

**CARACTERÍSTICAS, PROPRIEDADES E ESTABILIZAÇÃO DE  
DISSÔMICOS EM *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter**

**ALINE APARECIDA PIZZIRANI**

**Orientador : PROF. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura "Luz de Queiroz", da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do Título de

**P I R A C I C A B A**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Março, 1977

Aos professores,

*João Lúcio de Azevedo e  
José Theóphilo do Amaral Gurgel*

*uma simples homenagem que leva  
toda a minha gratidão.*

Para

*meus pais,  
meus irmãos  
e Ruizinho*

## AGRADECIMENTOS

Sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização desse trabalho e em especial:

- Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, professor, amigo e orientador, pelo alto espírito humanitário que lhe é peculiar.
- Prof. Dr. José Theóphilo do Amaral Gurgel, pela nossa iniciação na pesquisa e contínuo interesse que tem demonstrado.
- Prof. Dr. Ernesto Paterniani, pelas facilidades concedidas como Diretor do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo.
- Professores do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, pela contribuição para nossa formação científica.
- Professores do Departamento de Genética, Evolução e Bioestatística da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Rio Claro, pelo constante incentivo na nossa formação científica.
- Prof. Dr. Roland Vencovsky e Isaias Olívio Geraldi, pela valiosa orientação na execução da análise estatística.

- Funcionários do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelos serviços prestados.
- Funcionários do Setor de Genética de Microrganismos, Srs. Antonio José Rocha Campos, Luiz Próspero, Rodolfo Furini e Salvador Pexe, pelos serviços técnicos prestados.
- Bibliotecária do Instituto de Genética, Sra. Nilza Maria Nalle Bértoli, pela inestimável colaboração.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro concedido que possibilitou a execução desse trabalho.
- Colegas do curso de Pós-Graduação de Genética e Melhoramento de Plantas, pela amizade, apoio e colaboração.
- Cláudio Costa, pelas sugestões e auxílio na correção do manuscrito.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO . . . . .	01
2. REVISÃO DA LITERATURA. . . . .	03
2.1. Aspectos citológicos e aberrações cromossômicas numéricas em <i>Aspergillus nidulans</i> . . . . .	03
2.2. Letais recessivos em <i>Aspergillus nidulans</i> . . . . .	08
3. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	14
3.1. Linhagens utilizadas. . . . .	14
3.1.1. Marcadores genéticos e fenótipos dos mutantes utilizados. . . . .	17
3.2. Meios de cultura e soluções usadas. . . . .	18
3.2.1. Meio mínimo. . . . .	18
3.2.2. Meio completo. . . . .	18
3.2.3. Solução de vitaminas . . . . .	19
3.2.4. Solução de ácido nucleico de leveduras . . . . .	19
3.2.5. Solução de tween . . . . .	20
3.2.6. Solução salina . . . . .	20
3.2.7. Solução de desoxicolato de sódio . . . . .	20
3.2.8. Solução fosfato pH 7,0 . . . . .	20
3.2.9. Solução acetato pH 4,4 . . . . .	21
3.2.10. Solução de nitrito de sódio. . . . .	21
3.2.11. Solução tris-ácido maleico . . . . .	22
3.2.12. Solução de metano sulfonato de etila . . . . .	22
3.2.13. Solução de albumina. . . . .	22

	<u>Página</u>
3.2.14. Solução fosfato pH 6,9 . . . . .	23
3.2.15. Solução Helly . . . . .	23
3.2.16. Meio de acetato de amônio. . . . .	23
3.2.17. Meio mínimo de galactose . . . . .	24
3.2.18. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo . . . . .	24
3.2.19. Solução de <i>p</i> -fluorfenilalanina . . . . .	24
3.2.20. Suplementos adicionados ao meio mí- nimo . . . . .	25
3.2.21. Placas de análise. . . . .	25
3.3. Esterilização e incubação . . . . .	26
3.4. Obtenção espontânea de aneuplóides com desoxi- colato de sódio . . . . .	26
3.4.1. Contagem do número de colonias haplói- des provenientes de dissômicos. . . . .	27
3.5. Tratamento com mutagênicos químicos . . . . .	28
3.5.1. Tratamento com ácido nitroso . . . . .	28
3.5.2. Tratamento com N-metil-N'-nitro-N-ni- trosoguanidina . . . . .	30
3.5.3. Tratamento com metano sulfonato de e- tila. . . . .	31
3.6. Diâmetro de conídios, de seus núcleos e por- centagem de conídios uni, bi e trinucleados..	31
3.6.1. Análise estatística. . . . .	33
3.7. Estabilização de dissômicos . . . . .	34
3.7.1. Tratamento com luz ultra-violeta e se- leção de dissômicos estáveis . . . . .	34

	<u>Página</u>
3.7.2. Tamanho do centro dissômico e número de setores haplóides. . . . .	35
3.8. Técnicas de análise genética. . . . .	35
3.8.1. Obtenção de heterocários . . . . .	35
3.8.2. Análise mitótica . . . . .	36
3.8.3. Análise meiótica . . . . .	38
4. RESULTADOS . . . . .	40
4.1. Obtenção espontânea de aneuplóides com desoxicolato de sódio . . . . .	40
4.2. Dissômicos selecionados para os próximos passos . . . . .	42
4.2.1. Colonias haplóides provenientes dos dissômicos. . . . .	42
4.3. Curvas de sobrevivência a mutagênicos químicos . . . . .	46
4.3.1. Curvas de sobrevivência ao ácido nítrico. . . . .	46
4.3.2. Curvas de sobrevivência ao N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG). . . . .	51
4.3.3. Curvas de sobrevivência ao metano sulfonato de etila. . . . .	56
4.4. Diâmetro de conídios, de seus núcleos e porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados..	70
4.5. Estabilização de linhagens dissômicas . . . . .	76
4.5.1. Seleção de dissômicos estáveis após tratamento com luz ultra-violeta . . . . .	76



4.5.2. Diâmetro e número de setores de colônias haplóides, dissômicas e dissômicas estáveis . . . . .	76
4.5.3. Análise genética dos dissômicos estáveis . . . . .	82
5. DISCUSSÃO. . . . .	87
5.1. Obtenção espontânea de aneuplóides e sua instabilidade . . . . .	87
5.2. Escolha do mutagênico químico . . . . .	90
5.3. Sobrevivência de dissômicos comparada com sobrevivência das respectivas linhagens haplóides originais em presença de metano sulfonato de etila . . . . .	91
5.4. Tamanho dos conídios de seus núcleos e porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados. . .	94
5.5. Estabilização de linhagens dissômicas . . . . .	96
6. RESUMO E CONCLUSÕES . . . . .	98
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS. . . . .	100
8. BIBLIOGRAFIA CITADA. . . . .	102

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela nº</u>		<u>Página</u>
01	- Frequência de aneuplóides obtidos espontaneamente com desoxicolato de sódio . . . .	43
02	- Características dos dissômicos selecionados	44
03	- Frequência de colônias haplóides provenientes de dissômicos . . . . .	44
04	- Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao ácido nitroso. Linhagem MSE	47
05	- Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao ácido nitroso. Linhagem <i>biA1 methG1</i> . . . . .	48
06	- Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao ácido nitroso. Linhagem <i>biA1// MSE</i> . . . . .	49
07	- *Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. Linhagem MSE . . . . .	52
08	- Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. Linhagem <i>biA1 methG1</i> . . . .	53
09	- Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. Linhagem <i>biA1// MSE</i> . . . . .	54

<u>Tabela nº</u>	<u>Página</u>
10 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila. Linhagem MSE. . . . .	57
11 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila. Linhagem <i>biA1 methG1</i> . . . . .	58
12 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila. Linhagem <i>biA1// MSE</i> . . . . .	59
13 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila. Linhagem $d_1$ . . . . .	61
14 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila. Linhagem $d_2$ . . . . .	62
15 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila. Linhagem <i>proA1 pabaA6 yA2</i> . . . . .	64
16 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila. Linhagem $d_3$ . . . . .	65
17 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila. Linhagem A. . . . .	67

<u>Tabela nº</u>	<u>Página</u>
18 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila. Linhagem $d_4$ . . . . .	68
19 - Valores médios obtidos (de 30 medições) e respectivos desvios padrões do diâmetro de conídios e núcleos de linhagens haplóides e dissômicas. . . . .	71
20 - Valores obtidos para a razão dissômico/linhagem haplóide (d/L) a partir das médias originais e respectivos desvios padrões . . . .	72
21 - Intervalos de confiança obtidos para as razões dissômico/linhagem haplóide. . . . .	73
22 - Porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados de linhagens haplóides e dissômicas (total entre 800-900 conídios) . . . . .	75
23 - Diâmetro e número de setores das linhagens MSE, dissômica $d_1$ e dissômicas estáveis . .	78
24 - Diâmetro e número de setores das linhagens MSE, dissômica $d_2$ e dissômicas estáveis . .	79
25 - Diâmetro e número de setores das linhagens <i>proA1 pabaA6 yA2</i> , dissômica $d_3$ e dissômicas estáveis. . . . .	80
26 - Diâmetro e número de setores das linhagens A, dissômica $d_4$ e dissômicas estáveis . . .	81
27 - Análise mitótica do $d_{2.1}$ . . . . .	83
28 - Análise meiótica do $d_{2.1}$ . . . . .	84
29 - Análise mitótica do $d_{2.2}$ . . . . .	85
30 - Análise meiótica do $d_{2.2}$ . . . . .	86

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura nº</u>		<u>Página</u>
01	- Marcadores genéticos da linhagem MSE. . . . .	14
02	- Marcadores genéticos da linhagem A. . . . .	15
03	- Marcadores genéticos da linhagem <i>biA1 methG1</i>	16
04	- Linhagem MSE e linhagens dissômicas $d_1$ e $d_2$ selecionadas . . . . .	45
05	- Linhagem A e linhagens dissômicas $d_3$ e $d_4$ selecionadas. . . . .	45
06	- Curvas de sobrevivência ao ácido nitroso. Linhagens <i>biA1//MSE</i> , MSE e <i>biA1 methG1</i> . . .	50
07	- Curvas de sobrevivência ao N-metil-N'-nitro- -N-nitrosoguanidina. Linhagens <i>biA1//MSE</i> , MSE e <i>biA1 methG1</i> . . . . .	55
08	- Curvas de sobrevivência ao metano sulfonato de etila. Linhagens <i>biA1//MSE</i> , MSE e <i>biA1 methG1</i> . . . . .	60
09	- Curvas de sobrevivência ao metano sulfona- to de etila. Linhagens MSE, $d_1$ e $d_2$ . . . .	63
10	- Curvas de sobrevivência ao metano sulfonato de etila. Linhagens <i>proA1 pabaA6 yA2</i> e $d_3$ , . . . .	66
11	- Curvas de sobrevivência ao metano sulfonato de etila. Linhagens A e $d_4$ . . . . .	69
12	- Intervalo de confiança das razões dissômi- co/linhagem haplóide. . . . .	74

## 1. INTRODUÇÃO

O fenômeno da instabilidade mitótica ou somática ocorre na maioria dos seres vivos. Em fungos, particularmente no caso do *Aspergillus nidulans*, esse fenômeno é bastante estudado devido as facilidades inerentes ao próprio sistema. Nesse microrganismo, casos de instabilidade podem ser devido a vários fatores, principalmente aberrações cromossômicas e herança extra-nuclear.

Aberrações cromossômicas, como a dissomia ( $n+1$  cromossomos), são frequentes em *A. nidulans* e já foram obtidas para os oito cromossomos que constituem o complemento haplóide do organismo. Os dissômicos são isolados com relativa facilidade, tanto a partir de linhagens diplóides quanto de haplóides e, dependendo do cromossomo adicional, uma morfologia característica lhes é conferida (UPSHALL, 1971); KÄFER e UPSHALL, 1973). No entanto, uma série de estudos podem ser feitos com essas aberrações, principalmente no que se refere ao seu isolamento, análise citológica, estabilização e possível obtenção de dados relativos ao tamanho do cromossomo envolvido.

Em vista disso, o presente trabalho foi desenvolvido com a finalidade de se obter dissômicos a partir de linhagens normais e com duplicação cromossômica por via mitótica, afim de se comparar a frequência de aneuplóides obtidos de linhagens com aberração cromossômica e isentas dessas aberrações. Em segundo lugar verificar os efeitos de mutagênicos químicos na sobrevivência de haplóides, diplóides e dissômicos objetivando determinar o tamanho do cromossomo envolvido na aneuploidia. Além disso, estudar citologicamente o tamanho do conídio e do núcleo em linhagens dissômicas, com parando-os com os das linhagens haplóides das quais se originaram. Finalmente, estabilizar os dissômicos através de um sistema de letais balanceados. A importância de se obter es tabilização em dissômicos de *A. nidulans*, poderá no futuro propiciar a aplicação dos resultados desses estudos em fungos instáveis, produtores de substâncias de valor industrial.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura será dividida em duas partes principais que interessam diretamente ao presente trabalho. Na primeira parte será feita uma revisão sobre os aspectos citológicos e aberrações cromossômicas numéricas em *Aspergillus nidulans* e a segunda parte será relativa a sistema com letais recessivos em *Aspergillus nidulans*.

### 2.1. Aspectos citológicos e aberrações cromossômicas numéricas em *Aspergillus nidulans*

Citologicamente, *ELLIOTT (1960)* estabeleceu como sendo oito o número haplóide de cromossomos em *A. nidulans*, os quais são de difícil observação. Estudou o comportamento de núcleos em ascos de linhagens haplóides observando na diacinese e metafase I, oito bivalentes: três grandes sendo um deles com satélite, dois de tamanho médio, dois pequenos



e um muito pequeno. Em linhagens diplóides, a meiose ocorre normalmente até a metafase I, mas, fases posteriores típicas, bem como ascos com esporos, são dificilmente observados.

Outros aspectos sobre a citologia de *A. nidulans* foram dados por *ROBINOW e CATEN (1969)* empregando novas técnicas de coloração que permitiram melhor visualização dos núcleos. Estudaram o comportamento de núcleos de hifas em crescimento e mostraram a presença de fibras entre dois núcleos filhos, sugerindo que essas fibras representam o fuso mitótico. Pela microscopia eletrônica verificaram que o fuso é formado por fibrilas. Foi proposto que os cromossomos se ligam ao fuso e com a elongação das fibrilas, as cromátides irmãs são separadas. Durante o processo de divisão não foi encontrada dissociação da membrana nuclear.

Com relação às aberrações cromossômicas numéricas, *KÄFER (1960)* descreveu o fenômeno da recombinação mitótica em linhagens diplóides através da haploidização, onde ocorrem perdas sucessivas de cromossomos atingindo o estado haplóide. Em trabalho subsequente, *KÄFER (1961)* descreveu o fenômeno da aneuploidia, onde o estado haplóide é obtido por um processo de não disjunção mitótica.

*POLLARD e col. (1968)* estudaram os efeitos exercidos pelas aberrações cromossômicas na não disjunção mitótica e meiótica, estimando a frequência de aneuplóides do

tipo  $n + 1$  em cruzamentos de linhagens normais e de linhagens com aberração cromossômica. Em cruzamentos entre linhagens normais, foram produzidos aneuplóides com frequência extremamente baixa, indicando ser a incidência de não disjunção meiótica muito rara. Em cruzamentos entre linhagens com translocação, ao contrário, encontrou-se maior frequência de aneuplóides. Foi sugerido que, como em organismos superiores (STUTERVANT, 1926; DOBZHANSKY, 1930, BEADLE, 1932; GLASS, 1933) pelo fato de translocações terem sido encontradas em *A. nidulans* (KÄFER, 1965), que os cromossomos homólogos não idênticos estruturalmente mostram um aumento na frequência de não disjunção meiótica. As frequências de aneuplóides mitóticos e meióticos foram diferentes, onde a não disjunção mitótica não foi influenciada pelas aberrações cromossômicas. Concluiu-se que o processo de segregação cromossômica que dá origem aos aneuplóides meióticos não é o mesmo que origina os mitóticos ou, na meiose as aberrações tem efeitos específicos no processo, possivelmente, interagindo com recombinação.

Ainda, POLLARD e col. (1968) mostraram que colônias dissômicas ou trissômicas são anormais no fenótipo, somaticamente instáveis e apresentam um fenótipo específico, dependendo de qual seja o cromossomo adicional. UPSHALL (1971) constatou que essa especificidade fenotípica é válida também para aneuplóides isolados de linhagens da coleção de Birmingham, que tem bases genéticas diferentes das linhagens de

Glasgow utilizadas por *POLLARD e col. (1968)*.

*AZEVEDO e ROPER (1970)* estudando variantes deterioradas a partir de uma linhagem com duplicação cromossômica, verificaram que um desses deteriorados ( $V_8$ ) produzia alta frequência de dissômicos para o grupo de ligação III. Vários efeitos do ambiente, como alterações no pH e temperatura, foram estudados com relação à frequência de dissômicos produzidos por essa linhagem (*GABRIELLI*, dados ainda não publicados).

*DANTAS D'ARCE (1972)* estudando dissômicos de *A. nidulans* procurou correlacionar grupos de ligação e cromossomos através de curvas de sobrevivência à luz ultra-violeta. No entanto, a luz ultra-violeta mostrou-se não ser o agente indicado no caso, em virtude de problemas relacionados principalmente com a coloração dos conídios.

Quanto aos aneuplóides de *A. nidulans*, uma descrição completa dos oito dissômicos e trissômicos foi dada por *KÄFER e UPSHALL (1973)*, inclusive o tipo  $n+1$  para o cromossomo VIII, que tem baixa viabilidade e não havia sido descrito anteriormente. De modo geral, os aneuplóides são reconhecidos pelo seu crescimento lento, inicialmente de morfologia anormal, com pouca conidiação e altamente instáveis, produzindo setores haplóides. Os oito tipos dissômicos são distintos, diferindo claramente no tamanho do centro aneuplóide, na conidiação e na densidade e coloração do micélio, embora

essas características sejam influenciadas por efeitos do ambiente.

Como descrito anteriormente, cruzamento entre linhagens de *A. nidulans* contendo translocações heterozigotas, aumenta a frequência de não disjunção, principalmente para os cromossomos envolvidos na translocação, resultando dissômicos que podem ser detectados visualmente (POLLARD e col., 1968). Baseados nesse fato, UPSHALL (1974) e UPSHALL e KÄFER (1974), consideraram que outras translocações teriam efeitos similares. Através da análise meiótica, tais translocações foram detectadas pela observação da frequência dos tipos dissômicos e novas translocações foram identificadas pela caracterização genética e visual. Esse método permitiu a identificação da presença de uma aberração cromossômica, pela inspeção dos segregantes meióticos, eliminando desse modo uma análise citológica.

Usando dissômicos provenientes de cruzamentos entre linhagens com translocação recíproca, KÄFER (1973, 1975) descreveu novas técnicas para mapear translocações, que também foram usadas para localizar centrômeros e marcas meioticamente não ligadas.

Certos agentes que induzem ou selecionam haplóides a partir de linhagens diplóides, são também indutores efetivos de aneuplóides em *A. nidulans* e outros fungos. Assim

aneuplóides são obtidos no processo de haploidização por *p*-fluorfenilalanina (LHOAS, 1961; MORPURGO, 1961). O mesmo pode ser obtido com certos fungicidas como o benlate (HASTIE, 1970), griseofulvina (KAPPAS e GEORGOPOULOS, 1974) e cloroneb (AZEVEDO e SANTANA, 1975).

Aneuplóides de constituição  $n + 1$  são obtidos também em outros fungos, tais como, *Neurospora crassa* (PITTENGEN, 1954) e *Saccharomyces cerevisiae* (COX e BEVAN, 1962). Na realidade, nessa levedura, PARRY e COX (1970) encontraram, ao contrário do que ocorre nos outros fungos, uma alta tolerância a aneuploidia. Quase simultaneamente, SHAFFER e col. (1971) descreveram um dissômico extremamente estável em *Saccharomyces cerevisiae*. Este dissômico, para o cromossomo III, não perde seu cromossomo adicional durante a meiose ou mitose, constituindo desse modo, um excelente material para estudos bioquímicos e genéticos.

## 2.2. Letais recessivos em *Aspergillus nidulans*

Em essência, muitos dos mutantes observados em fungos são letais. Assim, mutações para auxotrofia tem efeitos letais em meios de cultura que não apresentam o requisito nutricional específico para o qual o fungo é deficiente. No

entanto, esse tipo de mutação é reparável, pois o mutante pode crescer e ser mantido em outros meios de cultura. Um segundo tipo de mutante letal é o não reparável, isto é, aquele que só pode ser mantido na presença de seu alelo normal ou selvagem é dominante sobre o letal recessivo.

O estudo de mutantes letais recessivos não reparáveis em fungos foi realizado pela primeira vez por *ATWOOD* e *MUKAI* (1953) em *Neurospora crassa* atentando para o fato de os conídios dessa espécie serem multinucleados. É possível indução de letais em conídios multinucleados e os núcleos são mantidos por heterocariose. Assim esse método, em princípio, é aplicável a todos os fungos que podem formar heterocários e onde complementação pode ocorrer (*BURNETT*, 1975). *DE SERRES* (1969) em *Neurospora crassa* descreve um sistema de estudo de letais recessivos.

Especificamente em *A. nidulans*, mutações letais recessivas não reparáveis tem sido mais estudadas em linhagens diplóides do que em aneuplóides ou em linhagens haplóides duplicadas. O primeiro trabalho sobre letais recessivos em diplóides foi o de *TECTOR* e *KAFER* (1962). Usando altas doses de raios gama, analisaram os setores haplóides provenientes de cada núcleo diplóide irradiado. Mais da metade dos sobreviventes apresentou translocações viáveis, enquanto que, somente um caso de letal recessivo foi detectado em uma

amostra de 27 núcleos diplóides analisados. Posteriormente, *KÄFER e CHEN (1964)* usando luz ultra-violeta, também em diplóides, encontraram maior número de letais recessivos e menor de translocações, quando comparado com os resultados de *TECTOR e KÄFER (1962)* com raios gama.

Ainda com relação à indução de letais recessivos com luz ultra-violeta, *AZEVEDO (1966)* estudou duas linhagens diplóides de *A. nidulans* sob esse aspecto. A frequência total de letais recessivos foi de 29,3% sendo 56 vezes maior do que a de deficientes nutricionais induzidos pelo mesmo mutagênico. A maior parte dos letais encontrados pode ser localizada nos diferentes grupos de ligação. Em trabalho subsequente, *AZEVEDO e ROPER (1967)* estimaram a frequência de letais recessivos, espontânea e induzida por luz ultra-violeta, em duas linhagens diplóides. Espontaneamente, nenhum letal foi detectado enquanto que com tratamento, 28% de letais foram encontrados. Dos isolados, um foi heterozigoto para dois letais não ligados, cada um deles num componente haplóide, dando um heterocário estável que produzia duas classes de conídios haplóides não viáveis. Outro isolado apresentou um sistema balanceado por dois letais não alélicos ligados em *trans* e seis foram diplóides estáveis que não produziram setores haplóides.

Além de raios gama e ultra-violeta, outros mu-

tagênicos foram empregados para induzir letais recessivos em diplóides de *A. nidulans*. AZEVEDO (1970) estimou a frequência de mutações recessivas letais induzidas pelo ácido nítrico e encontrou um total de 8% de letais. Um dos isolados foi heterozigoto para dois letais não alelos em *trans* no cromossomo III e, após irradiação com luz ultra-violeta, houve produção de um heterocário estável, balanceado pelos dois letais. A análise genética mostrou que a luz ultra-violeta induziu a translocação de um segmento do cromossomo III, carregando um recessivo letal e também o alelo selvagem do outro letal, para o cromossomo V. A comparação dos dados encontrados com luz ultra-violeta (AZEVEDO e ROPER, 1967) e com os do ácido nítrico, revelou que a irradiação ultra-violeta induz aproximadamente três vezes mais letais em diplóides do que o mutagênico químico usado nesse trabalho.

DANTAS D'ARCE (1972) trabalhando com aneuplóides, procurou verificar a possibilidade de aumentar a estabilidade desses aneuplóides através de um sistema de letais balanceados induzidos por luz ultra-violeta. A estabilidade pode ser demonstrada, pelo menos parcialmente. A razão da não estabilização completa foi devido, provavelmente, a ocorrência de permuta somática produzindo recombinantes que não mais carregavam o sistema de letais balanceados e que, portanto, perderam o cromossomo em excesso.



PARAG e ROPER (1975) conseguiram estabilizar com luz ultra-violeta uma linhagem duplicada de *A. nidulans*. A irradiação ultra-violeta induziu deleção ou uma mutação letal no segmento do cromossomo duplicado. Como evidências claras da presença de mutação letal não foi conseguida, os autores concluíram que uma deleção foi a responsável pela estabilidade da linhagem, proporcionando uma seleção contra a perda do segmento homólogo translocado.

A estabilização de linhagens de fungos, através de um sistema de letais balanceados, tem sido preconizada como um dos processos de manutenção das propriedades favoráveis de linhagens industriais. Esses aspectos são descritos nos trabalhos de BALL (1973a, 1973b) e BALL e AZEVEDO (1976). Sugere-se, por exemplo, que uma linhagem industrial de *Penicillium chrysogenum* utilizada no laboratório industrial Lilly para produção de antibiótico é na realidade um diplóide balanceado letal (BALL, 1973b) que foi obtido à semelhança do procedimento descrito por AZEVEDO e ROPER (1967). Também recentemente em uma linhagem de *Aspergillus niger*, utilizada industrialmente na produção de ácido cítrico, a baixa viabilidade dos esporos bem como o aumento de produção do ácido cítrico após irradiação com raios gama, foi atribuída à existência de um núcleo carregando um letal recessivo em conídios. Como esses conídios podem ser uni ou binucleados, os uninucleados

carregando o letal seriam inviáveis e os binucleados seriam viáveis e por heterose dariam colônias com alta produção de ácido (*SILVA, 1977*).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens utilizadas

a. Linhagem MSE (Master Strain E) contendo mar cadores 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.

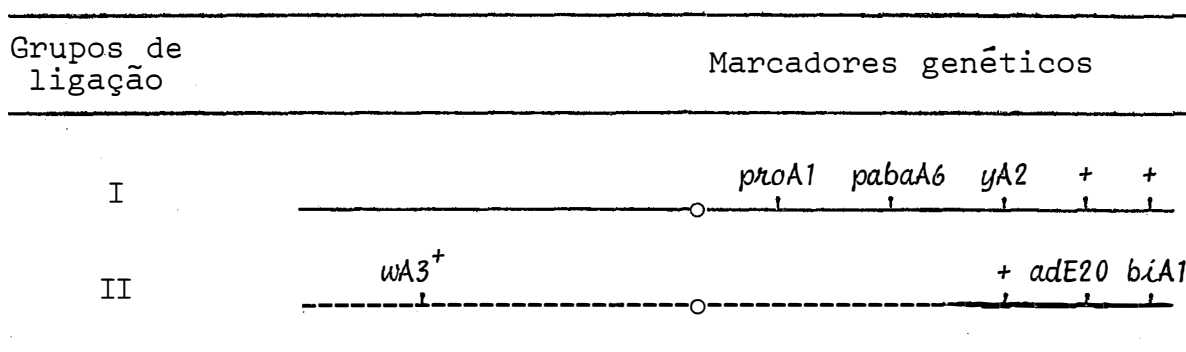
Grupos de ligação	Marcadores genéticos		
I	<i>suA1adE20</i>	<i>yA2</i>	<i>adE20</i>
II	<i>wA3</i>		
III	<i>galA1</i>		
IV		<i>pyrA4</i>	
V		<i>facA303</i>	
VI	<i>δB3</i>		
VII		<i>nicB8</i>	
VIII		<i>riboB2</i>	

Os centrômeros estão representados por o. Os fenótipos dos marcadores genéticos podem ser encontrados no ítem 3.1.1.

Obs.: *As posições dos marcadores genéticos não estão em escala no mapa.*

b. Linhagem A que apresenta uma duplicação cromossômica do grupo de ligação I, translocada para o grupo de ligação II (NGA e ROPER, 1968). A constituição genética da linhagem A pode ser observada na Figura 2.

Figura 2 - Marcadores genéticos da linhagem A.



Os centrômeros estão representados por o. Os fenótipos dos marcadores genéticos são encontrados no ítem 3.1.1.

———— grupo de ligação I

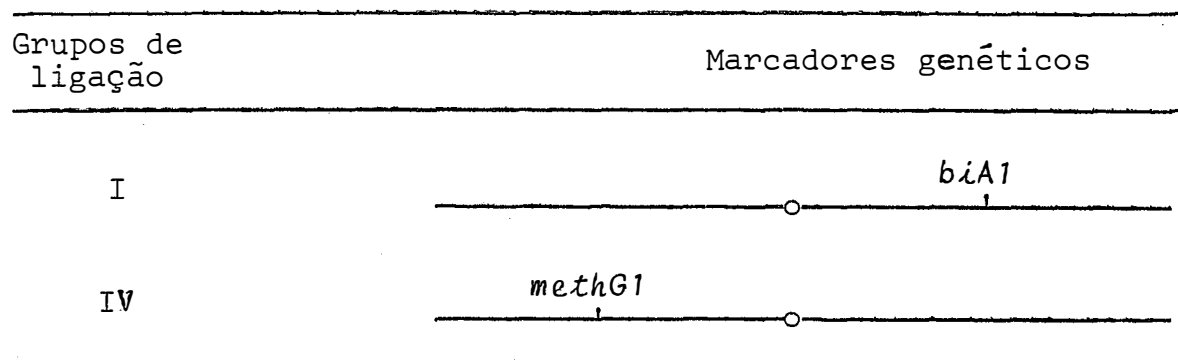
----- grupo de ligação II

Obs.: *As posições dos marcadores genéticos não estão em escala no mapa.*

c. Linhagem *phoA1 pabaA6 yA2* (não duplicada).

d) Linhagem *biA1 methG1* cuja constituição genética pode ser observada na Figura 3.

FIGURA 3 - Marcadores genéticos da linhagem *biA1 methG1*.



Os centrômeros estão representados por o. Os fenótipos dos marcadores genéticos são encontrados no item 3.1.1.

Obs.: As posições dos marcadores genéticos não estão em escala no mapa.

d. Linhagem diplóide *biA1//MSE*.

e. Linhagens dissômicas:  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$  e  $d_4$ .

As quatro primeiras linhagens são originárias do Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra e as linhagens *biA1//MSE* e dissômicas foram por nós

obtidas no Setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em Piracicaba. A linhagem *biA1//MSE* foi obtida do cruzamento das linhagens *biA1* com MSE e as dissômicas foram isoladas a partir das linhagens MSE e A.

### 3.1.1. Marcadores genéticos e fenótipos dos mutantes utilizados

<u>Marcador</u>	<u>Fenótipo</u>
<i>adE20</i>	Requisito para adenina.
<i>biA1</i>	Requisito para biotina.
<i>facA303</i>	Incapaz de crescer em meio contendo acetato como única fonte de carbono.
<i>galA1</i>	Incapaz de crescer em meio contendo <u>galactose</u> como única fonte de carbono.
<i>methG1</i>	Requisito para metionina.
<i>nicB8</i>	Requisito para ácido nicotínico.
<i>pabaA6</i>	Requisito para ácido <i>p</i> -aminobenzóico.
<i>proA1</i>	Requisito para prolina.
<i>pyroA4</i>	Requisito para piridoxina.
<i>riboB2</i>	Requisito para riboflavina.
<i>sB3</i>	Requisito para tiosulfato.
<i>suA1adE20</i>	Supressor do mutante <i>adE20</i> .
<i>yA2</i>	Conídios amarelos.
<i>wA3</i>	Conídios brancos

### 3.2. Meios de cultura e soluções usadas

#### 3.2.1. Meio mínimo

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

#### 3.2.2. Meio completo

*Preparado também 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 <i>p</i> -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 é posteriormente esterilizada em banho-maria por 15 minutos e guardada no refrigerador à 4°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 1N de HCl.

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

Ambas as soluções são aquecidas a 100°C por 20 minutos, misturadas e o pH é ajustado para 6,0 com NaOH 4%. Filtra-se e completa-se o volume para 40 ml sendo a seguir conservada no refrigerador à 4°C, sob clorofórmio.



### 3.2.5. Solução de tween

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

### 3.2.6. Solução salina

Prepara-se uma solução de cloreto de sódio 0,89% dissolvendo-se o sal em água destilada. A solução é colocada em frascos (9 ml por frasco) sendo a seguir autoclavada.

### 3.2.7. Solução de desoxicolato de sódio

Adiciona-se desoxicolato de sódio em água destilada em uma concentração de 16%. Após a autoclavagem e resfriamento, conserva-se a solução no refrigerador a 4°C.

### 3.2.8. Solução fosfato pH 7,0

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	5,304 g
$\text{KHPO}_4$ . . . . .	10,614 g
Água destilada . . . . .	1.000 ml

A solução é distribuída em frascos (9 ml por frasco), autoclavada e conservada no refrigerador a 4°C.

### 3.2.9. Solução acetato pH 4,4

#### Solução A

Ácido acético . . . . . 1,155 ml  
Água destilada. . . . . 100 ml

#### Solução B

Acetato de sódio. . . . . 1,64 g  
Água destilada. . . . . 1000 ml

Autoclavam-se separadamente as duas soluções e no momento de ser usada, misturam-se 12,75 ml da solução A com 12,25 ml da solução B em frasco esterilizado.

### 3.2.10. Solução de nitrito de sódio

Prepara-se uma solução 0,5M de nitrito de sódio dissolvendo-se o sal em água destilada esterilizada. A solução é preparada no momento da sua utilização.

### 3.2.11. Solução tris-ácido maleico

*Preparada de acordo com ADELBERG e col.(1953).*

Substitui-se os sais de fosfato empregados no meio mínimo (ítem 3.2.1.) por 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (tris) e por ácido maleico, cada em uma concentração de M/20. Ajusta-se o pH para 6,0 com NaOH 4% e autoclava-se.

Tris. . . . .	0,6057 g
Ácido maleico . . . . .	0,5804 g
Meio mínimo líquido . . . . .	100 ml

### 3.2.12. Solução de metano sulfonato de etila

Prepara-se uma solução de metano sulfonato de etila 2% (v/v) adicionando-se o mesmo em água destilada esterilizada, imediatamente antes do seu uso.

### 3.2.13. Solução de Albumina

Prepara-se uma solução de albumina 5% adicionando-se clara de ovo em água destilada, filtra-se e conserva-se em frasco escuro a 4°C no refrigerador.

### 3.2.14. Solução fosfato pH 6,9

#### Solução A

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . . . . . 27,80 g  
Água destilada. . . . . 1000 ml

#### Solução B

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . . . . . 53,65 g  
Água destilada. . . . . 1000 ml

Coloca-se 45 ml da solução A, 55 ml da solução B e 100 ml de água destilada.

### 3.2.15. Solução Helly

Bicromato de potássio . . . . . 3 g  
Cloreto de mercúrio . . . . . 5 g  
Água destilada . . . . . 100 ml

Conserva-se a solução em frasco escuro.

### 3.2.16. Meio de acetato de amônio

*Preparado de acordo com 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> · 7H <sub>2</sub> O . . . . .	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> . . . . .	traços
ZnSO <sub>4</sub> . . . . .	traços
Agar . . . . .	15,0 g
Água destilada. . . . .	1000 ml

pH ajustado para 6,1 com NaOH 4%.

### 3.2.17. 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.*

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

Adiciona-se ao meio mínimo líquido 2% de meio completo, distribui-se em tubos (2,5 ml por tubo) e autoclavam-se.

### 3.2.19. Solução de p-fluorfenilalanina

Prepara-se uma solução de p-fluorfenilalanina 1% dissolvendo-se o mesmo em água destilada esterilizada. A

seguir, a solução é esterilizada em banho-maria por 15 minutos e conservada no refrigerador a 4°C.

### 3.2.20. Suplementos adicionados ao meio mínimo

Prepara-se o estoque de suplementos adicionando-se cada um deles em água destilada esterilizada. A solução é a seguir colocada em banho-maria por 15 minutos para esterilização e conservada no refrigerador a 4°C.

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

### 3.2.21. Placas de análise

Para a análise genética das colonias, 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 com todos os requisitos nutricionais.

### 3.3. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e as soluções foram sempre esterilizados em autoclave por 15 minutos a 1 atmosfera de pressão e a 120°C.

A temperatura de incubação foi de 37°C em todos os experimentos, exceto nos casos que serão assinalados.

### 3.4. Obtenção espontânea de aneuplóides com desoxicolato de sódio

Foram utilizadas as linhagens haplóides normais MSE e *bia1 methG1*, e a linhagem A, haplóide com duplicação cromossômica. Separadamente, conídios dessas linhagens foram transferidos para solução de tween com auxílio de uma alça de platina, as cadeias de conídios foram desagregadas por

agitação e a quantidade de conídios nas suspensões foi estimada através de hematímetro. Foram feitas diluições adequadas em solução salina e 0,1 ml das suspensões foi semeado em placas de Petri com meio completo ao qual se adicionou 2,5 ml da solução de desoxicolato de sódio por 1000 ml de meio dando uma concentração final de 0,08% (MACKINTOSH e PRITCHARD, 1963). Após a incubação de 72 horas, procedeu-se a contagem das colônias e a observação das mesmas.

Conídios das colônias com morfologia ou crescimento anormais foram transferidos para tween e depois de desagregados foram diluídos em salina e semeados em placas com meio completo. Microcolônias monospóricas (16 - 18 horas de incubação) foram transferidas uma a uma para placas com meio completo e incubadas por 72 horas. Após esse período de incubação, as colônias identificadas visualmente como aneuplóides, foram estocadas em tubos de ensaio contendo meio completo inclinado e conservadas no refrigerador. Dos aneuplóides obtidos, quatro dos identificados como dissômicos foram selecionados para os próximos passos.

#### 3.4.1. Contagem do número de colônias haplóides provenientes de dissômicos

Conídios de cada linhagem dissômica foram transferidos para solução de tween, desagregados por agitação e o



número de conídios da suspensão foi estimado em hematímetro. A seguir, fizeram-se diluições adequadas em salina e semeou-se 0,1 ml em placas com meio completo. Após o período de incubação de 72 horas, contaram-se o número de colônias dissômicas e o número de colônias haplóides.

### 3.5. Tratamento com mutagênicos químicos

As linhagens haplóides MSE e *biA1 methG1* e a linhagem diplóide *biA1// MSE*, foram tratadas com os mutagênicos químicos: ácido nitroso, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG) e metano sulfonato de etila (EMS). Com a relação ao último mutagênico citado, foram empregadas também as linhagens haplóides A e *proA1 pabaA6 yA2* e as linhagens dissômicas  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$  e  $d_4$ .

#### 3.5.1. Tratamento com ácido nitroso

As linhagens foram submetidas ao tratamento com ácido nitroso pelo método de *SIDDIQI (1962)*. Os conídios de cada linhagem foram colocados em solução de tween e após serem desagregados por agitação e estimado o seu número na suspensão, em hematímetro, adicionou-se solução de acetato pH 4,4 e solução de nitrito de sódio. Os controles foram feitos do

mesmo modo, exceto a adição da solução de nitrito de sódio.

Os frascos "tratamento" e "controle" foram mantidos a 37°C em banho-maria durante todo o experimento e cada um deles com 10 ml, como segue:

	Trata- mento	Controle
Solução de nitrito de sódio 0,5M . .	0,33 ml	-
Solução acetato pH 4,4 . . . . .	9,17 ml	9,50 ml
Suspensão de conídios em tween . . .	0,50 ml	0,50 ml
Volume total . . . . .	10,00 ml	10,00 ml

O tratamento foi interrompido em diferentes intervalos de tempo 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 minutos, pela transferência de amostras (1 ml) para solução fosfato pH 7,0. Foram feitas diluições convenientes em solução fosfato e amostras de 0,1 ml foram semeadas em placas com meio completo. Após 72 horas de incubação, procedeu-se a contagem das colônias e, considerando-se as diluições feitas e o volume semeado, estimou-se o número de conídios viáveis por mililitro. A porcentagem de sobrevivência foi calculada para os diferentes intervalos de tempo em relação ao controle (tempo zero) considerado com o nível de 100% de sobrevivência.

### 3.5.2. Tratamento com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG)

O método de tratamento com NG foi o mesmo usado por *CLUTTERBUCK e SINHA (1966)*. Adicionou-se 6 mg de NG em 10 ml de solução tris-ácido maleico e aqueceu-se em banho-maria até a dissolução completa do agente mutagênico. Um ml da suspensão de conídios previamente feita em tween e de quantidade conhecida, foi adicionada a 1 ml da solução tris-ácido maleico. A seguir, misturou-se a suspensão de conídios (2 ml) com a solução com NG (10 ml) dando uma concentração final de NG de 0,5 mg por mililitro. Da mistura, retirou-se imediatamente uma amostra de 1 ml (tempo zero) e o restante foi incubado a 37°C com agitação ocasional. Amostras (2 ml) de 10, 20 e 30 minutos foram retiradas sendo que o tratamento foi paralisado com centrifugação por 5 minutos a 2000 rpm. Ressuspendeu-se em água esterilizada, centrifugou-se e ressuspendeu-se novamente em 2 ml de água esterilizada. A seguir, 1 ml foi transferido para solução salina e após diluições adequadas, fez-se a semeadura dos conídios em placas com meio completo. Após o período de incubação de 72 horas, estimou-se o número de conídios viáveis por mililitro e as porcentagens de sobrevivência em relação ao tempo zero (100% de sobrevivência), considerando-se o número de colônias sobreviventes, a diluição e o volume semeado.

### 3.5.3. Tratamento com metano sulfonato de etila (EMS)

Cada linhagem foi tratada com EMS de acordo com o método descrito por ROSATO (1973). Preparou-se uma suspensão de conídios em 3 ml de solução de tween e estimou-se o seu número em hematímetro. Posteriormente, dividiu-se a suspensão em duas porções: uma de 2 ml e outra de 1 ml. Na porção de 2 ml, adicionou-se 4 ml de uma solução de EMS 2%, dando uma concentração aproximada de 1,33% (v/v). A suspensão foi incubada em estufa a 28°C e após 2,4 e 6 horas de tratamento, retirou-se 1 ml que foi colocado em solução salina. Após diluições adequadas, semeou-se 0,1 ml em placas com meio completo. Na outra porção de conídios adicionou-se 2 ml de água esterilizada (tempo zero). Após 72 horas de incubação a 37°C, fez-se a contagem das colônias, estimou-se o número de conídios viáveis por ml e a porcentagem de sobrevivência para cada tempo de tratamento. As colônias resultantes da porção que não sofreu tratamento foram consideradas com o nível de 100% de sobrevivência.

### 3.6. Diâmetro de conídios, de seus núcleos e porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados

Conídios das linhagens MSE, A, *proA1 pabaA6 yA2*,  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$  e  $d_4$  foram transferidos para tween, desagregados,

estimado o seu número em hematímetro e convenientemente diluídos em solução salina. Amostras de 0,1 ml foram semeadas em placas com meio completo e após 72 horas de incubação, fizeram-se preparações citológicas de conídios provenientes de cada uma das linhagens, seguindo-se o método de *ROBINOW e CATTEN (1969)*, modificado por *Paes de Barros (1977)*.

Com auxílio de uma alça de platina, colocaram-se conídios sobre uma lâmina, adicionou-se uma gota da solução de albumina, homogeneizou-se a suspensão com outra lâmina e estas foram deixadas secar separadamente. A fixação foi feita colocando-se 5 ml da solução Helly em vidro de relógio e adicionando-se 0,3 ml de formol neutro, solução na qual as lâminas ficaram por 15 minutos, no escuro. Decorrido esse tempo, lavaram-se as lâminas em álcool etílico 70% e fez-se a hidrólise com HCl 1N a 63°C em banho-maria por 20 minutos. Depois disso, as lâminas foram lavadas em água destilada por 2 vezes. Colocou-se 10 ml da solução fosfato pH 6,9 e acrescentou-se 18 gotas de Giemsa onde as lâminas ficaram por 60 minutos. Decorrido esse tempo, foram lavadas em solução fosfato e colocadas em lâmina para observação microscópica.

Após a preparação das lâminas de cada linhagem, fizeram-se medidas do diâmetro de 30 conídios (uninucleados) e dos seus respectivos núcleos com ocular micrométrica com charriot (Carl Zeiss, 8 x) e objetiva de imersão. Fez-se também a contagem do número de conídios uni, bi e trinucleados, num total de 800 - 900 conídios.

### 3.6.1. Análise estatística

Afim de se compararem os diferentes dissômicos com relação ao diâmetro dos conídios e núcleos, realizou-se uma análise estatística dos dados. Para tal, calculou-se o desvio padrão dos valores obtidos para o diâmetro dos conídios e núcleos de cada linhagem haplóide e dissômica. Como porém, tinha-se interesse em comparar os dissômicos entre si, obtiveram-se as razões do diâmetro de cada um deles com as linhagens haplóides que lhes deram origem. A seguir, calculou-se o desvio padrão dessa razão, dissômico/linhagem de origem, utilizando-se a fórmula de *OSBORNE e PATERSON (1952)*, isto é:

Se  $Z = \frac{x}{y}$  então,

$$\hat{V}(Z) = \frac{y^2V(x) + x^2V(y) - 2 \cdot xy \text{ Cov}(x,y)}{y^4}$$

Posteriormente essas razões foram comparadas utilizando-se os respectivos intervalos de confiança considerando-se cada razão  $\pm$  dois desvios padrões ( $r \pm 2s$ ). A seguir, esses dados foram comparados considerando-se como não diferentes entre si as razões cujos intervalos de confiança fossem sobrepostos na maior parte.

### 3.7. Estabilização de dissômicos

#### 3.7.1. Tratamento com luz ultra-violeta e seleção de dissômicos estáveis

As quatro linhagens dissômicas selecionadas tiveram, separadamente, o mesmo tratamento. Os conídios foram colocados em solução de tween, desagregados, estimado seu número na suspensão em hematímetro e feita a diluição de 1:10 em solução salina. Essa suspensão foi colocada em placa de Petri estéril e irradiada com luz ultra-violeta (2537 Å) durante intervalos de tempo diferentes. As linhagens  $d_1$  e  $d_2$  sofreram três minutos de irradiação e as linhagens  $d_3$  e  $d_4$  quatro minutos de irradiação. Em seguida foram diluídas em solução salina e semeadas em placas com meio completo. Paralelamente, repetiu-se o mesmo processo com conídios não irradiados. Após 72 horas de incubação, procedeu-se a contagem das colônias dissômicas e seleção das mais estáveis inoculando-as em placas com meio completo (3 por placa) mais uma inoculação da colônia dissômica não irradiada, para confronto. As colônias que apresentaram centros dissômicos maiores e poucos setores haplóides, após o período de incubação de 72 horas, foram estocadas em tubos com meio completo inclinado.

A dosagem de 3 e 4 minutos de irradiação foi resultante de curvas de sobrevivência previamente feitas para

as linhagens dissômicas, afim de se conhecer a dosagem que desse 1% de sobrevivência a luz ultra-violeta.

### 3.7.2. Tamanho do centro dissômico e número de setores haplóides

Separadamente, conídios das linhagens MSE, A, *proA1 pabaA6 yA2*,  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$  e  $d_4$  e dos dissômicos estáveis  $d_{1.1}$ ,  $d_{1.2}$  .....  $d_{1.5}$ ;  $d_{2.1}$ ,  $d_{2.2}$  .....  $d_{2.5}$ ;  $d_{3.1}$ ,  $d_{3.2}$  .....  $d_{3.5}$  e  $d_{4.1}$  .....  $d_{4.5}$ , foram colocados em solução de tween, desagregados e após estimativa da quantidade de conídios em hematímetro, foram feitas diluições em salina e semeados em placas com meio completo. Após 16 - 18 horas de incubação, 15 microcolonias de cada linhagem foram retiradas e colocadas, uma a uma, no centro de placas contendo meio completo. Após 6 dias de incubação, fizeram-se medidas do diâmetro total das colonias, do centro dissômico quando linhagem dissômica, bem como contou-se o número de setores de cada colônia.

## 3.8. Técnicas de análise genética

### 3.8.1. Obtenção de heterocários

Utilizou-se o mesmo método descrito por *PON-*



*TECORVO e col. (1953)* ligeiramente modificado. Colocou-se meio mínimo sólido em placas de Petri e com auxílio de um tubo de ensaio pequeno, recortaram-se e retiraram-se três cilindros do meio de cultura formando desse modo três pequenos "poços". Conídios de ambas as linhagens, dissômica estável e *proA1 pabaA6 yA2*, que requerem diferentes fatores de crescimento, foram colocadas em meio mínimo líquido mais 2% de meio completo. Em seguida, essa suspensão foi colocada para preencher os "poços" feitos no meio mínimo das placas. Após 6 - 7 dias de incubação, originaram setores heterocarióticos que continham núcleos geneticamente diferentes na mesma hifa, o que permitiu o crescimento. Essa modificação na técnica, isto é, a colocação das linhagens diretamente nos "poços", foi usada a fim de reduzir o número de mitoses necessárias até a formação de peritécios e de conídios diplóides.

### 3.8.2. Análise mitótica

A análise mitótica foi feita segundo o método de *ROPER (1952)* através do ciclo parassexual. Nos setores heterocarióticos, obtidos de acordo com o método descrito no item anterior, a maioria dos conídios formados são haplóides e não conseguem se desenvolver em meio mínimo. No entanto, pode haver fusão de núcleos haplóides formando núcleos diplóides.

des heterozigotos que originam conídios diplóides e crescem em meio mínimo. Como a porcentagem do aparecimento de conídios diplóides é muito baixa, transferiu-se grande quantidade de conídios dos setores heterocarióticos para solução de *tween* (aproximadamente  $10^7$  conídios por ml) e semeou-se em placas contendo meio mínimo. Após 72 horas de incubação, isolaram-se diplóides heterozigotos.

O reconhecimento dos diplóides foi feito por seu crescimento em meio mínimo e pelo tamanho dos conídios. A medição dos conídios foi feita em microscópio com ocular *micrométrica*, tomando-se cadeias de cinco conídios em lâminas com lisol diluído (1:10).

Os diplóides obtidos foram induzidos a haplóidização pelo método da *p*-fluorfenilalanina (*p*FA) que inibe o crescimento de diplóides, permitindo o crescimento de setores haplóides. A haploidização ocorre através da aneuploidia com perdas sucessivas de cromossomos (*KÄFER, 1961*). A técnica consistiu em adicionar 1,5 ml da solução a 1% de *p*FA em 200 ml de meio completo. A seguir, os diplóides foram inoculados em 4 pontos das placas e após 7-10 dias de incubação, surgiram setores haplóides brancos e amarelos. Os setores foram purificados em meio completo e a seguir inoculados um a um em 26 pontos fixos em placa com meio completo. 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.

### 3.8.3. Análise meiótica

A análise meiótica 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, as placas contendo meio mínimo com os "poços" preenchidos pela suspensão de conídios das duas linhagens envolvidas no cruzamento, foram vedadas com fita celulósica por 8 - 10 dias. Após esse período de incubação, os maiores peritécios foram retirados sob lupa e rolados em placas contendo meio mínimo, para retirar os conídios aderentes e as células de Hülle. Cada peritécio isolado foi transferido para tubos de ensaio contendo solução de tween, onde foram esmagados 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 foi semeado 0,1ml

em placas com meio completo e a suspensão restante foi conservada no refrigerador. As placas foram incubadas por 72 horas, após o que foi possível verificar se os peritécios eram híbridos ou não e se nos híbridos havia a ocorrência de dissômicos. Os peritécios autofecundados ou híbridos que não produziam colônias dissômicas foram descartados, utilizando-se para a análise somente um peritécio híbrido no qual o cromossomo em excesso da linhagem dissômica não havia se perdido durante a meiose.

Os ascósporos do peritécio selecionado foram semeados em placas contendo meio completo e após 72 horas de incubação contaram-se as colônias normais e dissômicas. As colônias normais foram transferidas para placas mestras com meio completo e após 72 horas de incubação, as 26 colônias foram replicadas para as placas de análise com auxílio do replicador. Após 24, 48 e 72 horas de incubação, fizeram-se as leituras das placas de análise.

## 4. RESULTADOS

Para maior facilidade de apresentação, os resultados se encontram divididos em sub-ítem, seguindo a ordem de obtenção dos dados.

### 4.1. Obtenção espontânea de aneuplóides com desoxicolato de sódio

Foram feitas sementeiras consecutivas da linhagem MSE, haplóide normal, em 100 placas de Petri contendo meio completo e desoxicolato de sódio (0,08%), que reduz o tamanho das colônias facilitando o reconhecimento de aneuplóides. Foram obtidas 5.985 colônias normais e 7 colônias instáveis, supostas aneuplóides. Desses instáveis, 6 puderam ser identificados como do tipo  $n+1$  de acordo com sua morfologia (UPSHALL, 1971; KÄFER e UPSHALL, 1973); dois como dissômicos para o cromossomo IV e quatro como dissômicos para o

cromossomo III e um não pode ser identificado. A frequência do aparecimento dos 7 aneuplóides representa no total de 5.992 colônias, 0,117% de aneuplóides.

Usando a linhagem *bia1 methG1*, haplóide normal, o mesmo procedimento foi seguido e em 100 placas contaram-se 5.918 colônias normais e 8 supostas aneuplóides. Desses aneuplóides, três foram identificados como dissômicos para o cromossomo IV, dois para o cromossomo III e três não puderam ser identificados. Nessa linhagem, encontram-se 0,135% de aneuplóides.

Com a linhagem A, também haplóide, porém com um segmento do cromossomo I duplicado e ligado ao cromossomo II, novamente o mesmo procedimento foi seguido e em 100 placas contaram-se 4.026 colônias normais e 18 colônias instáveis. Dessas colônias instáveis, identificaram-se quatro aneuplóides como sendo do tipo  $n+1$ : um para o cromossomo III e três para o cromossomo VI. O restante não pode ser classificado morfológicamente. O aparecimento de 18 aneuplóides, no total de 4.044 colônias, representa uma frequência de 0,445%.

As frequências de aneuplóides obtidos espontaneamente com desoxicolato de sódio, para as 3 linhagens estão apresentadas na Tabela 1.

#### 4.2. Dissômicos selecionados para os próximos passos

Com base na sua morfologia típica (UPSHALL, 1971; KÄFER e UPSHALL, 1973) foram selecionados quatro dissômicos ( $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$  e  $d_4$ ) dos aneuplóides obtidos pelo método descrito no ítem anterior. As características desses dissômicos selecionados se encontram descritos na Tabela 2. A Figura 4 mostra os dissômicos  $d_1$  e  $d_2$  bem como a linhagem MSE que lhes deu origem. A Figura 5 mostra a linhagem A e os dissômicos  $d_3$  e  $d_4$  originados dessa linhagem.

##### 4.2.1. Colonias haplóides provenientes dos dissômicos selecionados

Após semeadura dos dissômicos selecionados em meio completo, contou-se o número de colonias dissômicas e o número de colonias haplóides, resultantes da perda de cromossomo em excesso nos dissômicos. A frequência de colonias haplóides provenientes de cada um dos dissômicos está mostrada na Tabela 3.

Tabela 1 - Frequência de aneuplóides obtidos espontaneamente com desoxicolato de sódio.

Linhagem	Nº total de colonias	Frequência de aneuplóides(%)
MSE	5.992	0,117
<i>biA1 methG1</i>	5.926	0,135
A	4.044	0,445



Tabela 2 - Características dos dissômicos selecionados.

Dissômico	Morfologia	Ori- gem	Grupo de ligação	Genótipo
d <sub>1</sub>	Centro marrom claro, relativamente grande; setores brancos	MSE	IV	<i>adE20; suA1adE20; yA2; wA3; galA1; pyroA4; facA303; sB3; nicB8; riboB2.</i>
d <sub>2</sub>	Centro acinzentado, pequeno; setores brancos.	MSE	III	<i>adE20; suA1ad20; yA2; wA3; galA1; pyroA4; facA303; sB3; nicB8; riboB2.</i>
d <sub>3</sub>	Centro branco amare- lado, relativamente grande; setores ama- relos.	A	VI	<i>yA2; proA1; pabaA6.</i>
d <sub>4</sub>	Centro marrom, médio; setores verdes.	A	Não iden- tificado	<i>proA1; pabaA6.</i>

Tabela 3 - Frequência de colonias haplóides provenientes de dissômicos.

Dissômico	Nº total de colonias	Frequência de co- lonias haplóides (%)
d <sub>1</sub>	1.263	14,88
d <sub>2</sub>	813	13,04
d <sub>3</sub>	1.018	17,78
d <sub>4</sub>	1.220	9,75

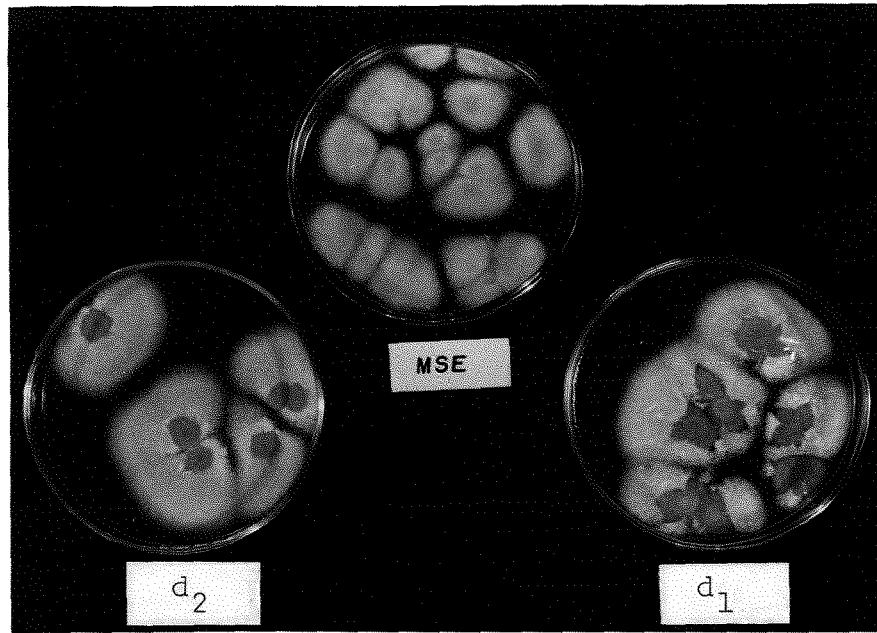


Figura 4 - Linhagem MSE e linhagens dissômicas  $d_1$  e  $d_2$  selecionadas.

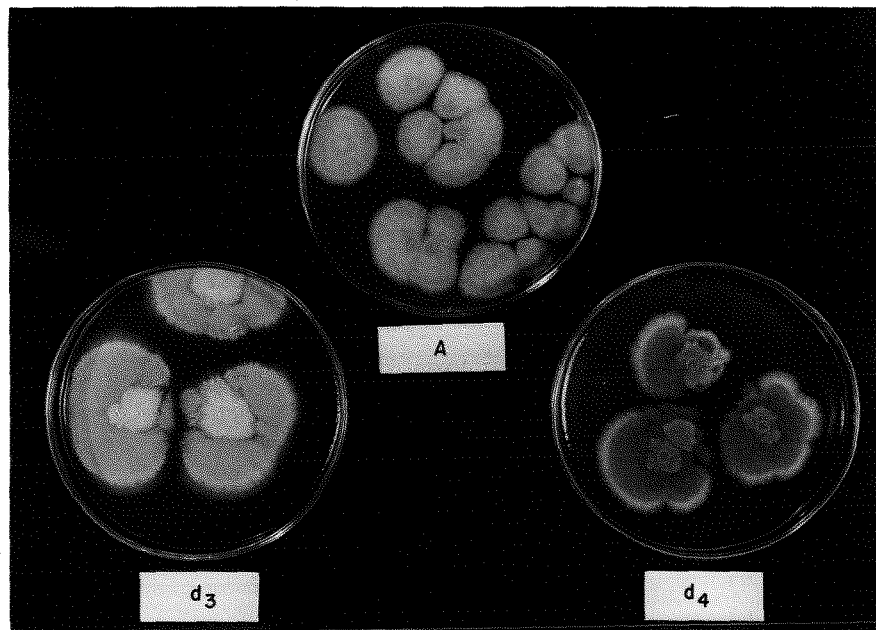


Figura 5 - Linhagem A e linhagens dissômicas  $d_3$  e  $d_4$  selecionadas.

### 4.3. Curvas de sobrevivência a mutagênicos químicos

#### 4.3.1. Curvas de sobrevivência ao ácido nitroso

Conídios das linhagens MSE, *bia1 methG1* e *bia1//MSE* foram submetidos ao tratamento com ácido nitroso em diferentes intervalos de tempo. Estimou-se a porcentagem de conídios sobreviventes em cada intervalo de tempo, em relação ao tempo zero e fizeram-se as respectivas curvas de sobrevivência. As tabelas 4, 5 e 6 mostram o número e a porcentagem relativa de conídios sobreviventes e a Figura 6 mostra as curvas de sobrevivência das 3 linhagens a esse mutagênico químico.

Tabela 4 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao ácido nitroso.

Linhagem MSE.

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1a. repetição	2a. repetição	1a. repetição	2a. repetição	
0	$3,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	100,0	100,0	100,0
5	$3,1 \times 10^6$	$6,0 \times 10^5$	83,7	60,0	71,85
10	$1,1 \times 10^4$	$9,5 \times 10^4$	0,3	9,5	4,9
15	$1,0 \times 10^2$	0	0,003	0	0,0015
20	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0

Tabela 5 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao ácido nitroso.

Linhagem *bíA1 methG1*.

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1a. repetição	2a. repetição	1a. repetição	2a. repetição	
0	$1,2 \times 10^6$	$4,1 \times 10^7$	100,0	100,0	100,0
5	$8,7 \times 10^5$	$3,4 \times 10^7$	72,5	82,9	77,7
10	$1,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^6$	1,2	3,4	2,3
15	$7,3 \times 10^3$	$2,4 \times 10^5$	0,62	0,58	0,6000
20	$3,0 \times 10^2$	$6,5 \times 10^3$	0,025	0,015	0,0200
25	$8,0 \times 10^1$	$4,9 \times 10^2$	0,007	0,001	0,0040
30	0	$1,3 \times 10^2$	0	0,0003	0,00015
60	0	$5,0 \times 10^1$	0	0,0001	0,00005

Tabela 6 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao ácido nitroso.

Linhagem *b1A1*// MSE.

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1a. repetição	2a. repetição	1a. repetição	2a. repetição	
0	$1,5 \times 10^6$	$3,1 \times 10^7$	100,0	100,0	100,0
5	$1,2 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7$	80,0	90,0	85,0
10	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	10,0	4,84	7,42
15	$1,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	0,86	0,51	0,685
20	$9,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^5$	0,64	0,39	0,515
25	$1,4 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	0,093	0,013	0,053
30	$1,0 \times 10^1$	$3,8 \times 10^2$	0,080	0,0012	0,0406
60	$0,2 \times 10^1$	$3,2 \times 10^2$	0,0053	0,0010	0,00315

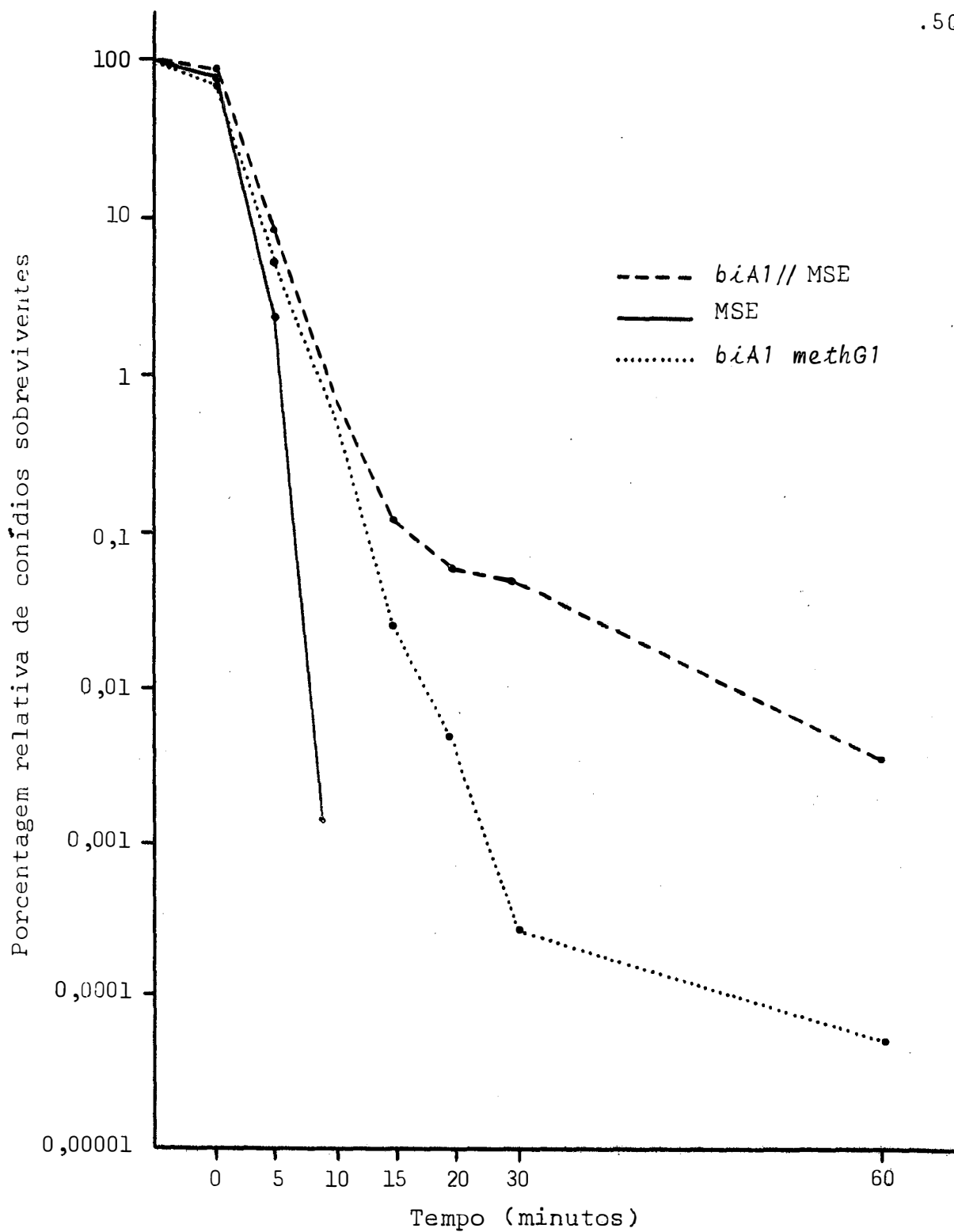


Figura 6 - Curvas de sobrevivência ao ácido nitroso.

#### 4.3.2. Curvas de sobrevivência ao N-metil-N'-nitro- -N-nitrosoguanidina (NG)

As Tabelas 7, 8 e 9 mostram o número e a porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao NG das linhagens MSE, *bia1 methA1* e *bia1//MSE*, respectivamente. A Figura 7 mostra as curvas de sobrevivência obtidas para as 3 linhagens.



Tabela 7 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.  
Linhagem MSE.

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1a. repetição	2a. repetição	1a. repetição	2a. repetição	
0	$1,8 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	100,0	100,0	100,00
10	$2,6 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$	13,3	17,1	15,20
20	$1,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	7,2	5,2	6,20
30	$5,0 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	2,7	1,2	1,95

Tabela 8 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

Linhagem *biA1 methG1*.

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1a. repetição	2a. repetição	1a. repetição	2a. repetição	
0	$6,0 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7$	100,0	100,0	100,00
10	$1,3 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6$	20,8	16,8	18,80
20	$2,9 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	4,9	5,2	5,02
30	$1,7 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	2,8	1,0	1,90

Tabela 9 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

Linhagem *b1A1* // MSE.

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1a. repetição	2a. repetição	1a. repetição	2a. repetição	
0	$1,3 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	100,0	100,0	100,00
10	$3,2 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	24,6	24,5	24,55
20	$1,9 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	14,6	11,8	13,20
30	$3,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	2,3	2,4	2,35

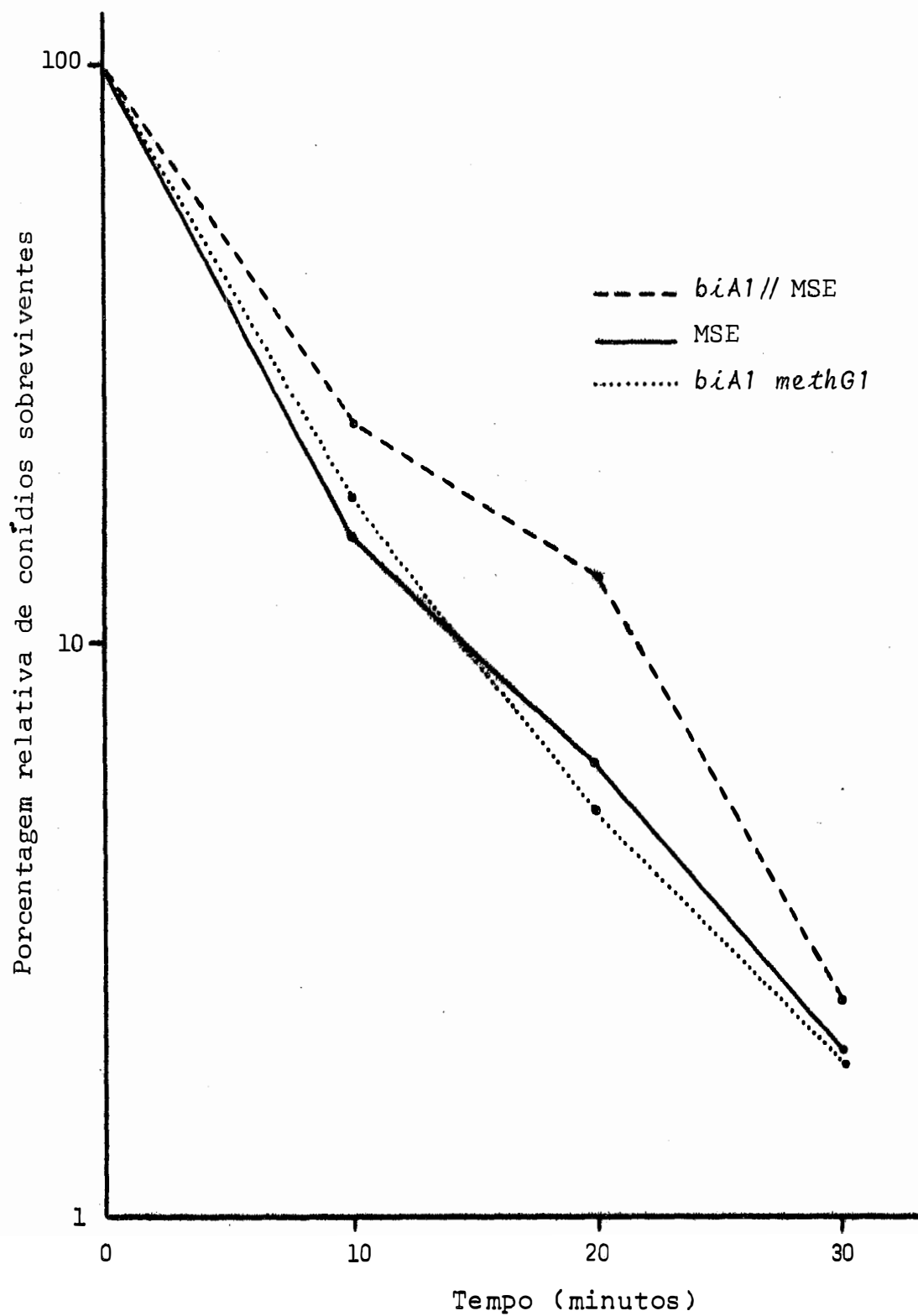


Figura 7 - Curvas de sobrevivência ao N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

#### 4.3.3. Curvas de sobrevivência ao metano sulfonato de etila (EMS)

As linhagens MSE, *bia1 methG1* e *bia1//MSE* foram submetidas ao tratamento com EMS e após contagem das colônias, estimou-se o número e a porcentagem de conídios sobreviventes que se encontram nas Tabelas 10, 11 e 12 e as respectivas curvas de sobrevivência na Figura 8. Além dessas linhagens, o mesmo tratamento foi feito nas linhagens dissômicas  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$  e  $d_4$  e para efeito de controle nas linhagens A e *proA1 pabaA6 yA2*. O número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes se encontram nas Tabelas 13 a 18 e as curvas de sobrevivência nas Figuras 9, 10 e 11.

Na Figura 9 estão representadas as curvas de sobrevivência das linhagens dissômicas  $d_1$  e  $d_2$  e da linhagem MSE que deu origem a esses dissômicos.

A Figura 10 mostra a curva de sobrevivência da linhagem dissômica  $d_3$  e para comparação, a curva de sobrevivência da linhagem *proA1 pabaA6 yA2*. O dissômico  $d_3$ , apesar de ter se originado da linhagem A, não possui a duplicação cromossômica, sendo portanto comparado com a linhagem *proA1 pabaA6 yA2*. Na Figura 11 estão mostradas as curvas de sobrevivência da linhagem dissômica  $d_4$  e da linhagem A, a qual deu origem a esse dissômico que apresenta a duplicação cromossômica,

Tabela 10 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila.

Linagem MSE.

Tempo (horas)	Conídios viáveis/ml			Porcentagem relativa de sobreviventes			Média
	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	
0	$3,64 \times 10^7$	$3,04 \times 10^7$	$3,39 \times 10^7$	100,00	100,00	100,00	100,00
2	$2,34 \times 10^7$	$1,97 \times 10^7$	$2,36 \times 10^7$	64,28	64,80	69,62	66,23
4	$1,55 \times 10^6$	$2,81 \times 10^6$	$3,17 \times 10^6$	4,26	9,24	9,35	7,62
6	$1,32 \times 10^6$	$1,70 \times 10^6$	$8,30 \times 10^5$	3,63	5,59	2,45	3,89

Tabela 11 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila.

Linhagem *b1A1 methG1*.

Tempo (horas)	Conídios viáveis/ml			Porcentagem relativa de sobreviventes			Média
	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	
0	$1,90 \times 10^8$	$3,50 \times 10^8$	$2,83 \times 10^8$	100,00	100,00	100,00	100,00
2	$3,50 \times 10^6$	$5,90 \times 10^7$	$4,03 \times 10^7$	18,40	16,80	14,24	16,48
4	$9,50 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$1,10 \times 10^7$	5,00	4,50	3,88	4,46
6	$5,40 \times 10^6$	$5,10 \times 10^6$	$4,52 \times 10^6$	2,80	1,40	1,60	1,93

Tabela 12 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila.

Linagem *b4A1* // MSE.

Tempo (horas)	Conídios viáveis/ml			Porcentagem relativa de sobreviventes			Média
	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	
0	$2,05 \times 10^7$	$1,33 \times 10^7$	$1,76 \times 10^6$	100,00	100,00	100,00	100,00
2	$1,68 \times 10^7$	$1,01 \times 10^7$	$1,70 \times 10^6$	81,95	75,94	96,59	84,83
3	$2,14 \times 10^6$	$2,20 \times 10^6$	$4,59 \times 10^5$	10,44	16,54	26,08	17,69
6	$1,95 \times 10^6$	$1,45 \times 10^6$	$1,36 \times 10^5$	9,51	10,90	7,73	9,38



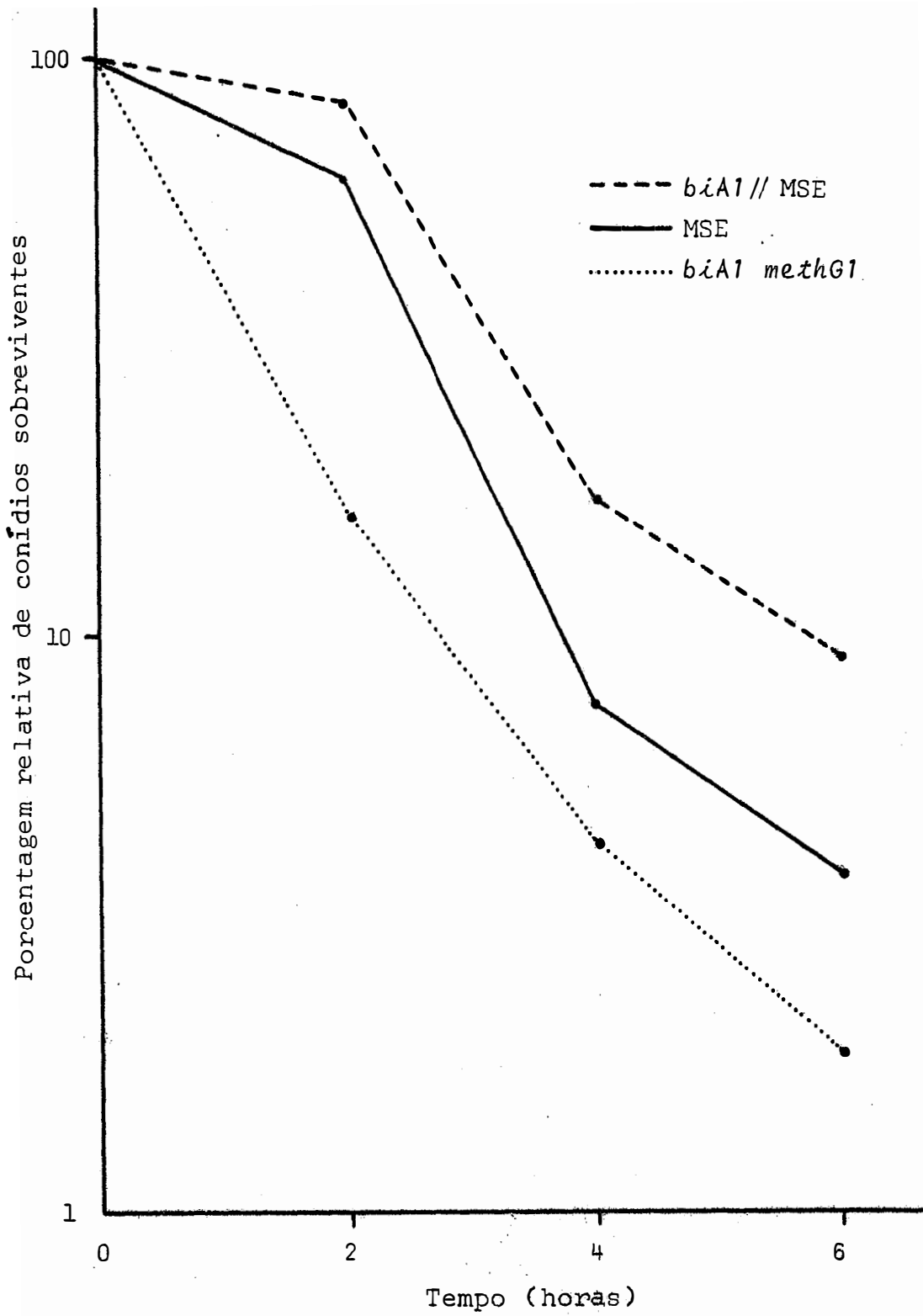


Figura 8 - Curvas de sobrevivência ao metano sulfonato de etila.

Tabela 13 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila.

Linhagem d<sub>1</sub>.

Tempo (horas)	Conídios viáveis/ml			Porcentagem relativa de sobreviventes			Média
	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	
0	1,74 x 10 <sup>7</sup>	2,40 x 10 <sup>7</sup>	1,86 x 10 <sup>6</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00
2	3,70 x 10 <sup>6</sup>	5,60 x 10 <sup>6</sup>	4,65 x 10 <sup>5</sup>	21,26	23,33	25,00	23,20
4	6,45 x 10 <sup>5</sup>	1,77 x 10 <sup>6</sup>	8,12 x 10 <sup>4</sup>	3,71	7,38	4,36	5,15
6	3,48 x 10 <sup>5</sup>	1,47 x 10 <sup>6</sup>	5,20 x 10 <sup>4</sup>	2,00	6,12	2,80	3,64

Tabela 14 - Número e porcentagem relativa de confídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila.

Linhagem  $d_2$ .

Tempo (horas)	Confídios viáveis/ml			Porcentagem relativa de sobreviventes			Média
	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	
0	$3,07 \times 10^7$	$1,07 \times 10^7$	$8,80 \times 10^6$	100,00	100,00	100,00	100,00
2	$9,60 \times 10^6$	$4,50 \times 10^6$	$4,85 \times 10^6$	31,27	42,06	55,11	42,81
4	$1,52 \times 10^6$	$8,10 \times 10^5$	$7,72 \times 10^5$	4,95	7,57	8,77	7,10
6	$4,68 \times 10^5$	$7,22 \times 10^5$	$2,62 \times 10^5$	1,52	6,75	2,98	3,75

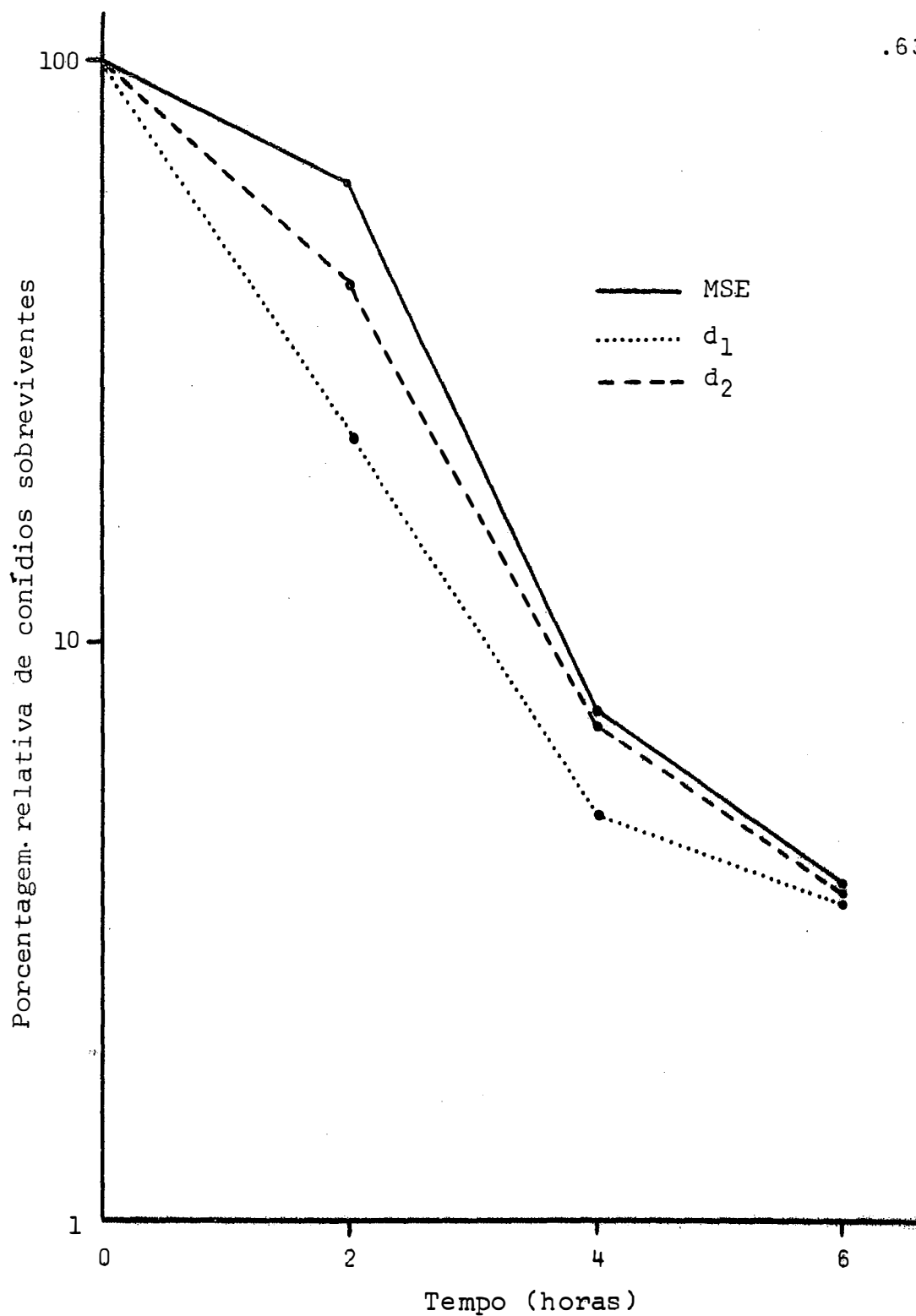


Figura 9 - Curvas de sobrevivência ao metano sulfonato de etila.

Tabela 15 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila.

Linhagem *proA1 pabaA6 yA2*.

Tempo (horas)	Conídios viáveis/ml			Porcentagem relativa de sobreviventes			Média
	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	
0	$3,20 \times 10^7$	$2,54 \times 10^7$	$1,69 \times 10^7$	100,00	100,00	100,00	100,00
2	$9,97 \times 10^6$	$8,30 \times 10^6$	$6,60 \times 10^6$	31,15	32,68	39,05	34,29
4	$1,90 \times 10^6$	$1,08 \times 10^6$	$8,85 \times 10^5$	5,94	4,25	5,24	5,14
6	$8,06 \times 10^5$	$5,55 \times 10^5$	$5,47 \times 10^5$	2,52	2,19	3,24	2,65

Tabela 16 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila.

Linhagem d<sub>3</sub>.

Tempo (horas)	Conídios viáveis/ml			Porcentagem relativa de sobreviventes			Média
	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	
0	$6,96 \times 10^6$	$9,00 \times 10^5$	$1,74 \times 10^6$	100,00	100,00	100,00	100,00
2	$1,57 \times 10^6$	$2,42 \times 10^5$	$5,05 \times 10^5$	22,56	26,89	29,02	26,16
4	$1,86 \times 10^5$	$3,05 \times 10^4$	$6,45 \times 10^4$	2,67	3,39	3,71	3,26
6	$7,00 \times 10^4$	$1,30 \times 10^4$	$4,45 \times 10^4$	1,01	1,44	2,56	1,67

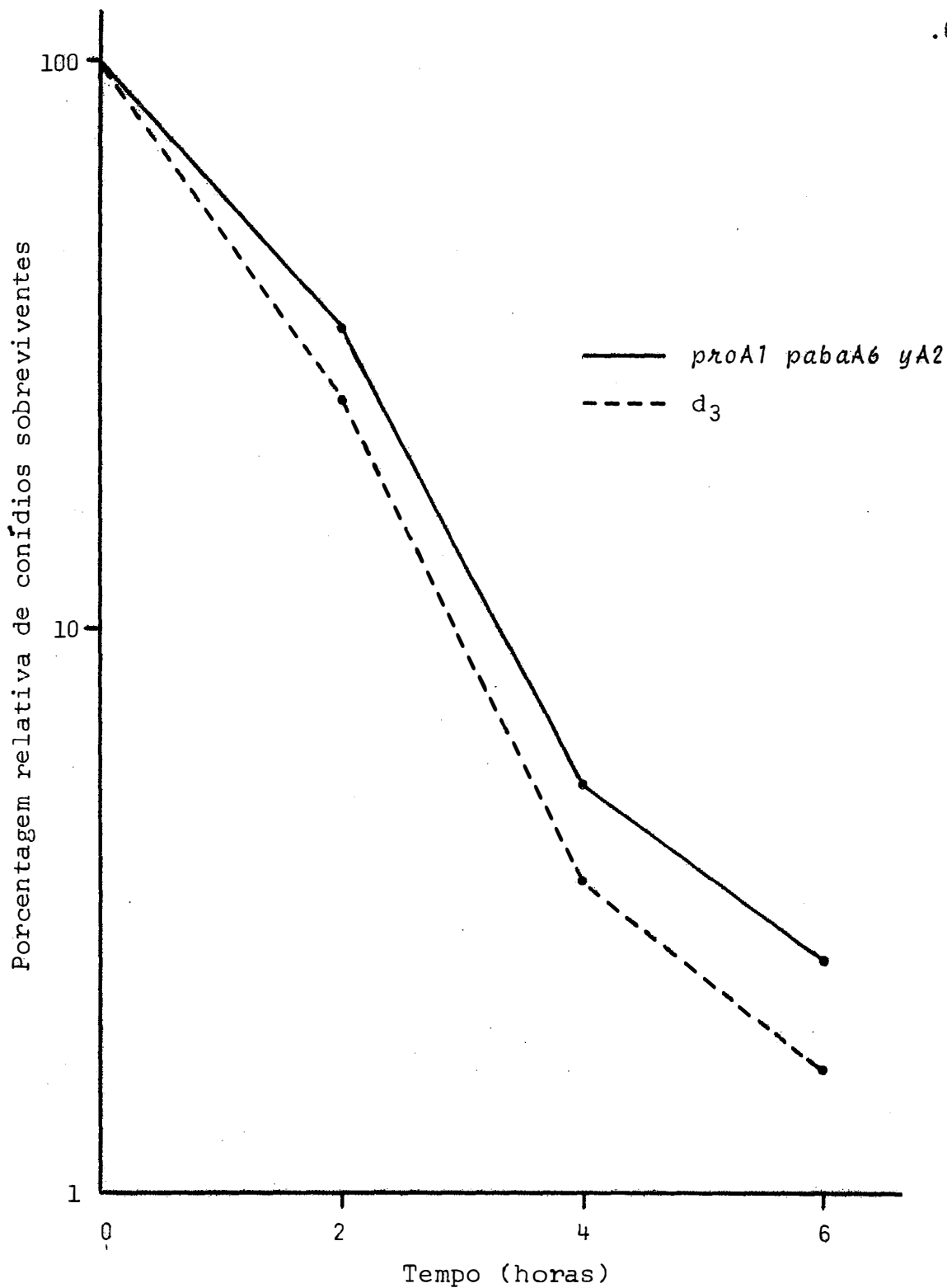


Figura 10 - Curvas de sobrevivência ao metano sulfonato de etila.

Tabela 17 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila.  
Linhagem A.

Tempo (horas)	Conídios viáveis/ml			Porcentagem relativa de sobreviventes			Média
	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	
0	$1,26 \times 10^7$	$2,91 \times 10^7$	$2,50 \times 10^7$	100,00	100,00	100,00	100,00
2	$5,72 \times 10^6$	$1,51 \times 10^7$	$1,43 \times 10^7$	45,40	51,89	57,20	51,50
4	$7,95 \times 10^5$	$1,70 \times 10^6$	$1,31 \times 10^6$	6,31	5,84	5,24	5,80
6	$4,25 \times 10^5$	$1,13 \times 10^6$	$8,50 \times 10^5$	3,37	3,88	3,40	3,55



Tabela 18 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes ao metano sulfonato de etila.  
Linhagem d<sub>4</sub>.

Tempo (horas)	Conídios viáveis/ml			Porcentagem relativa de sobreviventes			Média
	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	1a. repetição	2a. repetição	3a. repetição	
0	$3,83 \times 10^5$	$2,83 \times 10^6$	$4,64 \times 10^6$	100,00	100,00	100,00	100,00
2	$1,72 \times 10^5$	$1,41 \times 10^6$	$2,43 \times 10^6$	44,91	49,82	52,37	49,03
4	$2,18 \times 10^4$	$1,39 \times 10^5$	$2,31 \times 10^5$	5,69	4,91	4,98	5,19
6	$1,37 \times 10^4$	$7,30 \times 10^4$	$1,41 \times 10^5$	3,58	2,58	3,03	3,06

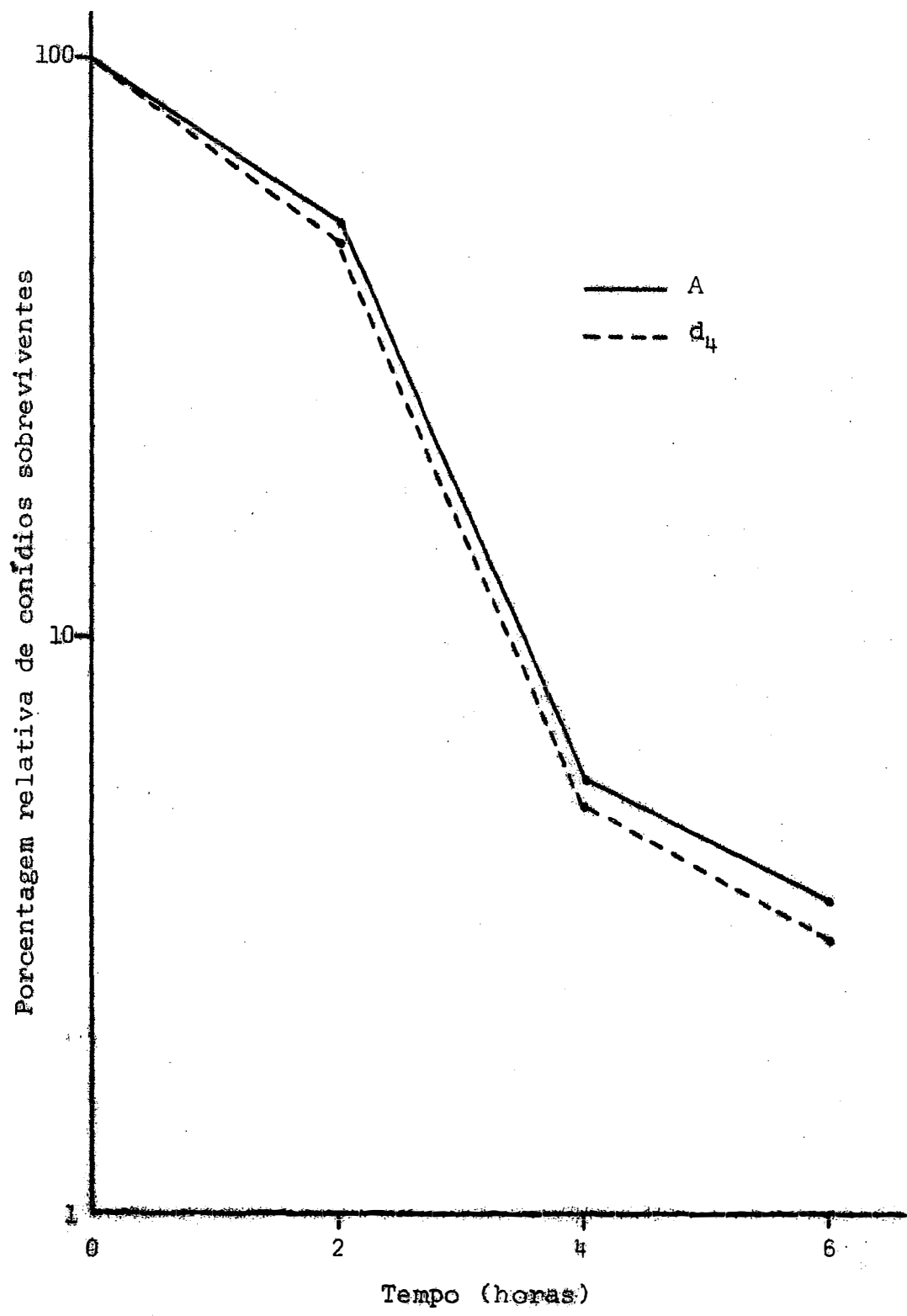


Figura 11 - Curvas de sobrevivência ao metano sulfonato de etila.

#### 4.4. Diâmetro de conídios, de seus núcleos e porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados

A Tabela 19 mostra os valores médios ( $\hat{m}$ ) e o desvio padrão ( $\hat{s}$ ) do diâmetro de 30 conídios e de seus núcleos das linhagens MSE e dissômicas  $d_1$  e  $d_2$  originadas da MSE, das linhagens *proA1 pabaA6 yA2* e dissômica  $d_3$  originada da linhagem A mas sem a duplicação cromossômica e das linhagens A e dissômica  $d_4$  originada da A, que permaneceu com a duplicação cromossômica.

Na Tabela 20 estão apresentados os valores da razão entre médias de dissômicos e linhagens haplóides das quais se originaram ( $d/L$ ) para conídios e núcleos, bem como, os desvios padrões obtidos para esses valores. A partir desses valores, obteve-se os intervalos de confiança que estão mostrados na Tabela 21 e representados na Figura 12.

A porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados de cada uma das linhagens haplóides e dissômicas está mostrada na Tabela 22.

Tabela 19 - Valores médios obtidos (de 30 medições) e respectivos desvios padrões do diâmetro de conídios e núcleos de linhagens haplóides e dissômicas.

Linhagem	$\hat{m} \pm \hat{s}$	
	Conídio	Núcleo
MSE	3,24 $\pm$ 0,3205	1,52 $\pm$ 0,1970
d <sub>1</sub>	3,96 $\pm$ 0,3673	1,78 $\pm$ 0,1574
d <sub>2</sub>	4,34 $\pm$ 0,5310	1,81 $\pm$ 0,2208
<i>proA1 pabaA6 yA2</i>	3,02 $\pm$ 0,2329	1,53 $\pm$ 0,1956
d <sub>3</sub>	3,64 $\pm$ 0,1990	1,78 $\pm$ 0,1535
A	3,60 $\pm$ 0,3321	1,64 $\pm$ 0,1567
d <sub>4</sub>	4,38 $\pm$ 0,2629	1,90 $\pm$ 0,1983

Tabela 20 - Valores obtidos para a razão dissômico/linhagem haplóide (d/L) a partir das médias originais e respectivos desvios padrões.

Linhagem	(d/L) ± $\hat{s}$	
	Conídio	Núcleo
$d_1$ /MSE	1,2222 ± 0,0303	1,1711 ± 0,0335
$d_2$ /MSE	1,3395 ± 0,0385	1,1908 ± 0,0387
$d_3$ / <i>proA1 pabaA6 yA2</i>	1,2053 ± 0,0208	1,1634 ± 0,0328
$d_4$ /A	1,2167 ± 0,0244	1,1585 ± 0,0299

Tabela 21 - Intervalos de confiança obtidos para as razões dis-  
sômico/linhagem haplóide.

	Conídio	Núcleo
$d_1$ /MSE	1,1614 a 1,2826	1,1041 a 1,2381
$d_2$ /MSE	1,2625 a 1,4165	1,1134 a 1,2682
$d_3$ / <i>proA1 pabaA6 yA2</i>	1,1637 a 1,2469	1,0978 a 1,2290
$d_4$ /A	1,1679 a 1,2655	1,0987 a 1,2183

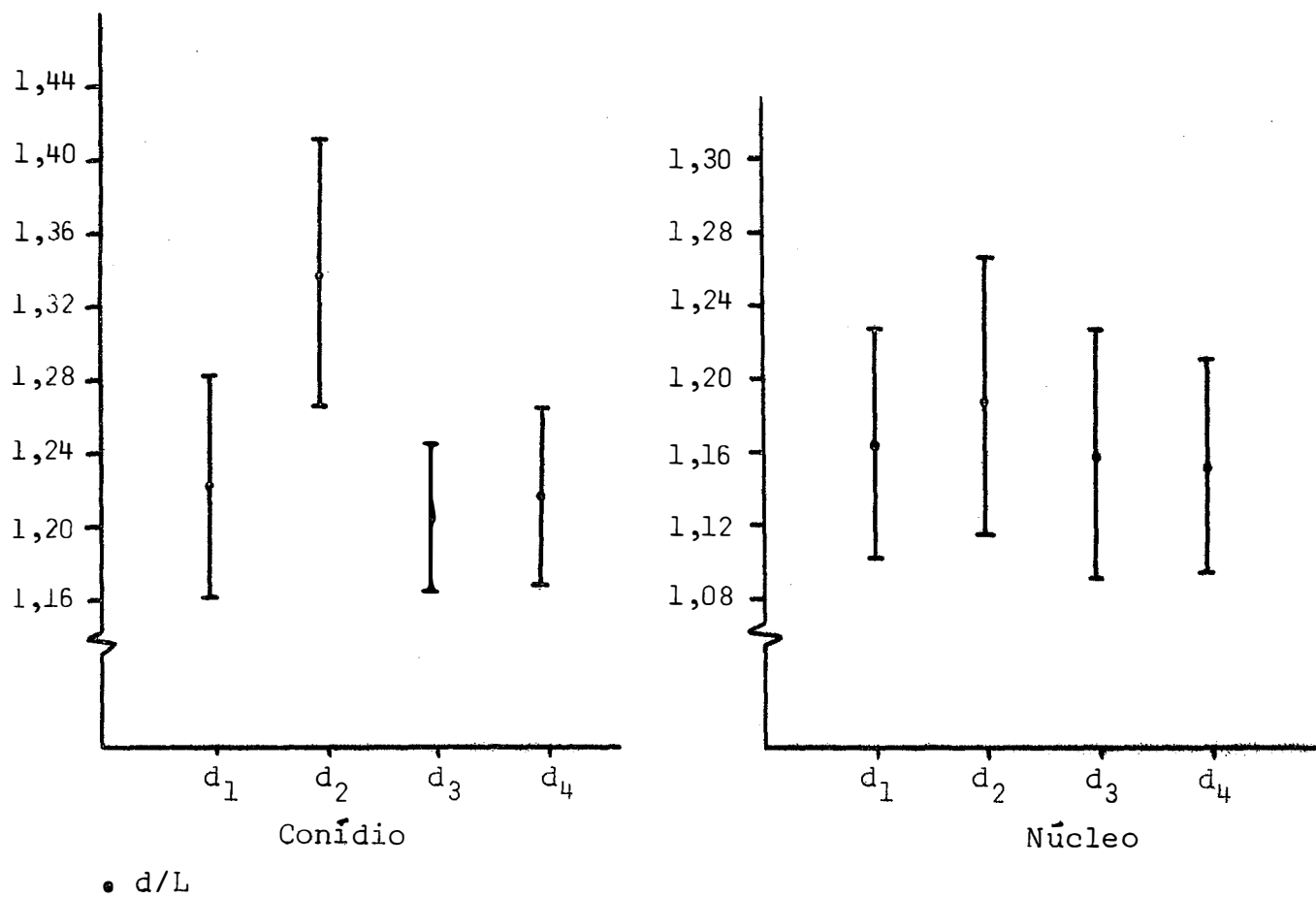


Figura 12 - Intervalo de confiança das razões dissômico/linhagem haplóide.

Tabela 22 - Porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados de linhagens haplóides e dissômicas (total entre 800 - 900 conídios).

Linhagem	% de Conídios		
	Uninucleados	Binucleados	Trinucleados
MSE	77,13	22,38	0,49
d <sub>1</sub>	77,18	22,34	0,48
d <sub>2</sub>	77,01	22,50	0,49
<i>proA1 pabaA6 yA2</i>	100,00	0,00	0,00
d <sub>3</sub>	100,00	0,00	0,00
A	100,00	0,00	0,00
d <sub>4</sub>	97,78	0,22	0,00



#### 4.5. Estabilização de linhagens dissômicas

##### 4.5.1. Seleção de dissômicos estáveis após tratamento com luz ultra-violeta

Após a irradiação dos dissômicos com luz ultra-violeta, fez-se a contagem das colônias dissômicas resultantes sendo 1.175 do  $d_1$ , 744 do  $d_2$ , 817 do  $d_3$  e 895 do  $d_4$ . Posteriormente, colônias mais estáveis foram inoculadas em placas com meio completo (três por placa mais a colônia não irradiada). Após o período de incubação, selecionou-se para cada dissômico, as 5 colônias mais estáveis, ou seja, aquelas que apresentaram o centro dissômico maior e menor número de setores quando comparadas com a colônia dissômica não irradiada.

##### 4.5.2. Diâmetro e número de setores de colônias haplóides, dissômicas e dissômicas estáveis

As Tabelas 23 e 24 mostram o diâmetro do centro dissômico, o diâmetro total e o número de setores de colônias da linhagem MSE, dos dissômicos originados dessa linhagem,  $d_1$  e  $d_2$ , e dos estáveis isolados dos dissômicos.

As Tabelas 25 e 26 mostram o diâmetro das colônias (centro dissômico e total) e o número de setores das linha

gens dissômicas,  $d_3$  e  $d_4$ , originadas da linhagem A e dos dissômicos estáveis isolados de cada um dos dissômicos. Na Tabela 24, a linhagem haplóide utilizada para comparação foi a *proA1 pabaA6 yA6* pois o dissômico  $d_3$  e os estáveis isolados, não apresentam a duplicação cromossômica.

Tabela 23 - Diâmetro e número de setores (média de 15 colônias) das linhagens MSE, dissômica  $d_1$  e dissômicas estáveis  $d_{1.1}$ ,  $d_{1.2}$ ,  $d_{1.3}$ ,  $d_{1.4}$  e  $d_{1.5}$ , após 6 dias de incubação.

Linhagens	Diâmetro (cm)		Nº de Setores
	Centro dissômico	Total	
MSE	0,00	8,61	0,00
$d_1$	1,29	7,36	7,87
$d_{1.1}$	4,47	4,47	0,73
$d_{1.2}$	3,47	6,35	8,60
$d_{1.3}$	2,03	6,77	4,60
$d_{1.4}$	1,66	7,52	5,13
$d_{1.5}$	2,97	7,31	9,33

Tabela 24 - Diâmetro e números de setores (média de 15 colônias) das linhagens MSE, dissômica  $d_2$  e dissômicas estáveis  $d_{2.1}$ ,  $d_{2.2}$ ,  $d_{2.3}$ ,  $d_{2.4}$  e  $d_{2.5}$ , após 6 dias de incubação.

Linhagens	Diâmetro (cm)		Nº de Setores
	Centro dissômico	Total	
MSE	0,00	8,61	0,00
$d_2$	1,01	7,84	- *
$d_{2.1}$	3,04	4,37	1,93
$d_{2.2}$	3,59	5,38	2,07
$d_{2.3}$	2,18	6,53	3,93
$d_{2.4}$	2,12	6,27	5,13
$d_{2.5}$	1,69	6,42	4,87

\*Impossível de serem contados devido ao grande número.

Tabela 25 - Diâmetro e número de setores (média de 15 colônias) das linhagens *proA1 pabaA6 yA2*, dissômica  $d_3$  e dissômicas estáveis  $d_{3.1}$ ,  $d_{3.2}$ ,  $d_{3.3}$ ,  $d_{3.4}$  e  $d_{3.5}$ , após 6 dias de incubação.

Linhagens	Diâmetro (cm)		Nº de Setores
	Centro dissômico	Total	
<i>proA1 pabaA6 yA2</i>	0,00	8,25	0,00
$d_3$	1,41	7,97	11,27
$d_{3.1}$	2,51	6,84	5,07
$d_{3.2}$	2,41	7,70	5,07
$d_{3.3}$	2,40	7,87	5,00
$d_{3.4}$	2,24	7,87	4,73
$d_{3.5}$	2,62	7,93	6,73

Tabela 26 - Diâmetro e número de setores (média de 15 colônias) das linhagens A, dissômica  $d_4$  e dissômicas estáveis  $d_{4.1}$ ,  $d_{4.2}$ ,  $d_{4.3}$ ,  $d_{4.4}$  e  $d_{4.5}$ , após 6 dias de incubação.

Linhagens	Diâmetro (cm)		Nº de Setores
	Centro dissômico	Total	
A	0,00	6,82	0,47
$d_4$	0,97	6,27	11,67
$d_{4.1}$	2,02	5,26	4,67
$d_{4.2}$	1,48	5,21	4,80
$d_{4.3}$	1,81	4,01	0,20
$d_{4.4}$	1,69	5,59	4,13
$d_{4.5}$	1,39	4,15	0,47

#### 4.5.3. Análise genética dos dissômicos estáveis

Os dissômicos estáveis originados da linhagem dissômica  $d_2$  foram submetidos a análise genética, especialmente o  $d_{2.1}$  e  $d_{2.2}$ . Esses estáveis foram selecionados para serem analisados geneticamente porque são mais ricos em confídios e possuem o centro dissômico maior em relação aos outros dissômicos estáveis isolados.

A Tabela 27 apresenta a análise mitótica e a Tabela 28 a análise meiótica de  $d_{2.1}$ . O número de segregantes meióticos do  $d_{2.1}$  com *proA1 pabaA6 yA2* foi de 64 colonias normais para 52 colonias dissômicas. Foi aplicado o teste de  $X^2$ , dando 1,24 não significativo aos níveis de 1% e 5% de probabilidade, considerando-se uma proporção de 1:1.

As Tabelas 29 e 30 mostram a análise mitótica e meiótica, respectivamente, do  $d_{2.2}$ . Do cruzamento desse dissômico com *proA1 pabaA6 yA2* contou-se o número de segregantes meióticos normais e dissômicos, sendo 60:56,  $x^2 = 0,14$  não significativo, considerando uma proporção de 1:1.

A análise genética dos dissômicos estáveis  $d_{2.3}$ ,  $d_{2.4}$  e  $d_{2.5}$ , mostravam previamente uma alta proporção de segregantes mitóticos e meióticos dos tipos paternos.

Tabela 27 - Análise mitótica de  $d_{2.1}$ .

Haplóides $d_{2.1}$ // <i>proA1 pabaA6 yA2</i>		
Grupo de ligação	Marcador	Nº de colônias
I	<i>pro<sup>+</sup> paba<sup>+</sup></i>	10
	<i>pro paba</i>	12
II	<i>w<sup>+</sup></i>	8
	<i>w</i>	14
III	<i>gal<sup>+</sup></i>	22
	<i>gal</i>	0
IV	<i>pyro<sup>+</sup></i>	17
	<i>pyro</i>	5
V	<i>fac<sup>+</sup></i>	10
	<i>fac</i>	12
VI	<i>s<sup>+</sup></i>	13
	<i>s</i>	9
VII	<i>nic<sup>+</sup></i>	22
	<i>nic</i>	0
VIII	<i>ribo<sup>+</sup></i>	9
	<i>ribo</i>	13



Tabela 28 - Análise meiótica do  $d_{2.1}$ .

$d_{2.1} \times proA1 \ pabaA6 \ yA2$			
Grupo de ligação	Marcador	Nº de colônias	$\chi^2$
I	$pro^+$ $paba^+$	26	0,14 n.s.
	$pro$ $paba$	24	
II	$w^+$	25	0,00 n.s.
	$w$	25	
III	$gal^+$	37	37,19**
	$gal$	13	
IV	$pyro^+$	20	2,00 n.s.
	$pyro$	30	
V	$fac^+$	22	0,72 n.s.
	$fac$	28	
VI	$s^+$	30	2,00 n.s.
	$s$	20	
VII	$nic^+$	25	0,00 n.s.
	$nic$	25	
VIII	$ribo^+$	31	2,88 n.s.
	$ribo$	19	

n.s. = Não significativo

\*\* = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

+ = Valores de  $\chi^2$ , considerando a proporção de 1:1, exceto para o marcador *gal* cuja proporção considerada foi de 1:2.

Tabela 29 - Análise mitótica do  $d_{2.2}$ .

Haplóides $d_{2.2}$ // $proA1$ $pabaA6$ $yA2$		
Grupo de ligação	Marcador	Nº de colônias
I	$pro^+$ $paba^+$	12
	$pro$ $paba$	10
II	$w^+$	11
	$w$	11
III	$gal^+$	22
	$gal$	0
IV	$pyro^+$	21
	$pyro$	1
V	$fac^+$	16
	$fac$	6
VI	$s^+$	18
	$s$	4
VII	$nic^+$	16
	$nic$	6
VIII	$ribo^+$	12
	$ribo$	10

Tabela 30 - Análise meiótica do  $d_{2.2}$ .

$d_{2.2} \times proA1 \ pabaA6 \ yA2$			
Grupo de ligação	Marcador	Nº de colônias	$\chi^2$
I	$pro^+ \ paba^+$	10	1,38 n.s.
	$pro \ paba$	16	
II	$w^+$	13	0,00 n.s.
	$w$	13	
III	$gal^+$	26	51,97**
	$gal$	0	
IV	$pyro^+$	19	5,54*
	$pyro$	7	
V	$fac^+$	16	1,38 n.s.
	$fac$	10	
VI	$s^+$	13	0,00 n.s.
	$s$	13	
VII	$nic^+$	14	0,16 n.s.
	$nic$	12	
VIII	$ribo^+$	20	4,54*
	$ribo$	6	

n.s. = Não significativo.

\* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

+ = Valores de  $\chi^2$ , considerando a proporção de 1:1, exceto para o marcador *gal* cuja proporção considerada foi de 1:2.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Obtenção espontânea de aneuplóides e sua instabilidade

Os resultados indicam que aneuplóides podem ser obtidos de linhagens haplóides normais e de linhagens com duplicação cromossômica, em presença de desoxicolato de sódio (Tabela 1). No entanto, a frequência do aparecimento de aneuplóides da linhagem duplicada A foi relativamente alta quando comparada com a frequência de aneuplóides a partir das linhagens MSE e *biA1 methG1* que não continham aberrações estruturais.

*POLLARD e col. (1968)* verificaram que aneuplóides, especialmente dissômicos, originados na meiose de *A. nidulans* são raros em cruzamentos envolvendo linhagens sem aberrações cromossômicas. Por outro lado, a frequência de não disjunção e, conseqüentemente, de aneuplóides é aumentada nos cruzamentos de linhagens com translocações cromossômicas, sendo mais efetivo ainda quando as duas linhagens envolvidas no

cruzamento apresentam essa aberração cromossômica. No entanto, a partir de diplóides, a frequência de aneuplóides foi praticamente a mesma, indicando que por mitose, a não disjunção é independente da presença de translocações. No nosso caso, aneuplóides obtidos por mitose, a presença da duplicação cromossômica aumentou a frequência de não disjunção. Podemos supor então que, ou as aberrações atuam mais em haplóides do que em diplóides causando não disjunção ou o tipo de aberração cromossômica aqui usada difere dos tipos de aberrações empregadas por *POLLARD e col. (1968)*.

*FAULKNER (1967)* encontrou 0,734% de aneuplóides obtidos de ascósporos híbridos, enquanto que no presente trabalho, todas as frequências de aneuplóides obtidas para as três linhagens foi inferior a esse valor, mesmo para a linhagem com duplicação cromossômica. Podemos concluir então que por mitose, a frequência de aneuplóides parece ser menor do que por não disjunção meiótica. *DANTAS D'ARCE (1972)* chegou a mesma conclusão obtendo aneuplóides a partir de linhagens com e sem duplicação cromossômica. No entanto, somente com a linhagem duplicada, aneuplóides foram obtidos num total de 0,205%, enquanto que a partir da linhagem MSE, haplóide sem aberração cromossômica, nenhum aneuplóide foi obtido. No presente trabalho, maior frequência de aneuplóides foi obtida para a linhagem com duplicação cromossômica, bem como para as haplóides normais, inclusive para a MSE. Comparando com os

dados de *DANTAS D'ARCE (1972)*, podemos supor que esse aumento na frequência de aneuplóides por nós obtidos pode ser devido ao uso do desoxicolato de sódio no meio de cultura, que diminui o tamanho das colônias e facilita a visualização dos aneuplóides. Uma outra possibilidade seria o fato que a linhagem MSE aqui usada possui aproximadamente 20% de conídios binucleados e de algum modo esse número extra de núcleos interfere com a não disjunção mitótica.

Dos quatro dissômicos selecionados, foi feito o estudo de sua instabilidade no que se refere a produção de haplóides diretamente a partir dos conídios (Tabela 3). A frequência de colônias haplóides deve refletir o número de conídios já haplóides, o que indicaria a perda do cromossomo adicional nos núcleos do micélio ou na germinação do conídio. Os valores encontrados para os quatro dissômicos variam de 9,75 a 17,78% de haplóides. Seria prematuro partir desses dados para concluir que todos os aneuplóides de *A. nidulans* produzem cerca de 14% de conídios já haplóides. No entanto, com os quatro dissômicos usados, as frequências foram aparentemente semelhantes e isso pode indicar uma tendência geral dos aneuplóides, no caso. Deve ser salientado ainda que, uma perda cromossômica logo nos primeiros estágios da germinação do conídio aneuplóide, levaria a formação de colônias com fenótipo haplóide, de modo que, tais casos podem também ter ocorrido, o que viria aparentemente aumentar a frequência de co-

nídios haplóides a partir de um aneuplóide.

## 5.2. Escolha do mutagenico químico

*DANTAS D'ARCE (1972)* já havia verificado que em *A. nidulans*, como seria de se esperar, linhagens diplóides são mais resistentes a luz ultra-violeta do que linhagens haplóides. No entanto, a luz ultra-violeta apresenta uma série de problemas relacionados com a pigmentação dos conídios. De acordo com *CURTIS (1970)*, conídios com menor grau de pigmentação tem uma queda brusca na resistência a luz ultra-violeta quando comparado com a sobrevivência de conídios com pigmentação marrom escura de *Aspergillus carbonarius*. Dessa maneira, no trabalho de *DANTAS D'ARCE (1972)*, tornou-se difícil estabelecer uma comparação entre os diversos dissômicos, pois as linhagens dissômicas, além de apresentarem morfologia anormal, têm conídios com coloração extremamente variável. Com o intuito de contornar esse problema, foram utilizados no presente trabalho, mutagênicos químicos. Numa fase preliminar para a escolha do mutagênico mais adequado, foram usados ácido nítrico, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina e metano sulfonato de etila em linhagens haplóides e diplóide. A sobrevivência dessas linhagens (Tabelas 6 a 12) e as respectivas curvas de sobrevivência (Figuras 6, 7 e 8) mostram que nos três casos a

linhagem diplóide foi mais resistente que as haplóides o que nos levou a confirmar a teoria do alvo (LEA, 1956). Com NG, a diferença entre haplóides e diplóides foi pequena. O NG é um dos mutagênicos mais potentes que se conhece causando uma alta frequência de mutação, provavelmente minimizando as diferenças entre haplóides e diplóides. Além disso, ele é extremamente tóxico e carcinogênico, razões pelas quais foi proterido em favor dos outros dois. Com relação ao ácido nitroso e EMS, bons resultados foram obtidos nos dois casos. O EMS foi escolhido por dar diferenças de sobrevivência entre haplóides e diplóides com sobrevivências relativamente altas, enquanto que o ácido nitroso deu um diferencial de sobrevivência alto mas em porcentagens de sobrevivência muito baixas (0,1 a 0,00001%). Além disso, o EMS é de mais fácil manipulação do que o ácido nitroso. Assim, foi escolhido o EMS para os próximos passos do trabalho.

### 5.3. Sobrevivência de dissômicos comparada com sobrevivência das respectivas linhagens haplóides originais em presença de metano sulfonato de etila

Os dados de sobrevivência (Tabela 10, Tabelas 13 a 18 e Figuras 9, 10 e 11) foram comparados somente entre



linhagens dissômicas e linhagens haplóides das quais eles se originaram. Assim,  $d_1$  e  $d_2$  foram comparados com MSE,  $d_4$  com A e  $d_3$  com *proA1 pabaA6 yA2*. Nesse último caso, a comparação foi feita com a linhagem não duplicada pois o  $d_3$  apesar de ter se originado da A, perdeu o segmento em duplicata dessa linhagem.

Os resultados indicam que as linhagens haplóides sempre foram mais viáveis em presença de EMS que as dissômicas; enquanto que, seria de se esperar, pelo menos teoricamente, uma viabilidade maior das dissômicas em relação às haplóides, pois os letais induzidos no par de cromossomos homólogos, presente nos dissômicos, não causam a morte. Pode-se supor então que, à semelhança do que ocorre com luz ultra-violeta, onde pigmentação dos conídios está envolvida na viabilidade, também no caso de mutagênicos químicos certos fatores estejam envolvidos. Por exemplo, se dissômicos apresentarem uma maior permeabilidade ao agente químico, eles seriam mais facilmente mutagenizados do que a própria linhagem haplóide. Resultados preliminares obtidos com ácido nitroso (*PIZZIRANI, não publicado*) revelou que também nesse caso, os dissômicos foram menos viáveis do que os respectivos haplóides.

Esses resultados mostram que a verificação do tamanho do cromossomo envolvido no dissômico torna-se extremamente difícil tanto pela irradiação ultra-violeta (*DANTAS D'ARCE, 1972*) como pelo uso de mutagênicos químicos, emprega

dos no presente trabalho. Apesar dessas dificuldades, se dissômicos forem obtidos a partir de uma só linhagem e comparados somente com essa linhagem original, seria possível, em parte, concluir sobre o tamanho dos cromossomos envolvidos. Pelas Tabelas 10, 13 e 14 e Figura 9, verifica-se, por exemplo, que os dissômicos  $d_1$  e  $d_2$ , ambos originados da linhagem MSE, apresentam diferentes sobrevivências onde o  $d_2$  é mais resistente que o  $d_1$ . Isso pode ser devido a diferença na permeabilidade ou, supor também que não ocorram tais diferenças e que são devido ao tamanho do cromossomo adicional envolvido. Nesse caso, poder-se-ia concluir então que o cromossomo III( $d_2$ ) é maior do que o IV ( $d_1$ ). Esse mesmo fato foi verificado por DANTAS D'ARCE (1972). A mesma autora analisando uma série de resultados, tais como, número de quebras cromossômicas, média de letais recessivos induzidos, unidades de recombinação e frequência média de aneuplóides, concluiu que no conjunto geral dos dados, a ordem decrescente de tamanho dos cromossomos seria I, VIII, II, III, VII, IV, VI e V, confirmando assim que o cromossomo III é maior que IV.

Em vista disso, pode-se concluir que um método mais direto de análise que não envolva sobrevivência a agentes físicos e químicos seria de maior eficiência para a determinação do tamanho dos cromossomos em *A. nidulans*. Um método que pode ser sugerido é o da comparação do tamanho de coní-

dios é de núcleos de linhagens haplóides e dissômicas (Ítem 5.4.) ou, melhor ainda, seria a estimativa do conteúdo de DNA nas linhagens. *HEAGY e ROPER (1952)* estimaram o conteúdo de DNA em *A. nidulans* e encontraram que linhagens diplóides possuem o dobro em relação as haplóides, mas que o processo não deve ser suficientemente sensível para detectar diferenças pequenas. No entanto, a modificação do método sugerida por *VAN TUYLÉ (1977)* pode ser testada no caso.

#### 5.4. Tamanho dos conídios, de seus núcleos e porcentagem de conídios uni, bi e trinucleados

As linhagens dissômicas e haplóides correspondentes foram analisadas em relação ao diâmetro de seus conídios e núcleos (Tabelas 20 e 21 e Figura 12). Os resultados mostraram que o diâmetro do conídio e do núcleo dos dissômicos é sempre maior do que o das linhagens haplóides originais. A análise estatística revelou, entretanto, que o dissômico  $d_2$  é diferente em relação ao tamanho do conídio, quando comparado com  $d_1$ ,  $d_3$  e  $d_4$  que não diferem entre si. Quanto ao diâmetro dos núcleos, não houve diferença estatisticamente significativa entre dissômicos, embora houvesse entre eles e respectivos haplóides. O dissômico  $d_2$  corresponde ao cromossomo III, que deve ser então maior que os cromossomos IV ( $d_1$ ), VI ( $d_3$ ) e aquele cujo cromossomo adicional não pode ser identifi

cado ( $d_4$ ). Com esses dados e com os descritos por DANTAS D'ARCE (1972) pode-se, tentativamente supor que o cromossomo adicional presente no dissômico  $d_4$  corresponde ao V ou VII.

Na análise citológica para verificação do tamanho de núcleos, foi observado com surpresa, que a linhagem MSE usada apresentava 22,38% de conídios binucleados e 0,49% de trinucleados (Tabela 22). Essa é a primeira observação de conídios binucleados em *A. nidulans*. Os dissômicos isolados dessa linhagem também apresentaram a mesma porcentagem de conídios binucleados, mostrando dessa forma, que dissomia não interfere com o número de núcleos presente nos conídios. Esse mesmo fenômeno não foi observado nas outras linhagens haplóides e dissômicas.

A presença de conídios binucleados em *A. nidulans* pode ser estudada mais profundamente. Pode ser sugerido um estudo sobre as causas que levam essa linhagem a produzir mais núcleos nos conídios, principalmente, considerando a importância aplicada, uma vez que, linhagens industriais, como *Aspergillus niger* possuem conídios binucleados. O *A. nidulans* é agora um modelo ideal para o estudo desse fenômeno, pois é melhor analisado geneticamente.

### 5.5. Estabilização de linhagens dissômicas

Linhagens dissômicas, como já descrito anteriormente, são instáveis devido a perda do cromossomo adicional (POLLARD e col., 1968; UPSHALL, 1971; KÄFER e UPSHALL, 1973). Essa instabilidade, evidentemente, dificulta o estudo desses dissômicos e, para contornar esse problema, foi tentado estabilizá-los com luz ultra-violeta através de um sistema de letais balanceados, como fizeram AZEVEDO e ROPER (1967) para diplóides de *A. nidulans*.

Os resultados (Tabelas 23 a 26) indicam que alguns isolados foram mais estáveis tanto para o diâmetro do centro dissômico como para o número de setores. Em todos os casos, o centro dissômico foi sempre maior e o número de setores sempre menor que os dos dissômicos originais. A análise genética de dois desses isolados,  $d_{2.1}$  e  $d_{2.2}$ , mostrou que em ambos, a estabilidade foi devida a indução de letais recessivos no cromossomo III em um sistema balanceado (Tabelas 27 a 30). Nos outros casos onde somente segregação paternal foi encontrada, outros diplóides e peritécios são necessários para que se possa verificar as prováveis causas desse evento.

Desses resultados, pode-se concluir que estabilização é possível em dissômicos e que essas linhagens estáveis podem ser utilizadas em posteriores estudos citológicos e genéticos com muito mais facilidade do que com os dissômi-

cos originais. Além disso, essa estabilização poderá ser de grande valia sob o ponto de vista aplicado, facilitando futuros estudos em fungos instáveis produtores de substâncias de valor industrial.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se obter aneuplóides de *Aspergillus nidulans* a partir de linhagens haplóides e com duplicação cromossômica por via mitótica. Dos isolados, quatro dissômicos foram selecionados e empregados para os próximos passos. Através de curvas de sobrevivência a mutagênicos químicos, de determinações citológicas do diâmetro de conídios e núcleos das linhagens dissômicas e haplóides originais, tentou-se determinar o tamanho do cromossomo envolvido na aneuploidia. Além disso, procurou-se reduzir a instabilidade das linhagens dissômicas pela indução, com luz ultra-violeta, de mutações letais recessivas através de um sistema balanceado no cromossomo adicional. Dos resultados obtidos, as seguintes conclusões puderam ser tiradas:

a) *Mitoticamente, linhagens com aberração cromossômica produzem maior frequência de aneuplóides que linhagens isentas de aberrações, em meio de cultura com desoxicolato de sódio.*

b) O melhor mutagênico químico para diferenciar linhagens haplóides de diplóides quanto à sobrevivência é o metano sulfonato de etila, em relação ao ácido nitroso e *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina.

c) Com relação ao metano sulfonato de etila, linhagens dissômicas são menos resistentes que as haplóides originais, possivelmente devido a uma maior permeabilidade ao agente mutagênico.

d) Pela comparação das curvas de sobrevivência ao metano sulfonato de etila, o cromossomo III é maior do que o IV.

e) Citologicamente, os dissômicos possuem os diâmetros de conídios e núcleos maiores que os das linhagens haplóides originais. Através da análise estatística dos dados, a ordem decrescente do tamanho dos cromossomos envolvidos nos dissômicos analisados é III, IV e VI.

f) A linhagem MSE usada possui 22,38% de conídios binucleados e 0,49% de trinucleados. Dissômicos isolados dessa linhagem apresentam as mesmas porcentagens, mostrando que dissomia não interfere com o número de núcleos no conídio.

g) A instabilidade dos dissômicos pode ser reduzida pela indução de letais recessivos em um sistema balanceado no par de cromossomos homólogos.



## 7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present research was carried out aiming to obtain aneuploids of *Aspergillus nidulans* from haploids and duplicated strains through mitosis. From the isolates obtained, four disomic were selected and used in the next steps. It was made an attempt to determine the aneuploid chromosome size. This was accomplished through methods based on survival curves with chemical mutagens treatment and comparing conidia and nuclei diameter of disomics with haploid original strains. Besides, it was made an attempt to reduce disomic instability by irradiation with ultra-violet light which could induce recessive lethals giving a balanced lethal system involving the extra chromosome. From the obtained results the following conclusions could be drawn:

a) *Through mitosis and on sodium deoxycholate medium, strains with chromosomal aberrations produced increased aneuploidy frequency in relation to normal strains.*

b) *The order of mutagens to distinguish between*

haploid and diploids based on survival curves were: ethyl methanesulfonate, nitrous acid and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.

c) Disomic strains are less viable than the original haploid strains in the presence of ethyl methanesulfonate. This is probably due to differential permeability to the agent in disomic and haploid strains.

d) By comparison of the survival curves with ethyl methanesulfonate, it could be concluded that the chromosome III is larger than chromosome IV.

e) Conidia and nuclei in disomics were larger when compared to the original haploid strains. Through statistical analysis the estimated order chromosome size is III, IV and VI from the largest to the smallest.

f) The MSE strain used, produced 22,38% binucleated conidia and 0,49% trinucleated conidia. Isolated disomics from MSE strain produced the same percentage of binucleated and trinucleated conidia, which is an indication that disomy did not interfere with the number of nuclei in the conidia.

g) Disomic instability can be reduced by induction of recessive lethals in a balanced lethal system involving the homologue chromosome pair.

## 8. BIBLIOGRAFIA CITADA

ADELBERG, E.A.; M. MANDEL e G.C.C. CHEN, 1965. Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K 12. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 18:788-795.

APIRION, D., 1962. A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice versa in micro-organisms. *Nature*, London, 195:959-961.

ATWOOD, K.C. e F. MUKAI, 1953. Indispensable gene functions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Science*, U.S.A., 39:1027-1035.

AZEVEDO, J.L., 1966. Estudos sobre recessivos letais em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Tese apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de Livre Docente, 121p. Piracicaba, SP.

AZEVEDO, J.L., 1970. Recessive lethals induced by nitrous acid in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 10:111-117.

- AZEVEDO, J.L. e J.A. ROPER, 1967. Lethal mutations and balanced lethal systems in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 49:149-155.
- AZEVEDO, J.L. e J.A. ROPER, 1970. Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: successive and transposable genetic changes. *Genetical Research*, 16:79-93.
- 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.
- BALL, C. 1973a. Improvement of penicillin productivity in *Penicillium chrysogenum* by recombination. In: Genetics of industrial microorganisms, 227-237. Edited by Z. Vanek; Z. Hostalek and J. Cudlin. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 511p.
- BALL, C., 1973b. The genetics of *Penicillium chrysogenum*. *Progress in Industrial Microbiology*, 12:47-72.
- BALL, C. e J.L. AZEVEDO, 1976. The applied significance of genetic instability in parasexual fungi. In: 2<sup>nd</sup> International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. Academic Press. New York.

BEADLE, G.W., 1932. The relationship of crossing over to chromosome association in *Zea Euchlaena* hybrids. *Genetics*, 17:491-501.

BURNETT, J.H., 1975. Mycogenetics. John Wiley and Sons, London, 375p.

CLUTTERBUCK, A.J. e U.K. SINHA, 1966. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) as a mutagen for *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus Newsletter*, 7:12-13.

COX, B.S. e E.A. BEVAN, 1962. Aneuploidy in yeast. *New Phytologist*, 61:342-355.

CURTIS, C.R., 1970. Comparison of UV-induced delay in germination in pigmented and pigment-inhibited conidia of *Aspergillus carbonarius*. *Radiation Botany*, 10:125-130.

DANTAS D'ARCE, M.M.C. 1972. Contribuição ao estudo de alterações cromossômicas numéricas em *Aspergillus nidulans*. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre, 50p. Piracicaba, SP.

DE SERRES, F.J., 1969. Comparison of the complementation and genetic maps of closely linked nonallelic markers on linkage group I of *Neurospora crassa*. *Mutation Research*, 8:43-50.

DOBZHANSKY, T., 1930. Translocations involving the third and fourth chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 15:347-399.

ELLIOTT, C.G., 1960. The cytology of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 1:462-476.

FAULKNER, B.M., 1967. Spontaneous aneuploidy in haploid strains of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus Newsletter*, 8:18.

GLASS, H.B., 1933. A study of dominant mosaic eye-colour mutants in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Genetics*, 28:69-112.

HASTIE, A.C., 1970. Benlate induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, London, 226:771.

- HEAGY, F.C. e J.A. ROPER, 1952. Deoxyribonucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus* conidia. *Nature*, London, 170:713-714.
- KÄFER, E., 1960. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London, 186:619-620.
- KÄFER, E. 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46:1581-1609.
- KÄFER, E., 1965. Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 52:217-232.
- KÄFER, E., 1973. Disomics from heterozygous crosses providing evidence for reciprocal translocations and for map position of centromeres and meiotically unlinked markers in *Aspergillus*. *Genetics*, 74:129-130 (Abst.).
- KÄFER, E., 1975. Reciprocal translocations and translocation disomics of *Aspergillus* and their use for genetic mapping. *Genetics*, 79:7-30.

- KÄFER, E. e T.L. CHEN, 1964. Translocations and recessive lethals induced in *Aspergillus* by ultra-violet light and gamma-rays. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 6:249-254.
- KÄFER, E. e A. UPSHALL, 1973. The phenotypes of the eight disomics and trisomics of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Heredity*, 64:35-38.
- KAPPAS, A. e S.G. GEORGOPOULOS, 1974. Interference of griseofulvin with the segregation of chromosomes at mitosis in diploid *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 119:334-335.
- LEA, D.E., 1956. The target theory. In: Actions of radiations on living cells, 69-99. University Press, Cambridge, 416p.
- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidisation by treatment of *Aspergillus niger* diploids with p-fluorophenylalanine. *Nature*, London, 190:744.
- MACKINTOSH, M.E. e R.H. PRITCHARD, 1963. The production and replica plating of micro-colonies of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 4:320-322.



- McCULLY, K.S. e E. FORBES, 1965. The use of p-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research*, 6: 352-359.
- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregation induced by p-fluorophenylalanine. *Aspergillus Newsletter*, 2:10.
- NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1968. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 58:193-209.
- OSBORNE, R. e W.S.B. PATERSON, 1952. On the sampling variance of heritability estimates derived from variance analysis. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 64:456-461.
- PAES de BARROS, J., 1977. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre, 81p. Piracicaba, SP.
- PARAG, Y. e J.A. ROPER, 1975. Genetic control of chromosome instability in *Aspergillus nidulans* as a mean for gene amplification in eukariotic microorganisms. *Molecular General Genetics*, 140:275-287.

- PARRY, E.M. e B.S. COX, 1970. The tolerance of aneuploidy in yeast. *Genetical Research*, 16:333-340.
- PITTENGER, T.H., 1954. The general incidence of pseudo-wild types in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 39:326-342.
- POLLARD, R.; E. KÄFER e M.T. JOHNSTON, 1968. Influence of chromosomal aberrations on meiotic and mitotic nondisjunction in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 60:743-757.
- PONTECORVO, G.; J.A. ROPER; L.M. HEMMONS; K.D. McDONALD e A.W.J. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.
- ROBINOW, C.F. e C.E. CATEN, 1969. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science*, 5:403-431.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8:14-15.
- 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, SP.

SHAFFER, B.; I. BREARLEY; R. LITTLEWOOD e G.R. FINK, 1971.

A stable aneuploid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 67:483-495.

SIDDIQI, O.H., 1962. Mutagenic action of nitrous acid on *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 3:303-314.

SILVA, J.C., 1977. Seleção e estabilização de *Aspergillus niger* para produção de ácido. Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia/UNICAMP, para obtenção do título de Mestre, Campinas, SP.

STUTERVANT, A.H., 1926. A crossover reducer in *Drosophila melanogaster* due to inversion of a section of the third chromosome. *Biologisches Zentralblatt*, 46:697-702.

TECTOR, M.A. e E. KÄFER, 1962. Radiation-induced chromosomal aberrations and lethals in *Aspergillus nidulans*. *Science*, 136:1056-1057.

UPSHALL, A., 1971. Phenotypic specificity of aneuploid states in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 18: 167-171.

UPSHALL, A., 1974. Genetic factors affecting non-disjunction in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 33:445.

UPSHALL, A. e E. KÄFER, 1974. Detection and identification of translocations by increased specific non-disjunction in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 76:19-31.

VAN TUYL, J.M., 1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. *Mededelingen Landbouwhogeshool Wageningen*, 77:1-136.