of acetate utilization and resistance to fluoroacetate in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 6:317-329.
- ARMITT, S.; W. McCULLOUGH e C.F. ROBERTS, 1976. Analysis of acetate non-utilizing (*acu*) mutants in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 92(2):262-282.
- ARST, H.N. e D.J. COVE, 1969. Methylammonium resistance in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 98:1284-1293.
- AZEVEDO, J.L., 1970. A pleiotropic effect of lysine mutants of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus Newsletter*, 11:1.

- AZEVEDO, J.L.; R.A. CALDAS; J.C.S. CAVENAGUE e P.M. LACAVA, 1967. Microbiological method for the determination of amino acids in maize. *Fitotecnia Latinoamericana*, 2:147-154.
- AZEVEDO, J.L. e J.C.S. CAVENAGUE, 1968. Isolamento de mütantes deficientes em lisina que não são inibidos por arginina em *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Cultura*, 20(2):165.
- AZEVEDO, J.L., A. OLIVEIRA e A.J. ROCHA CAMPOS, 1977. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. *Summa Phytopathologica*, 2:237-241.
- AZEVEDO, J.L. e E.P. SANTANA, 1975. The use of Chloroneb to obtain haploid segregants from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus Newsletter*, 13:6.
- AYLING, P.D., 1969. Methionine suppressors in *Aspergillus nidulans*: their genetics and behaviour in heterocaryous and diploids. *Genetical Research*, 14:275-289.
- BARACHO, I.R., R. VENCOVSKY e J.L. AZEVEDO, 1970. Correlation between size and hibrid or selfed state of the cleistotecia in *Aspergillus nidulans*. *Transaction of the British Mycological Society*, 54(I):109-116.
- BARTNIK, E., J. GUZEWSKA e P. WEGLENSKI, 1973a. Mutations simultaneous affecting ammonium and glucose repression of the arginine catabolic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 126:85-92.
- BARTNIK, E., P. WEGLENSKI e M. PIOTROWSKA, 1973b. Ammonium and glucose repression of the arginine catabolic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 126:75-84.
- BARTSOCAS, C.S., 1977. Developmental aspects of amino acid transport: suggestion of switching-on and switching-off mechanisms. *Biology Neonate*, 31:60-64.
- BENKO, P.V., T.C. WOOD e I.H. SEGAL, 1967. Specificity and regulation of methionine transport in filamentous fungi. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 122:783-804.

- CAVENAGUE, J.C.S. e J.L. de AZEVEDO, 1968. Determinação microbiológica de lisina em milho, por um novo mutante isolado em *Aspergillus nidulans*. *C. Solo*, 60:71-72.
- CLADWICH, W.H. e H.P. LEENHOUTS, 1976. Correlation between mutation frequency and cell survival following different mutagenic treatments. *Theoretical and Applied Genetics*, 47:5-8.
- CLARKE, C.H. e D.M. SHANKEL, 1974. Effects of ethidium, quinacrine and hycanthone in survival and mutagenesis of UV-irradiated  $Hcr^+$  and  $Hcr^-$  strains of *Escherichia coli* B/r. *Mutation Research*, 26:473-481.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1974. *Aspergillus nidulans*. In: King, R.C. (ed.). *Handbook of Genetics*, I. Plenum Press, New York, p.447-510.
- CYBIS, J., M. PIOTROWSKA e P. WEGLENSKI, 1972. Genetic control of the arginine pathways in *Aspergillus nidulans*. Common regulation of anabolism and catabolism. *Molecular General Genetics*, 118:273-277.
- CYBIS, J. e P. WEGLENSKI, 1969. Effects of lysine on arginine uptake and metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 104:282-287.
- DANTAS D'ARCE, M.M.C., 1972. Contribuição ao estudo de aberrações cromossômicas numéricas em *Aspergillus nidulans*. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre, 50p. Piracicaba, SP.
- DARLINGTON, A.J. e C. SCAZZOCCHIO, 1967. Use of analogues and the substrate sensitivity of mutants in analogues of purine uptake and breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Journal Bacteriology*, 93:937-940.
- DAVIDSE, L.C. e W. FLACH, 1977. Differential binding of methyl benzimidazol carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strain of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Biology*, 72(1):174-193.

- DRAKE, J.W., 1969. Mutagenic mechanisms. *Annual Review Genetics*, 2:247-268.
- DEKKER, J., 1976. Acquired resistance to fungicides. *Annual Review Phytopathology*, 14:405-428.
- DHILLON, T.S. and E.D. GARBER, 1970. Methionine-sensitive leucine requiring mutants of *Aspergillus nidulans*. *Zeitschrift für Biologie*, 116:349-353.
- DOERMANN, A.H., 1944. A lysineless mutant of *Neurospora* and its inhibition by arginine. *Archives of Biochemistry*, 5:373-384.
- DORN, G.L., 1967. A revised linkage map of the eight linkage groups of *Aspergillus nidulans*. *Biochemica and Biophysica Acta*, 131:190-193.
- DRAINAS, C., J.R. KINGHORN e J.A. PATEMAN, 1977. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 98(2):493-501.
- ELORZA, M.V., 1969. Toxicidad de los iones metalicos para *Aspergillus nidulans*. *Microbiologia Española*, 22:131-138.
- ELORZA, M.V. e H.N. ARST, 1971. Sorbose resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 111:185-193.
- FISHBEIN, L., W.G. FLAMM e L. FALK, 1970. "Chemical mutagens. Environmental effects on biological systems". In: Hollaender, A. "Chemical mutagens. Principles and methods for their detection". vol.3. Plenum Press, N.Y., London (1973). 304pp.
- GAJEWSKI, W. e J. LITWINSKA, 1968. Methionine loci and their suppressors in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 102:210-220.
- GEORGOPOULOS, S.G. e I. GEORGADIS, 1969. Iodoacetate resistance and radiosensitization of conidia of *Aspergillus nidulans*. *Radiation Botany*, 9:69-73.

- GRENSON, M., 1967. Le transport des métabolites - en particulier, des acides amines - à travers les membranes cellulaires. *Revue des Fermentations*, 22(1):7-20.
- GUNATILLEKE, I.A.V.N., G. SCAZZOCHIO e H.N. ARST, 1975. Cytoplasmic and nuclear mutations to chloramphenicol resistance in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 137:269-276.
- HASTIE, A.C. and S.G. GEORGOPOULOS, 1971. Mutational resistance to fungitoxic benzimidazole derivatives in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 67:371-373.
- JINKS, J.L., 1964. Extrachromosomal inheritance. Prentice Hall, Inc., New Jersey, 177p.
- KÄFER, E., 1961. The process of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46:1581-1609.
- KÄFER, E., P. MARSHALL e G. COHEN, 1976. Well marked strains of *Aspergillus* for tests of environment mutagens: identification of induced mitotic recombination and mutation. *Mutation Research*, 38:141-146.
- KINGHORN, J.R. and J.A. PATEMAN, 1975. Mutations which affect amino acid transport in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 86:174-184.
- KLIMCZUK, J., 1970. Spontaneous and induced reversions of *meth<sub>1</sub>* mutant of *Aspergillus nidulans*. *Genetica Polonica*, 11:313-319.
- LEGATOR, M.S., 1976. First annual course in the principles and practices of genetic toxicology. University of Texas Medical Branch. Galveston, Texas.
- LEVY, A. e A. ASHRI, 1975. Ethidium bromide - An efficient mutagen in higher plants. *Mutation Research*, 28:397-404.

- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploisation by treatment of *Aspergillus niger* diploids with *p*-fluorophenylalanine. *Nature*, London, 190:744.
- LILLY, L.J., 1965. An investigation of suitability of the suppressors of *meth*<sub>1</sub> in *Aspergillus nidulans* for the study of induced and spontaneous mutation. *Mutation Research*, 2:192-195.
- MacGREGOR, J.T. e I.J. JOHNSON, 1977. In vitro metabolic activation of ethidium bromide and other phenanthridinium compounds: mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*, 48:103-108.
- MASTROPIETRO, M. e M. PRINCIVALLE, 1963. Dosaggio microbiologico di alcune vitamine del gruppo B. VII. Un nuovo metodo per la titolazione della riboflavina. *Rendiconti dell' Instituto Superior Sanità*, 26:845-852.
- Mc CULLY, K.S. e E. FORBES, 1965. The use of *p*-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research*, 6: 352-359.
- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregation induced by *p*-fluorophenylalanine. *Aspergillus Newsletter*, 2:10.
- MORPURGO, G., 1962. A new method of estimating forward mutation in fungi. Resistance to 8-azaguanine and *p*-fluorophenylalanine. *Scientific Reports Instituto Supriore di Sanità*, 2:9-12.
- OLIVEIRA, E.N.S., 1967. Dosagem microbiológica de vitaminas. In: Experimentos de microbiologia geral. Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. 170p.
- PALL, M.L., 1970. Amino acid transport in *Neurospora crassa*. II. Properties of a basic amino acid transport system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 203:139-149.

- PALMER, L.M., C. SCAZZOCHIO e D.J. COVE, 1975. Pyrimidine biosynthesis in *Aspergillus nidulans*: isolation and characterization of mutants resistant to fluoropyrimidines. *Molecular General Genetics*, 140:165-174.
- PASZEWSKI, A. and J. GRABSKI, 1973.  $\beta$ -cystathionease and O-acetylhomoserine sulphydrylase as the enzymes of alternative methionine biosynthetic pathways in *Aspergillus nidulans*. *Acta Biochimica Polonica*, 20:159-168.
- PATEMAN, J.A., J.R. KINGHOM e E. DUNN, 1974. Regulatory aspects of L-glutamate transport in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 119:534-542.
- PIOTROWSKA, M., P.P. STEPIEN, E. BARTIK e E. ZAKRZEWSKA, 1976. Basic and neutral amino acid transport in *Aspergillus nidulans*. *Journal General Microbiology*, 92:89-92.
- PIZZIRANI, A.A., 1977. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans*. Dissertação apresentada a ESALQ/USP para obtenção do título de Mestre. 111p. Piracicaba, São Paulo.
- PONTECORVO, G., 1949. Auxanographic techniques in biochemical genetics. *Journal of General Microbiology*, 3:122-126.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, D.W. HEMMONS, K.D. MacDONALD e A.W. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.
- PRINCIVALLE, M., 1958. Microbiology assay of some vitamins of the B group IV. Titration of p-aminobenzoic acid (PABA). *Rendiconti dell Istituto Superiori di Sanità*, 21:928-933.
- PUTRAMENT, A., J. GUZEWSKA e D. PIENIAZEK, 1970. Further characteristics of methionine mutants and their suppressors in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 109:209-218.
- RAYNER, R.W., 1970. A mycological colour chart. Commonwealth mycological Institute Ken, Surrey & British Mycological Society. Commonwealth Agricultural Bureau. 34p.

- RICHMOND, M.H., 1962. The effect of amino acid analogues on grow and synthesis protein in microorganisms. *Bacteriological Review*, 26:398-420.
- ROBINSON, J.H., C. ANTHONY e W.T. DRABBLE, 1973. Regulation of the acidic aminoacid permease of *Aspergillus nidulans*. *Journal General Microbiology*, 79:65-80.
- ROESS, V.B. e A.G. De BUSK, 1968. Properties of a basic amino acid permease in *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology*, 52:421-432.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8:14-15.
- ROPER, J.A. e E. KÄFER, 1957. Acriflavine-resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 16: 660-667.
- ROSATO, Y.B., 1973. Efeitos do etil-metano-sulfonato e acriflavina na instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre. 74p. Piracicaba, São Paulo.
- ROSATO, Y.B., 1977. Análise genética e respirometria em mutantes compactos de *Aspergillus nidulans*. Tese apresentada à ESALQ/USP para obtenção do título de Doutor. 152p. Piracicaba, S. Paulo.
- ROWLANDS, R.T. and G. TURNER, 1973. Nuclear and extranuclear inheritance of oligomycin resistance in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 126:201-216.
- ROWLANDS, R.T. and G. TURNER, 1977. Nuclear-extra-nuclear interaction affecting oligomycin resistance in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 154:311-318.
- SANTANA, E.P., 1974. Alteração na frequência de recombinação mitótica e mutantes resistentes a fungicidas em *Aspergillus nidulans*. Dissertação apresentada a ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre. 63p. Piracicaba, São Paulo.



- SCOTT, B.R. e T. ALDERSON, 1971. The random (non specific forward mutational response of gene loci in *Aspergillus* conidia after photosensitisation to near ultraviolet light by 8-methoxypsoralen. *Mutation Research*, 12:29-34.
- SCOTT, B.R., T. ALDERSON e D.G. PAPWORTH, 1973. The effect of plating densities on the retrieval of methionine suppressor mutations after ultraviolet or gamma irradiation of *Aspergillus*. *Journal of General Microbiology*, 75:235-239.
- SHARMA, R.P., 1970. Combined effect of physical and chemical mutagens on mutation frequency in *Aspergillus nidulans*. *Indian Journal Genetics Plant Breeding*, 30:199-211.
- SIDDIQI, O.H., 1962. Mutagenic action of nitrous acid on *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 3:303-314.
- SINHA, U., 1967. Aromatic amino acid biosynthesis and p-fluorophenylalanine resistance in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 10:261-272.
- SINHA, U., 1969. Genetic control of the uptake of amino acids in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 62:495-505.
- SINHA, U., 1970. Competition between leucine and phenylalanine and its relation to p-fluorophenylalanine-resistant mutations in *Aspergillus nidulans*. *Archiv für Mikrobiologie*, 72:308-317.
- SRIVASTAVA, S. e U. SINHA, 1976. Six new loci controlling resistance to p-fluorophenylalanine in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 25:29-38.
- THRELFALL, R.J., 1968. The genetics and biochemistry of mutants of *Aspergillus nidulans* resistant to chlorinated nitrobenzenes. *Journal of General Microbiology*, 52:35-44.
- TUYL, J.M., 1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. *Mededelingen Landbouwhogeshool Wageningen*, 77:1-136.

TUYL, J.M., L.C. DAVIDSE e J. DEKKER, 1973. Acquired resistance to benomyl and thiabendazol in *Aspergillus nidulans*. 2<sup>nd</sup>. *International Congress of Plant Pathology*. Mineapolis.

TYIHAK, E., B. SZENDE e K. LAPIS, 1977. Biological significance of methylated derivatives of lysine and arginine. *Life Science*, 20(3):385-392.

WARR, J.R. e J.A. ROPER, 1965. Resistance to various inhibitors in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 40:273-281.