

INSTABILIDADE MITÓTICA EM LINHAGEM DE  
*Aspergillus nidulans* COM DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA

LIDIA FAVRAUD

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Junho - 1984

*Carlos Favraud e*  
*Alice Boueri Favraud,*  
*In memoriam*

Aos Professores,

HERMAN LENT *que, durante o Curso Secundário no Colégio Pedro II, despertou em mim o gosto pela Biologia*

DAISY NEVES FALCÃO CONCEIÇÃO *que me ensinou Genética e Evolução e fez com que eu descobrisse o quanto gosto de ser professora*

JOSEPH ALAN ROPER *que, durante o curso que ministrou no Instituto Oswaldo Cruz, me motivou para a Genética de Fungos*

JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO *que, me aceitando como orientada, permitiu o desenvolvimento deste trabalho - que vem a ser uma parcela ínfima daquilo que ele tem feito pelo desenvolvimento da Genética de Microrganismos no Brasil*

*Minha singela homenagem*

## AGRADECIMENTO

Desde que tomei a decisão de ingressar no Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ/USP, assim como no período que permaneci em Piracicaba, cursando as disciplinas e desenvolvendo a parte experimental da tese, e na volta ao Rio de Janeiro, tendo reassumido minhas atividades profissionais mas mantendo o vínculo com a ESALQ através do compromisso de concluir a tese, um grande número de pessoas foram importantes e mereceriam receber aqui um agradecimento público. Nomear estas pessoas é uma atividade traiçoeira para quem o faz, pois sempre ficam faltando nomes de pessoas que nos foram importantes em determinado momento, e monótona para quem a lê.

A vida nos aproxima e nos afasta das pessoas mas, quando existe compreensão, afeto e respeito, a distância física não é um fator limitante no relacionamento dos seres humanos.

Não querendo pecar por omissão, e na certeza de que todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho estão conscientes disso, expresso e deixo impressa minha gratidão a todos.



## INDICE

	<u>página</u>
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. A instabilidade estudada através da genética clássica .....	6
2.1.1. Instabilidade genética em organismos superiores .....	6
2.1.2. Instabilidade genética em microrganismos .....	10
2.1.2.1. Instabilidade em bactérias.	10
2.1.2.2. Instabilidade em fungos ...	12
2.1.3. Influência da temperatura e do "background" genético na instabilidade ..	20
2.2. A importância da Genética Molecular no estudo da instabilidade .....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
3.1. Linhagens .....	30
3.1.1. Símbolos e características fenotípicas dos mutantes .....	34
3.2. Meios de cultura e soluções .....	35
3.2.1. Meio mínimo (M.M.) .....	35
3.2.2. Meio completo (M.C.) .....	35
3.2.3. Solução de vitaminas .....	36
3.2.4. Hidrolisado de ácido nucléico de leveduras .....	36
3.2.5. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo .....	36
3.2.6. Meio de acetato de amônio .....	37
3.2.7. Meio mínimo - galactose .....	37
3.2.8. Solução de "Tween" 80 .....	37
3.2.9. Solução salina .....	38
3.2.10. Solução de Chloroneb (1,4-dicloro - 2,5-dimetoxibenzeno) .....	38

3.2.11. Solução de Benlate [metil 1-(butil-	38
carbamoil)-2-benzimidazole carbamato]	
3.2.12. Suplementos adicionados ao meio míni-	39
mo .....	
3.2.13. Placas de análise .....	39
3.2.14. Esterilização e incubação .....	40
3.3. Isolamento de setores deteriorados e heteroca-	
rióticos originados espontaneamente, a partir	
da linhagem A .....	40
3.4. Técnicas de análise genética .....	40
3.4.1. Obtenção de heterocários .....	40
3.4.2. Isolamento de diplóides .....	41
3.4.3. Análise mitótica .....	42
3.4.4. Análise meiótica .....	43
3.5. Testes de alelismo .....	45
3.6. Denominação dos variantes deteriorados e hete-	
rocarióticos .....	46
3.7. Obtenção de linhagens apresentando todas as	
marcas de linhagem A e "background" genético	
diferente .....	47
3.8. Influência da temperatura e do "background"	
genético na instabilidade mitótica .....	48
3.9. Análise estatística .....	50
4. RESULTADOS .....	52
4.1. Obtenção espontânea de setores a partir da li-	
nhagem A .....	52
4.2. Análise mitótica .....	56
4.2.1. Diplóides - cor, grau de instabilidade	
e tamanho dos conídios .....	56
4.2.2. Haploidização .....	60
4.2.3. Análise mitótica dos variantes deterio-	
rados originados a partir da linhagem	
A .....	60

4.2.4. Análise mitótica dos variantes deteriorados de 1ª ordem .....	63
4.2.5. Análise mitótica do variante heterocariótico .....	63
4.3. Análise meiótica .....	67
4.3.1. Segregação meiótica .....	67
4.3.2. Localização dos determinantes genéticos de deterioração nos grupos de ligação .....	70
4.3.3. Análise meiótica dos variantes heterocarióticos .....	78
4.4. Testes de alelismo .....	83
4.4.1. Grupo de ligação I .....	83
4.4.2. Grupo de ligação III .....	86
4.4.3. Grupo de ligação IV .....	86
4.4.4. Grupo de ligação VI .....	87
4.4.5. Grupo de ligação VII .....	87
4.5. Influência da temperatura e do "background" genético na instabilidade mitótica .....	88
4.5.1. Experimento I: linhagens com diferentes "backgrounds" genéticos crescidas simultaneamente em diferentes prateleiras do mesmo incubador .....	88
4.5.2. Experimento II: linhagens com diferentes "backgrounds" genéticos crescidas nas temperaturas de 30°C, 37°C e 40°C .	89
4.5.3. Experimento III: ensaios para observação da instabilidade na linhagem A, nas linhagens deficientes para a síntese de piridoxina e nas incapazes de utilizar galactose .....	91
4.5.4. Experimento IV; instabilidade na linhagem A e em oito linhagens que requerem tiossulfato .....	92

4.6. Influência da temperatura e do "background" genético na obtenção de setores deteriorados	107
5. DISCUSSÃO .....	110
5.1. Obtenção espontânea de setores a partir da linhagem A de <i>A. nidulans</i> .....	110
5.1.1. Setores heterocarióticos .....	112
5.1.2. Setores deteriorados .....	116
5.2. Diâmetro de conídios - variação dependente do grau de ploidia e da forma de medição ...	117
5.3. Utilização de fungicidas para a indução da haploidização .....	119
5.4. Análise mitótica e meiótica dos variantes de <u>teriorados</u> .....	122
5.5. Testes de alelismo.....	128
5.6. Influência da temperatura e do "background" genético na instabilidade mitótica .....	133
5.6.1. Experimentos I e II .....	135
5.6.2. Experimentos III e IV .....	139
5.6.3. Obtenção de setores deteriorados nos diferentes experimentos .....	141
6. CONCLUSÕES .....	144
7. LITERATURA CITADA .....	146

## CURRICULUM VITAE

LIDIA FAVRAUD, filha de Alice Boueri Favraud e Carlos Favraud, natural do Rio de Janeiro, obteve os títulos de Bacharel e Licenciada em História Natural, na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Logo após a conclusão do curso, foi contratada como Auxiliar de Ensino do Instituto de Biologia - UFRJ, junto ao Departamento de Genética. Após um período em que ministrou disciplinas no Ciclo Básico e no Bacharelado em Genética do Instituto de Biologia, pleiteou e obteve afastamento de suas funções para cursar a Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP. Durante esta época, através de concurso público de títulos e provas foi promovida à categoria de Professor Assistente do Instituto de Biologia - UFRJ. Após concluir as disciplinas do Curso de Pós-Graduação, reassumiu suas funções de ensino e pesquisa, continuando seu trabalho em Genética de Fungos.

INSTABILIDADE MITÔTICA EM LINHAGEM DE *Aspergillus nidulans*  
COM DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA

Autora: LIDIA FAVRAUD

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

A linhagem A de *Aspergillus nidulans* apresenta um segmento do grupo de ligação I em duplicata, um na posição normal e o outro transposto para o grupo de ligação II; devido ao excesso de material genético a linhagem é instável, produzindo dois tipos principais de setores - melhorados e deteriorados.

Neste trabalho foram isolados e analisados geneticamente setores deteriorados originados espontaneamente desta linhagem. Os determinantes genéticos de deterioração dos variantes deteriorados obtidos comportaram-se como genes simples e foram localizados nos diferentes grupos de ligação, não sendo encontrados apenas nos grupos de ligação V e VIII. Nos testes de alelismo, dentre os 16 cruzamentos realizados, em apenas dois os determinantes genéticos de deterioração eram alelos. Estes resultados indicam que a distribuição dos determinantes genéticos de deterioração pelos grupos de ligação deve ser aleatória, embora se conheça alguns locais dentro de determinados grupos de ligação nos quais um número razoável de determinantes de deterioração está localizado.

A importância do "background" genético na instabilidade foi observada através da introdução de marcadores

genéticos diferentes na linhagem A. Correlacionou-se a presença de diferentes marcadores com a alteração na frequência e nos tipos de setores produzidos. Foi observado que linhagens com determinadas marcas, como tiossulfato e piridoxina, apresentam menor frequência de setores e que quanto menor a frequência de setores apresentada pela linhagem maior é a probabilidade de surgirem setores deteriorados; a temperatura na qual eles aparecem com maior frequência é a de 37°C.

Quanto ao efeito da temperatura na instabilidade, observou-se que à 30°C as linhagens produzem setores em uma frequência bem baixa, não sendo possível detectar diferenças entre elas. Com a elevação da temperatura, para 37° e 40°C, aumenta a frequência de setores produzidos; a correlação é direta e positiva, embora à temperatura de 40°C as linhagens já apresentem taxa de crescimento menor do que à 37°C.

MITOTIC INSTABILITY IN A STRAIN OF *Aspergillus nidulans*  
WITH A CHROMOSOME DUPLICATION

Author: LIDIA FAVRAUD

Adviser: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

The strain A of *Aspergillus nidulans* has a chromosome segment of linkage group I in duplicate - one in the normal position and the other translocated to linkage group II; the strain is unstable due to the excess of genetic material and produces two broad classes of sectors - improved and deteriorated.

Deteriorated sectors, spontaneously obtained from this strain, were isolated and genetically analysed in this work. The determinants of deterioration acted as single genes and were located in different linkage groups; they were not found only in linkage groups V and VIII.

Only in two out of sixteen crosses performed the determinants of deterioration were alleles. These results indicate that the determinants of deterioration must be located at random in the linkage groups, although there are spots in certain linkage groups in which an expressive number of determinants of deterioration is located.

Different genetic markers were introduced into strain A to study the role of genetic background in stability. Different genetic markers were related with the change in the frequency and types of the sectors produced. Strains with markers as thiosulphate and pyridoxin show lower frequency of sectors, and the lower the frequency of sectors



presented by the strain the higher the probability of deteriorated sectors emerging; at 37°C they appear in higher frequency.

Regarding the effect of temperature on instability, it was observed that at 30°C the strains produce sectors in a very low frequency and it is not possible to detect differences between them. Increasing the temperature to 37°C and 40°C, the frequency of sectors rises; the correlation is direct and positive, although the strains at 40°C present a smaller growth rate than those at 37°C.

## 1. INTRODUÇÃO

A instabilidade genética, durante as divisões mitóticas, ocorre com frequência entre os seres vivos. Está normalmente associada a diferentes fatores, incluindo a presença de material genético em excesso, elementos citoplasmáticos e mutação. Este fenômeno já foi descrito em uma série de organismos, abrangendo tanto animais e plantas como microrganismos, procariotos e eucariotos. A observação de casos de instabilidade em organismos tão diversos sugere que ela deve ter um significado biológico geral. Os rearranjos cromossômicos, encontrados em associação com a instabilidade, possibilitam várias suposições. As duplicações, por exemplo, são consideradas indispensáveis à evolução; elas permitem a criação de um novo gene, a partir de uma duplicação redundante de um gene antigo, que adquire funções previamente não existentes (OHNO, 1970). As deleções, inversões e transposições podem servir para criar novas sequências de nucleotídeos ou mesmo novos genes nos pontos de fusão (NEVERS e SAEDLER, 1977). Esses processos podem ser importantes do ponto de vista evolutivo, levando à flexibilidade adaptativa, por permitirem o rearranjo da informação genética.

O *Aspergillus nidulans*, uma das espécies de fungo em que já se detectou instabilidade (BAINBRIDGE e ROPER, 1966), vem sendo estudado devido à facilidade de se isolar e analisar geneticamente os produtos da instabilidade mitótica. Já nos organismos eucariotos mais complexos não há possibilidade de se fazer cruzamentos a partir das regiões mutadas, porque elas são observadas em tecidos somáticos.

Linhagens de *Aspergillus nidulans* com duplicação cromossômica são instáveis durante a mitose, produzindo setores melhorados e, em menor frequência, setores deteriorados (NGA e ROPER, 1968). A produção de setores permite: a detecção de aberrações, a análise genética das marcas envolvidas, a utilização do fenômeno para ensaios com mutagênicos, além de propiciar especulações sobre as causas, comportamento e implicações da instabilidade.

O mecanismo de origem dos setores melhorados parece já estar bem determinado, o mesmo não ocorrendo com os deteriorados (NGA e ROPER, 1969). Supõe-se que os setores deteriorados se originam por novas duplicações em tandem em qualquer dos segmentos duplicados, disto resultando um aumento na instabilidade; a transposição deste material genético em excesso, para outras regiões do genoma não envolvidas na duplicação, reduziria a instabilidade (AZEVEDO e ROPER, 1970).

Os objetivos propostos para este trabalho são:

a- isolar setores deteriorados de origem espontânea e analisá-los geneticamente;

b. determinar, através de testes de alelismo, se existe uma localização preferencial dos determinantes genéticos de deterioração;

c. correlacionar a introdução de marcadores genéticos diferentes em uma linhagem com duplicação cromossômica com a alteração nas frequências ou nos tipos de setores produzidos;

d. analisar o efeito da temperatura na instabilidade em linhagens com diferentes "backgrounds" genéticos.

## 2. REVISAO DE LITERATURA

Logo apos a resdescoberta das leis de Mendel, antes da identificação, ao nível bioquímico, dos elementos portadores da informação hereditária, diferentes autores observaram casos esporádicos de variação somática e de genes que apresentavam alta taxa de mutação espontânea, citados como instáveis ou mutadores. Estes casos foram estudados em diversas espécies de plantas e também animais (EMERSON, 1914; DEMEREC, 1926, 1937; RHOADES, 1941; BEALE e FABERGÉ, 1941; McCLINTOCK, 1951; SAND, 1957; FINCHAM e HARRISON, 1967; BURNS e GERSTEL, 1967; GREEN, 1967, 1975).

Durante um longo período, os estudos da instabilidade genética se desenvolveram utilizando organismos eucariotos complexos. Sô na década de 40, quando finalmente se evidenciou que o DNA era o material genético, começou-se a utilizar efetivamente os microrganismos em estudos de genética. O trabalho clássico de BEADLE e TATUM com *Neurospora crassa* desencadeou o desenvolvimento da Genética de Microrganismos. Não tardou muito o aparecimento de casos de genes mutadores, principalmente em bactérias (TREFFERS *et alii*, 1954; GOLDSTEIN e SMOOT, 1955; SMITH-KEARY, 1958; GUN-

DERSEN *et alii*, 1962; DAWSON e SMITH-KEARY, 1963; TAYLOR, 1963); com o passar do tempo também começaram a ser observados casos de instabilidade genética em microrganismos eucariotos (KÄFER, 1961; BARNETT e DE SERRES, 1963; NEWMAYER, 1965; BAINBRIDGE e ROPER, 1966; BALL, 1966; CROFT, 1966; NGA e ROPER, 1966; MILLINGTON-WARD, 1967; AZEVEDO e ROPER, 1970; CLUTTERBUCK, 1970; VON BORSTEL *et alii*, 1973).

Os casos de instabilidade genética, estudados em diferentes organismos e recebendo denominações diversas, foram em princípio explicados através da genética clássica. Na verdade, a instabilidade era vista como algo anômalo, ou pelo menos incomum, já que era bastante arraigado o conceito de que os cromossomos eram entidades que transmitiam a informação genética de forma imutável, de geração a geração.

Antes do desenvolvimento da Genética Molecular foi possível conhecer mais a respeito da origem da instabilidade nos organismos onde se podia realizar estudos citogenéticos. A partir da utilização de técnicas de sequenciamento do DNA, um número cada vez maior de trabalhos sobre instabilidade ao nível molecular vem sendo desenvolvido nos diferentes organismos.

O conhecimento acumulado permitiu que se estabelecesse um paralelo entre os fenômenos observados nos diversos sistemas estudados. É importante mostrar, segundo SHAPIRO (1983), como pode ser natural a atividade de elementos móveis em diversas situações biológicas; deve-se mudar a tendência de ver os elementos móveis como curiosidades em um "background" de estabilidade do genoma.

Na década de 50 McCLINTOCK, através de estudos em milho, postulou que unidades genéticas distintas - por ela denominadas de "elementos controladores" - eram res-

ponsáveis pela indução de alterações na estrutura dos cromosomas e na expressão gênica. Os elementos controladores foram os primeiros elementos móveis a serem descritos com precisão e demonstraram seu poder de remodelar os programas hereditários. Parece que só agora chegou-se ao consenso sobre a importância dos trabalhos de McCLINTOCK e o prêmio Nobel lhe foi outorgado com 30 anos de atraso.

## 2.1. A instabilidade estudada através da genética clássica

### 2.1.1. Instabilidade genética em organismos superiores

McCLINTOCK (1951, 1953, 1955, 1956) estudou a origem e o modo de expressão da instabilidade gênica em vários loci conhecidos no milho. Os responsáveis pela alteração da expressão gênica seriam os elementos controladores, que podem causar tanto instabilidade somática quanto germinativa. Os elementos controladores podem inibir a atividade de um gene integrando-se a este gene, ou próximo a ele; podem também modificar simultaneamente a ação de mais de um gene, quando estes genes estão localizados em sequência no cromossomo. A qualquer tempo pode ocorrer excisão do elemento controlador e este pode reintegrar-se em qualquer outra parte do genoma; como ele não perde sua identidade no processo de excisão, o mesmo elemento pode associar-se a diferentes genes.

McCLINTOCK (1961) designou de elementos controladores tanto os elementos autônomos quanto os não autônomos. Posteriormente ela fez uma distinção entre eles, chamando o elemento ativador autônomo de regulador e o elemento não autônomo de operador. Segundo FINCHAM e SASTRY (1974),

que denominaram de receptor ao invés de operador o elemento do locus afetado, a relação receptor-regulador é altamente específica e três classes de elementos são reconhecidas com base nesta especificidade: "Dotted" (*Dt*), "Activator" (*Ac*) e "Suppressor-Mutator" (*Spm*). Os receptores de cada classe respondem somente aos seus próprios reguladores. As três classes de elementos diferem de forma marcante pelo efeito de dose na frequência de excisão.

Os elementos controladores estão disseminados nos estoques de milho cultivado de diversas origens geográficas. Os alelos instáveis dos estoques de McCLINTOCK (1951) apareceram em plantas sujeitas ao ciclo quebra-fusão-ponte, que dá origem a deficiências e duplicações. Vários dos genes instáveis estão localizados no braço curto do cromossomo 9, que apresenta um "knob" terminal. Admitindo que nova ocorrência de elementos controladores possa algumas vezes resultar de dano no cromossomo, é difícil acreditar que eles possam surgir "de novo" a partir de DNA não diferenciado ou de DNA de função diferente. Parece mais provável que eles estejam no genoma, em local onde não podem transmitir nem responder a sinais reguladores, talvez na heterocromatina (FINCHAM e SASTRY, 1974).

A partir de estudos sobre a presença de um cromossomo 10 anormal em milho, GAVAZZI (1975) sugeriu que este cromossomo era portador de uma região duplicada e transposta para uma nova posição. Linhagens homozigotas para a duplicação apresentavam uma morfologia característica, que parecia estar associada com a porção distal da duplicação. Foram observados, com frequência, ciclos de quebra-fusão-ponte nos tecidos do endosperma. GAVAZZI *et alii* (1977) descreveram quatro linhagens de milho com segmentos duplicados fora de posição no braço longo do cromossomo 10. A análise destas linhagens sugere que a presença de cromatina extra



produz instabilidade cromossômica, levando a uma perda parcial ou completa do segmento duplicado.

A instabilidade genética frequentemente surge após hibridação interespecífica e sua ocorrência é comum em híbridos do gênero *Nicotiana*. SMITH e SAND (1957), estudando híbridos interespecíficos de *N. langsdorffii* e *N. sanderae*, observaram plantas que apresentavam flores variegadas.

GERSTEL e BURNS (1967) observaram diversos exemplares derivados do cruzamento de duas espécies intimamente relacionadas, *N. tabacum* e *N. otophora*. Num dos casos, em plantas de *N. tabacum* portadoras de segmentos heterocromáticos introduzidos a partir de *N. otophora*, as corolas eram variegadas com faixas coral sobre fundo carmim. Esta variegação era causada por instabilidade da pigmentação carmim, controlada pelo alelo  $Co^V$  da *N. otophora*.

BURNS e GERSTEL (1967), examinando intérfases derivadas do cruzamento entre *N. tabacum* e *N. otophora*, observaram a heterocromatina como um corpo compacto; este estava presente em setores da epiderme que exibiam a cor carmim, mas estava geralmente ausente nas células de setor coral. Foram também observadas deleções na heterocromatina. O alelo  $Co^V$  deve estar localizado perto do fim do bloco de heterocromatina, provavelmente na porção distal da eucromatina; quebras cromossômicas espontâneas levariam à perda do alelo  $Co^V$  e à variegação.

Em *Drosophila* também ocorre fenômeno semelhante aos elementos controladores observados em milho. Uma vantagem da *Drosophila* para estudos citogenéticos é a presença dos cromossomos politênicos, que permitem a identificação de algumas deleções cromossômicas de tamanho pequeno e de rearranjos associados aos eventos mutacionais.

DEMEREK (1926) fez um estudo genético detalhado do gene mutador para asa miniatura em *D. virilis*, antes do desenvolvimento dos trabalhos de McCLINTOCK em milho. DEMEREK (1937) também observou genes instáveis em *D. melanogaster*.

GREEN (1967, 1969a e b, 1975) realizou uma série de estudos com genes mutadores no locus "white" em *D. melanogaster*. Observou que o gene  $w^c$  ("white crimson") mutava espontaneamente com alta frequência, tanto em fêmeas quanto em machos, para diferentes estados alélicos, sendo que o fenótipo variava de selvagem ( $w^+$ ) a branco ( $w$ ). Os alelos derivados do  $w^c$  podiam ser estáveis ou mutáveis; tanto o  $w^c$  quanto os derivados mutáveis produzem deficiências que incluem a perda do gene  $w$  e de loci adjacentes à sua direita ou à esquerda. As propriedades que caracterizam este sistema são semelhantes àsquelas dos elementos controladores no milho, embora no sistema  $w^c$  não tenha sido demonstrada - mas apenas sugerida - a transposição do elemento controlador de um sítio para outro. Posteriormente, GREEN (1969a) mapeou o gene  $w^c$  e seu elemento controlador, através de permuta interalélica. O elemento controlador associado ao gene  $w^c$  foi capaz de transpor-se do cromossomo X para o cromossomo III de *D. melanogaster*, sendo que neste processo levou consigo uma porção do gene  $w$ ; GREEN (1969b) estudou quatro transposições deste tipo, originadas independentemente, e concluiu que nestes casos o elemento controlador apresentava propriedades semelhantes àsquelas dos vírus temperados.

Um novo gene mutador em *D. melanogaster*, que causa a reversão do gene "yellow-2" ( $y^2$ ) para o tipo selvagem, foi descrito por GREEN (1970). Este gene mutador não é locus específico, já que também causa a reversão dos alelos "forked-3-N" para tipo selvagem e do alelo para cor de olho "white apricot" ( $w^a$ ) para olho branco. Todos os genes

em questão estão localizados no cromossomo X e o gene mutador foi mapeado no cromossomo III. Este mutador só funciona em fêmeas, é parcialmente dominante e parece incapaz de reverter.

RASMUSON e GREEN (1974) observaram uma duplicação em tandem, associada com o locus "white", que parecia ser geneticamente instável.

Um gene mutador para asa miniatura ( $m^u$ ), o primeiro exemplo de gene mutador fora do locus "white" em *D. melanogaster*, foi descrito por GREEN (1975). DEMEREC (1926) já havia observado a existência de um mutador para este gene em *D. virilis*. A capacidade de mutação somática e germinativa do  $m^u$  assemelha-se ao comportamento do  $mt3-\alpha$  de *D. virilis*. Parece que um segmento de DNA extra e sua transposição seriam os responsáveis pela instabilidade.

## 2.1.2. Instabilidade genética em microrganismos

### 2.1.2.1. Instabilidade em bactérias

Durante algum tempo parecia que os elementos controladores observados no milho não tinham paralelo entre os microrganismos. Mas, com os estudos em bactérias e bacteriófagos, muitas analogias puderam ser encontradas em sistemas procarióticos.

Dentre os primeiros casos descritos sobre instabilidade em bactérias estão os trabalhos de TREFFERS *et alii* (1954) e GOLDSTEIN e SMOOT (1955), em *Escherichia coli*. Estes últimos autores estudaram uma linhagem com uma alta taxa de mutação para auxotrofia, enquanto TREFFERS *et alii* (1954) observaram um variante de *E. coli* da linhagem K-12 que aumentava a taxa de mutação para resistência à estreptomicina; este gene mutador parecia ser bastante estável.

DAWSON e SMITH-KEARY (1963) trabalharam com genes instáveis em *Salmonella typhimurium* e, por analogia aos "elementos controladores" descritos por McCLINTOCK, denominaram estes genes de "epissomos controladores". Estudaram três tipos de reversão do gene *leu-151* que podem ser distinguidos por seu crescimento em Meio Mínimo; um deles, denominado "unstable slow" (US), provavelmente se originava por instabilidade no locus *su-leuA*. Linhagens US isoladas independentemente podiam apresentar graus de instabilidade muito diferentes. Eles demonstraram que os epissomos controladores podiam ser transpostos do locus *su-leuA* tanto para um locus desconhecido como para um locus conhecido e também que a instabilidade não era devida aos diferentes "backgrounds" genéticos das diferentes linhagens.

Além dos fatores mutadores encontrados em bacteriófagos, já foram isolados mais de 30 mutadores independentes em bactérias. Eles aumentam a mutabilidade espontânea de um até quase todos os genes, incluindo mutações diretas (para auxotrofia e resistência a antibióticos ou fagos) e mutações reversas (para prototrofia ou para independência a antibióticos). Alguns desses mutadores têm sido localizados no cromossomo bacteriano. Em *E. coli* são conhecidas três regiões onde os mutadores estão localizados preferencialmente (MOHN e WURGLER, 1972).

O estudo da resistência à canamicina em *Proteus mirabilis* indica ser um transposon o responsável por esta resistência. Em certas circunstâncias, este transposon parece interferir na síntese da protease, já que linhagens estáveis após o tratamento com a droga passam a apresentar indivíduos não produtores de protease (BIANCO *et alii*, 1982). Uma alta frequência de clones auxotróficos foi observada por NEWTON *et alii* (1982), a partir de populações de diferentes linhagens de *P. mirabilis*, sendo que estes mutantes são

quase sempre deficientes para a carbamil fosfato sintetase . Tais mutantes parecem não reverter para a condição de prototrofia. Foi também observada instabilidade genética para marcadores de resistência à drogas. O aparecimento de auxotrófico parece depender da presença de um transposon que, após causar a deleção no gene carbamil fosfato sintetase, pode ou não permanecer na população mantendo tais resistências em frequências variadas.

### 2.1.2.2. Instabilidade em fungos

A instabilidade genética em microrganismos eucariotos vem sendo estudada em leveduras e, entre os fungos filamentosos, principalmente em *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans*.

Em leveduras alguns dos genes responsáveis pelo aumento da radiosensitividade apresentaram atividade de mutadores. Uma linhagem sensível à radiação ultra-violeta apresentou uma duplicação na taxa de mutação espontânea, enquanto outra linhagem sensível aos raios X exibiu um aumento de cerca de 50 vezes na taxa de mutação espontânea. O aumento parece estar restrito as mutações do tipo adição-deleção (MOHN e WÜRGLER, 1972).

Instabilidade genética no locus do tipo de reação sexual foi observada por EGEL(1976), em *Schizosaccharomyces pombe*, e interpretada em termos de transposição; linhagens homotálicas são caracterizadas por dois genes adjacentes para tipo de reação sexual ( $mat_1^-$  e  $mat_2^+$ ), com funções sexuais complementares. O gene  $mat_2^+$  é capaz de se autoduplicar e a cópia duplicada mapeia na posição do  $mat_1^-$ . Devido a inserção, a função do  $mat_1^-$  é perdida e somente torna-se reativada quando a sequência inserida sofre excisão.

Em *Saccharomyces cerevisiae* GREER e FINK (1979) demonstraram a existência de transposições instáveis do gene *his4C* ( $C^+$ ). Nas linhagens normais o gene  $C^+$  está localizado no cromossomo III, mas foram detectadas transposições raras nas quais o gene  $C^+$  está inserido no cromossomo XII. Esta integração está associada a uma mutação letal recessiva, que deve ser resultado da integração do  $C^+$  em um gene essencial do cromossomo XII. A síntese de uma nova cópia do *his4C* ocorre antes da transposição, já que esta não dá origem a uma deleção simultânea no cromossomo III. As transposições  $C^+$  são instáveis e dão origem a segregantes  $C^-$  com uma alta frequência; estes segregantes resultam da excisão precisa do elemento  $C^+$  ou a partir da perda de todo o cromossomo que carrega a inserção.

A partir da década de 60 começaram a surgir vários trabalhos sobre instabilidade em *Neurospora crassa*. BARNETT e DE SERRES (1963) constataram que existem certos sítios que são mais suscetíveis aos mecanismos de mutação espontânea e que existe analogia com a instabilidade autônoma em alelos mutantes; a instabilidade parece ser alelo-específica e ter alta probabilidade de mutação para um estado mais estável, que é independente de fatores extrínsecos. Muitos casos de instabilidade refletem o fenômeno de quebra cromossômica, enquanto outros são devidos a ativadores ou genes mutadores.

NEWMEYER (1965) e NEWMEYER e TAYLOR (1967), também trabalhando com *Neurospora*, observaram um caso de instabilidade associada à inversão pericêntrica. A ocorrência de permuta dentro da região invertida dá origem a dois produtos recíprocos, um duplicado 100% viável e o outro deficiente para o mesmo segmento, sendo letal. Análises preliminares sugeriram que a segregação somática ocorreu algumas vezes devido a permuta mitótica e outras por perda do material

duplicado.

NEWMEYER e GALEAZZI (1977) estudaram a instabilidade e seu controle genético em linhagem de *Neurospora* com duplicação. Alguns mutantes de *Neurospora*, observados por NEWMEYER e GALEAZZI (1978) e NEWMEYER *et alii* (1978), aumentaram a instabilidade em duplicações. O mutante *mei-3*, dentre outros efeitos, aumenta a instabilidade de duplicações que não sejam em tandem, sendo este efeito mais marcante à 25°C. Além deste, dois outros mutantes - *uvs-3* e *uvs-6*, também aumentam a instabilidade, devido a permuta mitótica, a deleções ou a ambos os mecanismos. Na ausência de qualquer mutante sensível à ultra-violeta, a instabilidade das duplicações é aumentada pela presença de histidina no meio de cultura.

A *Neurospora crassa* e o *Aspergillus nidulans* compartilham as seguintes características, em relação ao fenômeno da instabilidade (PERKINS e BARRY, 1977):

- a. Todas as duplicações são instáveis;
- b. O material duplicado é perdido, através de um ou de vários passos, até originar haplóides efetivos;
- c. Qualquer um dos segmentos em duplicata pode ser perdido;
- d. A instabilidade é aumentada por cafeína, azul de tripan e mutantes *uvs*;
- e. Um fator recessivo reduz a instabilidade.

A vantagem da *Neurospora* é poder ser utilizada em estudos citogenéticos, mas apresenta a desvantagem de ser heterotática.

O *Aspergillus nidulans* apresenta uma série de vantagens para estudos genéticos, dentre elas o fato de ser

haplóide, homotálico e com conídios uninucleados. Além disso, o uso de mutantes autônomos para a cor dos conídios facilita a detecção e o isolamento de variantes, equivalentes aos tecidos somáticos nos organismos superiores, que podem ser analisados geneticamente.

O estudo da instabilidade genética em *A. nidulans* pode ser dividido em duas fases. Na primeira delas os casos descritos puderam ser explicados através de permuta mitótica, não disjunção e da herança citoplasmática (ROPER, 1952; PONTECORVO *et alii*, 1954; PONTECORVO e KÄFER, 1958; KÄFER, 1960, 1961; JINKS, 1966). A segunda fase teve início com a descrição dos efeitos causados por uma duplicação cromossômica (BAINBRIDGE e ROPER, 1966). Este variante, portador de duplicação cromossômica, foi originado pelo cruzamento de duas linhagens normais, uma das quais apresentava translocação não recíproca de um segmento do cromossomo III para o VIII. Este variante produzia colônias com aspecto enrugado ("crinkled") e era instável na mitose.

Dez anos após a obtenção da linhagem de BAINBRIDGE e ROPER (1966), apenas sete ou oito diferentes linhagens portadoras de duplicação tinham sido encontradas (BIRKETT e ROPER, 1977). As linhagens com duplicação cromossômica em *A. nidulans* são muito favoráveis para estudos sobre a organização do genoma como um fator que afeta as modalidades de deleções espontâneas na mitose. O fator limitante para a realização destes estudos era a obtenção de novas linhagens que fossem adequadas. Até agora as linhagens eram obtidas por um processo trabalhoso, envolvendo irradiação e uma série de análises genéticas; com exceção da linhagem A, com duplicação IR → IIR (NGA e ROPER, 1968), todas as outras foram obtidas através de translocação não recíproca. SEXTON e RO-



PER (1984) obtiveram espontaneamente e analisaram geneticamente onze linhagens com duplicação, de origens independentes. Utilizaram a técnica de PRITCHARD, a partir da qual foi isolada a linhagem com duplicação I-II (NGA e ROPER, 1968).

NGA e ROPER (1966) sugeriram vários mecanismos para explicar a instabilidade, entre eles a deleção terminal, mutação, permuta mitótica e deram ênfase à permuta desigual entre cromatídeos irmãos durante a mitose, se apenas um mecanismo fosse responsável pela instabilidade. Posteriormente, observaram que a perda do segmento cromossômico pode se dar quer por permuta desigual entre cromatídeos irmãos ou por permuta em alça intracromossômica, ambos os mecanismos gerando deleções e duplicações em tandem (NGA e ROPER, 1968).

Para caracterizar a instabilidade intracromossômica na mitose, NGA e ROPER (1969) propuseram o termo "não conformidade mitótica". Observaram que ela era produzida pelo não balanceamento cromossômico e que as mudanças genotípicas estavam restritas aos próprios segmentos que provocavam a instabilidade. CASE e ROPER (1981) mostraram que existe uma variedade de mecanismos disponíveis para a correção do não balanceamento cromossômico; a maioria dos diplóides heterozigotos para a duplicação I-II sofrem deleções, mas a eliminação da translocação por permuta mitótica é o mecanismo mais frequente no restabelecimento do balanço genômico.

Apenas as linhagens Dp (IR → IIR) e Dp (IIIL → VIIIR) estão suficientemente definidas para estudos detalhados (BIRKETT e ROPER, 1977).

A linhagem A, com duplicação I-II, utilizada por NGA e ROPER (1968), possui marcadores genéticos para coloração dos conídios na região duplicada, além de marcas para requisitos nutricionais. Esta linhagem pode dar origem a setores:

a. *melhorados*: são mais estáveis e com crescimento melhor do que a linhagem com duplicação. Se originam pela perda, parcial ou total, do segmento em duplicata. A perda pode ser intersticial e ocorre com maior frequência no segmento translocado. Dependendo do segmento em duplicata que é perdido, se no grupo I ou II, os setores formados são verdes ou amarelos (NGA e ROPER, 1968);

b. *deteriorados*: apresentam textura e coloração variável, e seu grau de instabilidade pode ser maior ou menor do que o da linhagem com duplicação; podem se originar por inversão, novas duplicações em tandem ou transposição do segmento duplicado (NGA e ROPER, 1968; AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971). Segundo BIRKETT e ROPER (1977), não existe evidência marcante da existência de duplicações em tandem, mas as duplicações que não em tandem são conhecidas e têm sido a principal fonte de informação sobre deleções;

c. *heterocarióticos*: ocorrem com baixa frequência. Apresentam uma mistura não usual de cabeças com conídios verdes e amarelos, e cabeças individuais contendo tanto conídios verdes quanto amarelos. Os setores heterocarióticos podem ter um dos seus componentes letais; estes devem surgir pela deleção de um segmento maior do que o duplicado (ROPER e NGA, 1969).

Os setores deteriorados produzidos pelas linhagens com duplicação I-II têm sido mais estudados do que aqueles provenientes das linhagens com duplicação III-VIII. Embora nestas últimas o número total de setores e também o número de setores deteriorados produzidos seja maior, a distinção entre setores melhorados e deteriorados nem sempre é clara.

Os setores deteriorados provenientes das li-

nhagens com duplicação I-II foram estudados em detalhe por AZEVEDO e ROPER (1970), que explicaram a origem dos mesmos a partir de novas duplicações ocorrendo em um ou no outro segmento em duplicata e produzindo material genético em excesso. Isto provoca um aumento na instabilidade; um aumento da estabilidade é obtido pela transposição, para outro sítio na parte não duplicada do genoma, de todo ou de parte do material genético extra. Na maioria dos casos analisados, os determinantes de mudanças morfológicas segregaram como genes simples e foram designados de determinantes de deterioração.

ROSATO (1973) utilizou a acriflavina e o etil metano sulfonato (EMS) e observou os seus efeitos na instabilidade em linhagens deterioradas, obtidas a partir de linhagens com duplicação I-II. O EMS mostrou-se mais eficiente que a acriflavina na produção de variantes morfológicas. A produção de variantes morfológicas com acriflavina depende do tipo de linhagem usada, sendo a linhagem com duplicação mais sensível à ação da mesma. Quatro dos variantes morfológicos obtidos por indução com EMS, a partir de linhagens deterioradas, mostraram supressão dos determinantes de deterioração originais e o aparecimento simultâneo de novos determinantes em diferentes locais, atuando como mutações simples (ROSATO e AZEVEDO, 1978).

MENEZES (1974) obteve variantes deteriorados espontâneos e também induzidos por luz ultra-violeta e DNA exógeno, a partir de linhagem com duplicação I-II. MENEZES e AZEVEDO (1978) observaram seis reversões, a partir de variantes originados por linhagem com duplicação I-II, e através de análise genética concluíram que cinco delas eram devidas a supressores e uma causada provavelmente por mutação reversa. Os supressores segregaram como genes simples e não estavam ligados às mutações que suprimiam.

ZUCCHI (1975) e ZUCCHI e AZEVEDO (1979) anali

saram setores deteriorados conspícuos e seus derivados, obtidos espontaneamente a partir de linhagens com duplicações III-VIII; observaram que a deterioração podia ser associada à deleção nos segmentos em duplicata, embora em dois casos os determinantes de deterioração tenham sido localizados em grupos de ligação que não estavam envolvidos na duplicação original. Outra característica dos variantes deteriorados originados a partir das linhagens com duplicação III-VIII é a alta taxa de permuta mitótica.

BIRKETT e ROPER (1977), estudando setores deteriorados obtidos a partir de uma linhagem com duplicação III-VIII, sugeriram que nos principais genótipos isolados a partir de um único setor deteriorado o evento inicial era uma deleção; esta deixava um locus viscoso ("sticky") que provocava permuta mitótica e originava vários tipos de fenótipos deteriorados.

Agentes químicos, físicos e mesmo fatores genéticos podem alterar o padrão normal de instabilidade em linhagens com duplicação cromossômica. Certas substâncias como o azul de tripan (COOKE *et alii*, 1970), cafeína, atebrina, verde malaquita (PALMER e ROPER, 1970), etil metano sulfonato (ROSATO, 1973), DNA exógeno (MENEZES, 1974), Chloroneb (AZEVEDO *et alii*, 1977) e cumarina (MAJERFELD e ROPER, 1978), assim como genes que conferem sensibilidade à luz ultra-violeta (BURR *et alii*, 1982), aumentam a instabilidade de linhagens com duplicação.

Alguns compostos, como a cicloheximida, o cristal violeta, a acriflavina, o metano e 6-aminonicotinamida, não aumentam a instabilidade (PALMER e ROPER, 1970). Já o brometo de etídio (BONATELLI e AZEVEDO, 1977), 1-4-oxathin (AZEVEDO *et alii*, 1977) e  $Mn^{2+}$  (BURR *et alii*, 1982) reduzem a instabilidade.

Agentes físicos como a luz ultra-violeta (ME-NEZES, 1974; AZEVEDO, 1975; PARAG e ROPER, 1975) e temperatura (item 2.1.3) influenciam na instabilidade de linhagens com duplicação cromossômica.

Os genes *stf-1* (AZEVEDO, 1975) e *bínA<sub>1</sub>* (PIZZI RANI-KLEINER, 1981) reduzem a instabilidade em linhagens com duplicação cromossômica.

### 2.1.3. Influência da temperatura e do "background" genético na instabilidade

A temperatura é uma variável ambiental das mais importantes e seu efeito tem sido observado em diferentes organismos há várias décadas. Já o "background" genético não tem merecido a mesma atenção dada à temperatura.

Uma mudança no "background" genético pode ter um papel muito importante, já que duas linhagens diferindo uma da outra por somente uma mutação podem responder de forma diferente a um mesmo mutagênico (ALIKHANIAN, 1962).

A frequência de mutações induzidas por radiação, em caracteres quantitativos, observada em organismos diplóides tem apresentado resultados discrepantes. Para MÜLLER e JAMES (1961), que trabalharam com três linhagens diplóides de *Saccharomyces cerevisiae*, estas discrepâncias seriam decorrentes dos efeitos fenotípicos das mutações induzidas poderem ser influenciados pelo "background" genético, com o qual as mutações devem interagir.

Segundo CLARKE e SHANKEL (1975), existem exemplos em sistemas microbianos onde alelos de um gene têm grande influência na mutabilidade de outro locus, como no caso da linhagem his thr de *Bacillus subtilis*. A produção de

revertentes  $his^+$  nesta linhagem era muito baixa, quando comparada com a da linhagem  $his^- thr^+$ ; isto porque células  $his^- thr^-$  em excesso removiam a treonina do meio e impediam o desenvolvimento e a formação de colônias pelas células  $his^+ thr^-$ .

A influência da temperatura tem sido analisada sob diferentes aspectos em vários organismos, sendo que os primeiros estudos correlacionando-a com a instabilidade foram desenvolvidos em *Drosophila*.

MULLER (1928) observou, em *Drosophila*, que a taxa de mutação por geração aumenta, embora o tempo de geração seja menor, nas temperaturas mais altas.

O gene  $mt3-\gamma$  é instável em células somáticas de *D. virilis*, mas DEMEREC (1932) não observou efeito da temperatura na instabilidade do gene em moscas criadas à  $20^\circ$ ,  $25^\circ$  e  $30^\circ C$ . Posteriormente demonstrou que os genes instáveis em *D. virilis* não são afetados por vários fatores ambientais, dentre eles a variação de  $10^\circ C$  na temperatura (DEMERC, 1941).

BEALE e FABERGÉ (1941) estudaram, em *Portulaca grandiflora*, o comportamento de um gene mutável que produz manchas coloridas nas pétalas e pecíolos. Utilizando as temperaturas de  $25^\circ$ ,  $30^\circ$ ,  $35^\circ$  e  $40^\circ C$ , detectaram uma redução na taxa de mutação com o aumento da temperatura. FABERGÉ e BEALE (1942) observaram que o gene instável parecia ser mais mutável durante o período da divisão dos cromossomos, do mesmo modo que foi observado para o gene "rose-alpha" em *Delphinium ajacis* (DEMERC, 1931).

Culturas derivadas da hibridação de *Nicotiana langsdorffii* com *N. sanderae*, que apresentavam flores com coloração variegada, foram analisadas geneticamente por SAND

(1957). O variegado-1 difere de *N. sanderae*, que é não-variegada, pela presença do tipo de alelo em um único locus; dois alelos,  $v_s$  e  $v_d$ , são instáveis. O efeito das temperaturas de  $55^\circ$ ,  $70^\circ$  e  $80^\circ\text{F}$  (cerca de  $13^\circ$ ,  $21^\circ$  e  $27^\circ\text{C}$ ) durante o desenvolvimento foi estudado através da variação de intensidade do fenótipo variegado. Um aumento na temperatura é acompanhado por uma diminuição na frequência de células pigmentadas na epiderme das pétalas.

Utilizando um clone de *Nicotiana*, SAND (1962) comparou a influência das temperaturas de  $50^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $70^\circ$  e  $80^\circ\text{F}$  (aproximadamente  $10^\circ$ ,  $16^\circ$ ,  $21^\circ$  e  $27^\circ\text{C}$ ) num locus estável  $R$  e em um locus mutável  $V$ , no mesmo tecido. A temperatura afetou o tamanho das células, aumentando o número de células examinadas por  $\text{cm}^2$  nas temperaturas mais altas; isto permite esperar maior número de setores por unidade de área nas temperaturas mais altas, mesmo sem um efeito direto da temperatura no mecanismo de formação de setores. Esta variação foi eliminada, quando da análise estatística, através de correção mas ainda assim a produção de setores somáticos pela linhagem instável é altamente significativa e está correlacionada à temperatura.

Segundo FINCHAM e SASTRY (1974), existem evidências para o controle da frequência de mutação dos alelos instáveis por outros fatores além dos elementos controladores. Dentre as variáveis ambientais, embora a temperatura possa ter um efeito marcante, não há uma regra geral a respeito de sua direção. Isto pode depender da resposta específica do segmento particular de cromatina, dentro do qual o elemento controlador está inserido, em relação à temperatura. Em milho foi observada uma relação negativa entre a temperatura e a frequência de mutações induzidas pelo  $D\bar{x}$  em  $a_1$ , enquanto a frequência de mutação de  $pg^m$  para  $pg$  aumenta com a elevação da temperatura. Em *Antirrhinum majus* também foi

encontrada uma relação negativa, mas sistemas mutáveis diferentes respondem de modo diferente à temperatura.

Segundo FINCHAM (1973), nos sistemas mutáveis a ação dos fatores ambientais deve ocorrer através da regulação gênica e não diretamente sobre os genes que apresentam alta mutabilidade.

Em *A. nidulans*, casos mais complexos de instabilidade começaram a ser estudados após o trabalho de BAINBRIDGE e ROPER (1966), no qual eles observaram o aparecimento de um variante enrugado ("crinkled") e que possuía um segmento cromossômico em duplicata, resultante de uma translocação não recíproca em uma das linhagens parentais. Desde então outras linhagens que apresentam duplicação cromossômica têm sido investigadas e, embora o número dessas linhagens adequadas para estudos genéticos seja pequeno, uma quantidade razoável de dados vem sendo acumulada principalmente sobre a influência da temperatura sobre o material genético em excesso.

Segundo NGA e ROPER (1968), a instabilidade vegetativa das linhagens enrugadas, portadoras de duplicação cromossômica, era aparentemente maior à 34° e 42°C do que à 37°C.

A maioria das deleções, em linhagens portadoras de duplicação, ocorre no segmento duplicado translocado, sendo que a frequência total de deleções depende da temperatura de crescimento (LIEBER, 1976a). A frequência total de deleções a partir da linhagem com duplicação do grupo de ligação III é maior quando crescida à temperaturas baixas, enquanto na linhagem com duplicação do grupo de ligação I a frequência é nitidamente elevada em temperaturas altas. Segundo ele, a temperatura de 39,5°C aumentaria a frequência de deleções ao seu maior nível, no caso de duplicações do grupo



de ligação I; utilizando as temperaturas de 28°, 36°, 39,5° e 42°C, com 72 repetições por tratamento, observou que a frequência de setores verdes diminuía com o aumento da temperatura, enquanto a frequência de setores amarelos aumentava de 28° a 39,5°C, mas diminuía à 42°C. Esta diminuição dos setores amarelos em temperaturas superiores a 40°C não tem sido observada por outros autores (NIFFINEGGER e SOUZA, 1979; OLIVEIRA, 1982).

BIRKETT e ROPER (1975) observaram a formação de pseudo-setores nas linhagens com duplicação III-VIII e com translocação TVI-VII quando crescidas à 37°C, mas não à 42°C. A morfologia é mais compacta à 42°C, e a ausência completa de pseudo-setores indicaria um fenótipo sensível à temperatura. Os autores discordaram da interpretação dada por LIEBER (1976a), que já divulgara parte dos seus resultados, de que ocorria um aumento na instabilidade cromossômica com a redução da temperatura de 42° para 36°C.

A incorporação em uma linhagem de *A. nidulans* da duplicação do grupo de ligação I e da duplicação intacta do grupo de ligação III fez com que a mesma apresentasse uma instabilidade à 36°C maior do que a observada em qualquer das duas linhagens portadoras de uma só duplicação (LIEBER, 1976b). As deleções a partir das duplicações III e I, nesta linhagem com dupla duplicação, geralmente resultavam em variantes que em termos de cor e morfologia eram similares àqueles produzidos pelas culturas carreando apenas uma duplicação. Geralmente, as deleções a partir da duplicação III intacta precediam as deleções de partes específicas da duplicação I. Quase todas as deleções incluindo o  $yA_2^+$  no grupo de ligação I duplicado ocorreram após a perda de parte da duplicação III.

A variação da temperatura parece alterar as frequências de deleção ou reparo, mas não as de transposição

ou de novas duplicações (NIFFINEGGER E SOUZA, 1979). As deleções preferenciais observadas no trabalho (menor temperatura maior frequência de setores verdes e maior temperatura maior frequência de setores amarelos) poderiam ser correlacionadas com a presença de enzimas de reparo atuando em diferentes sítios, de acordo com a temperatura utilizada. Assim à 40°C estas enzimas atuariam preferencialmente no sítio de ligação do segmento translocado (II), aumentando a frequência de setores amarelos; à 30°C atuariam no sítio homólogo (I) e aumentariam a frequência de setores verdes, em relação ao observado em temperaturas mais elevadas. Outra explicação seria a velocidade diferente na formação de cópias para os segmentos envolvidos na duplicação; em altas temperaturas o segmento original seria copiado com maior rapidez, produzindo maior número de setores amarelos. A velocidade de replicação do segmento original seria diminuída em temperaturas mais baixas, permitindo a expressão fenotípica do segmento translocado para o grupo de ligação II.

GABRIELLI e AZEVEDO (1980), utilizando o variante deteriorado V<sub>58</sub>, determinaram a frequência de dissômicos produzidos em diferentes temperaturas; concluíram que a variação na temperatura não teve influência na produção de dissômicos.

O efeito da temperatura na expressão do gene *binA<sub>1</sub>*, que determina a formação de conídios com mais de um núcleo, foi estudado por PIZZIRANI-KLEINER (1981). Ela utilizou as temperaturas de 28°C, 37°C e 44°C e observou que o aumento ou a diminuição de conídios uni, bi e trinucleados em função do aumento da temperatura ocorre de maneira linear. Com a elevação da temperatura a percentagem de conídios uninucleados aumenta, enquanto a dos bi e trinucleados diminui. Os dissômicos originados da linhagem MSEbin são mais instáveis que os mesmos dissômicos originados da linhagem MSE, apresen

tando maior frequência de colônias haplóides. A presença do gene *binA<sub>1</sub>* diminui a instabilidade na linhagem com duplicação cromossômica (Abin) e em diplóides, quer entre linhagens normais ou sendo uma delas portadora de duplicação.

## 2.2. A importância da Genética Molecular no estudo da instabilidade

Uma nova fase para a Genética teve início com a descoberta das enzimas de restrição em bactérias, no final da década de 60. Mais de uma centena dessas enzimas já foram isoladas, a partir de diferentes espécies bacterianas. Elas são utilizadas "in vitro" para quebrar e separar fragmentos cromossômicos, permitindo a construção de mapas físicos do genoma. As enzimas de restrição não são empregadas apenas no mapeamento dos genes mas também no isolamento dos mesmos. Com a descoberta destas enzimas um novo rumo foi dado à Genética Molecular, através da manipulação gênica ou Engenharia Genética. O DNA de várias espécies tem sido submetido a ação de diferentes enzimas de restrição e atualmente tem-se "bibliotecas" genômicas de diferentes organismos.

A tecnologia do DNA recombinante tornou possível analisar os fenômenos genéticos ao nível molecular nas células eucarióticas com a mesma precisão que em bactérias.

A existência de elementos genéticos transponíveis, que podem se inserir em diferentes sítios dos cromossomos e variar a expressão gênica, foi descrita por McCLINTOCK, na década de 50, no milho. Mais recentemente elementos similares - as sequências de inserção (IS) e os transposons (Tn) - foram observados em bactérias.

São conhecidas cinco sequências IS em *E. coli*

e seu tamanho é variável, embora pequeno. Elas estão presentes em várias cópias no cromossomo bacteriano. A inserção em um gene estrutural inativa sua função e a inserção em um operon geralmente causa efeitos polares. A integração das sequências IS demonstram certa especificidade para os sítios de inserção, cujo grau é variável de acordo com a sequência (STARLINGER, 1977).

Os transposons foram originalmente distinguidos das sequências de inserção pela presença de genes detectáveis fenotípicamente, que conferiam resistência à antibióticos. Mas há uma relação estreita entre IS e Tn. Os transposons geralmente têm nas extremidades longos segmentos repetidos diretos ou invertidos; estes segmentos repetidos são IS (CALOS e MILLER, 1980).

Virtualmente todas as sequências de inserção e transposons caracterizados ao nível de sequência têm uma extremidade repetida invertida.

A integração e a excisão dos elementos transponíveis é de maneira geral bastante precisa, mas também tem sido observado um aumento na incidência de inversões, deleções e duplicações em regiões cromossômicas adjacentes (NEVERS e SAEDLER, 1977).

A função primária dos elementos transponíveis nos procariotos é juntar DNAs não homólogos. Processos como as inversões, deleções, duplicações e translocações, geralmente envolvendo recombinação entre regiões cromossômicas aparentemente não homólogas, podem alterar a sequência da informação genética (NEVERS e SAEDLER, 1977). O termo recombinação ilegítima é usado para descrever estes rearranjos cromossômicos, que unem segmentos de DNA que não eram originalmente adjacentes. A recombinação ilegítima independe das fun-

ções normais de recombinação e de uma intensa homologia de sequência de bases entre os segmentos cromossômicos participantes; ela deve ter desempenhado um papel importante na evolução (WEISBERG e ADHYA, 1977). Segundo REANNEY (1979), a recombinação generalizada tem um caráter conservativo. A sequência de eventos na evolução da recombinação genética passou da recombinação ilegítima para a recombinação generalizada; a recombinação legítima atua agora como um freio em relação às mudanças. Os elementos controladores, as sequências de inserção e os transposons são possíveis agentes de recombinação ilegítima.

Há muito se tem evidência genética para a existência nos genomas dos eucariotos de elementos de transposição afetando o fenótipo, mas quando não tinham um efeito fenotípico eles escapavam da detecção genética. A partir de estudos de DNAs eucarióticos clonados, foram obtidas evidências de elementos transponíveis cujos efeitos não eram prontamente identificados geneticamente. Em levedura o elemento "Ty-1", que não tem função fenotípica conhecida, é flanqueado por repetições diretas (como alguns transposons procarióticos) e é transponível. Estão presentes cerca de 35 cópias dispersas deste elemento e isto corresponde a cerca de 2% do genoma da levedura. Os elementos "Ty-1" são flanqueados por sequências  $\delta$ , que são também encontradas em outros sítios (como as sequências de inserção de procariotos podem ser encontradas flanqueando os transposons ou independentemente em qualquer lugar do genoma). O "Ty-1" seria um DNA "parasita" (DOOLITTLE e SAPIENZA, 1980; CAMERON *et alii*, 1979).

O genoma de *Drosophila melanogaster* apresenta um grande número de elementos genéticos transponíveis, que estão espalhados pelos cromossomos; eles representam de 10 a 20% do genoma. Estes elementos são classificados em vários

tipos estruturais, que podem ser subdivididos em famílias, como a família "P" (ENGELS, 1983). A utilização de técnicas de DNA recombinante revelou tipos distintos de famílias de sequências repetidas; estas sequências, denominadas "copia" e "412", apresentam pequenas extremidades com repetições diretas. Estas sequências são similares ao "Ty-1" e aos elementos de transposição em bactérias, e são transponíveis.

Existe a possibilidade de que mudanças cromossômicas não casuais, associadas com tipos particulares de cânceres, possam também ser mediadas por transposição. Isto redirecionou as pesquisas em carcinogênese para experimentos nos quais o processo de tumorigênese é analisado em termos de transposição e rearranjo cromossômico (SAGER, 1979).

A base molecular da transposição está sendo estudada em diferentes sistemas. Apesar das diferenças na organização gênica e cromossômica entre procariotos e eucariotos, similaridades imprevistas têm sido descobertas com relação à existência e atuação dos fragmentos genômicos transponíveis.

As idéias atuais sobre a natureza e as funções dos elementos transponíveis variam desde aquelas que postulam um papel importante na evolução até as sugestões de que estes elementos seriam sequências parasitas, e que a habilidade dos mesmos de se replicar além dos cromossomos impediria sua eliminação (NEVERS e SAEDLER, 1977; KLECKNER, 1977; DOOLITTLE e SAPIENZA, 1980; ORGEL e CRICK, 1980).

Como diferentes elementos transponíveis vêm sendo estudados sob o enfoque molecular, em diferentes espécies, não deve tardar o aparecimento de trabalhos com o *Aspergillus nidulans*, que talvez viessem esclarecer o mecanismo de transposição dos determinantes de deterioração.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens

As linhagens de *Aspergillus nidulans* utilizadas neste trabalho, derivadas dos estoques da Universidade de Glasgow - Escócia, foram as seguintes:

a. Linhagem A, que contém um segmento terminal do cromossomo I em duplicata, um na posição normal e o outro translocado para a extremidade do braço direito do cromossomo II (NGA e ROPER, 1968). Na Figura 1 pode-se observar a localização dos marcadores genéticos da linhagem A.

b. Linhagem MSE (Master Strain E), obtida por McCULLY e FORBES (1965), que possui marcadores genéticos nos oito grupos de ligação e conídios brancos (Figura 2).

c. Linhagem MSF (Master Strain F), também obtida por McCULLY e FORBES (1965), que se diferencia da MSE por apresentar conídios amarelos e resistência à acriflavina (marcador genético  $AcrA_1$ , localizado no grupo de ligação II, ao invés de  $WA_3$ ).

d. Linhagem  $proA_1$ ,  $pabaA_6$ ,  $yA_2$  haplóide, normal.

e. Variantes deteriorados  $V_8$ ,  $V_9$ ,  $V_{10}$ ,  $V_{28}$  (AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971),  $V_{36}$  (MENEZES, 1974) e  $V_{46}$  (PAES DE BARROS, 1977), todos derivados espontaneamente da linhagem A (Figura 3).

f. Variantes deteriorados  $V_{16}$  e  $V_{17}$  (AZEVEDO e ROPER, 1970), derivados espontaneamente da linhagem B (Figura 3).

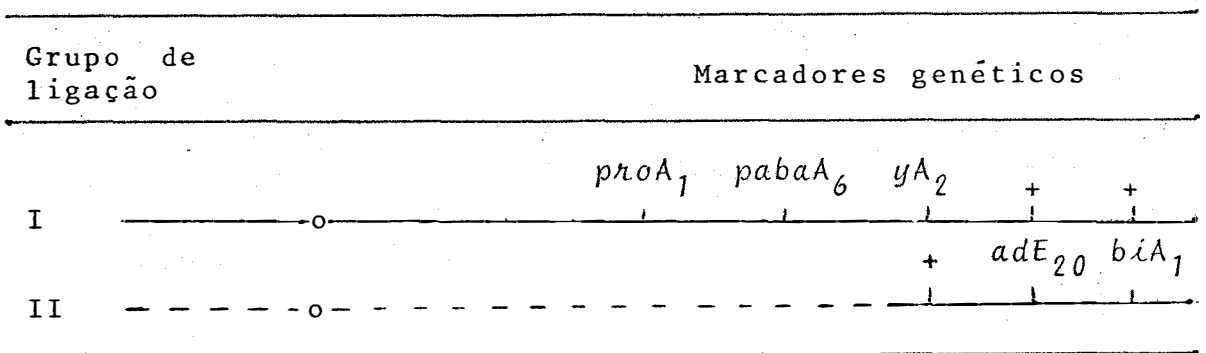


FIGURA 1. Marcadores genéticos da linhagem A.

As posições dos marcadores genéticos não estão em escala no mapa. A linha cheia corresponde ao grupo de ligação I e a tracejada ao grupo de ligação II. Os centrômeros estão representados por O. Os fenótipos determinados pelos alelos mutantes estão descritos no item 3.1.1.



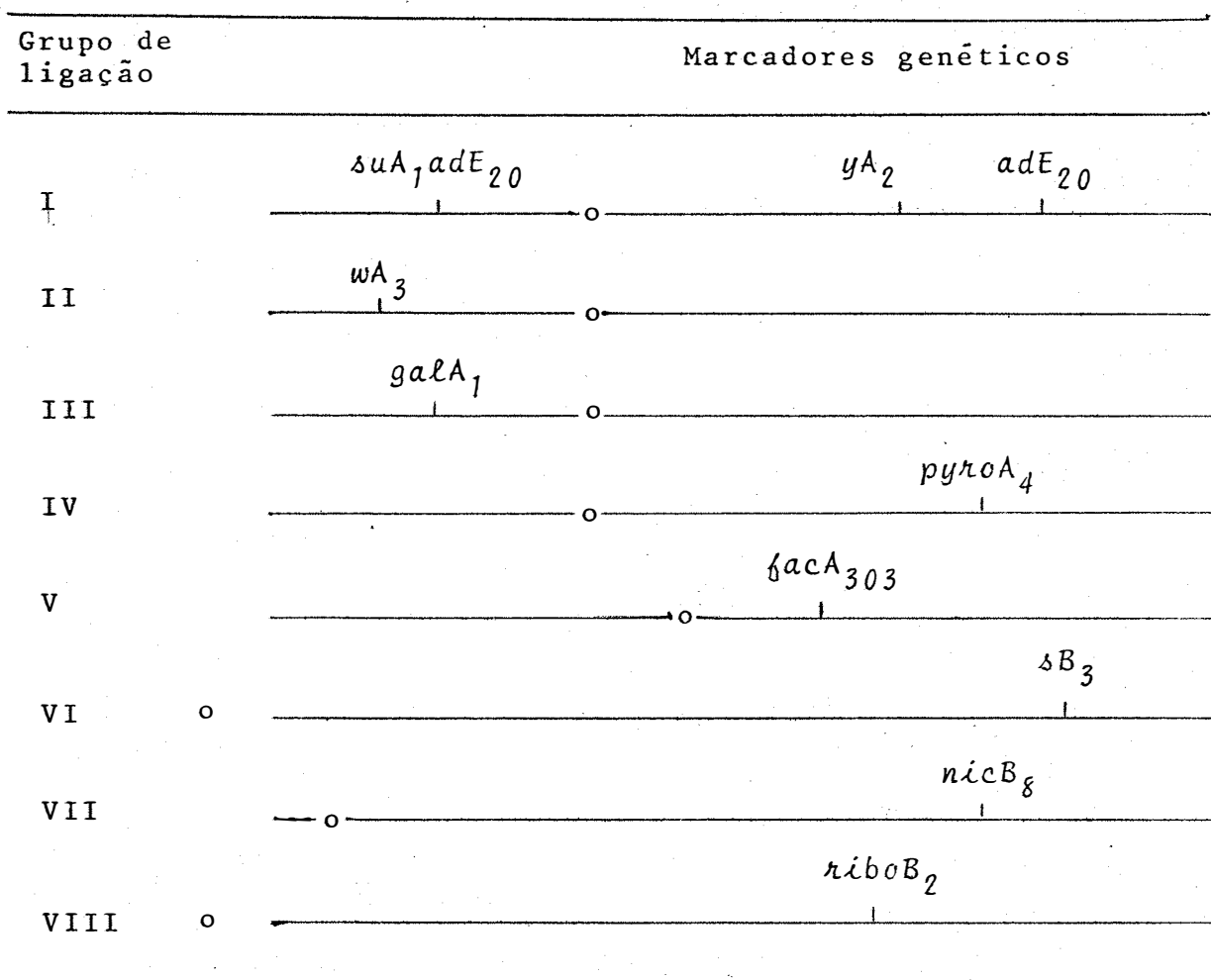
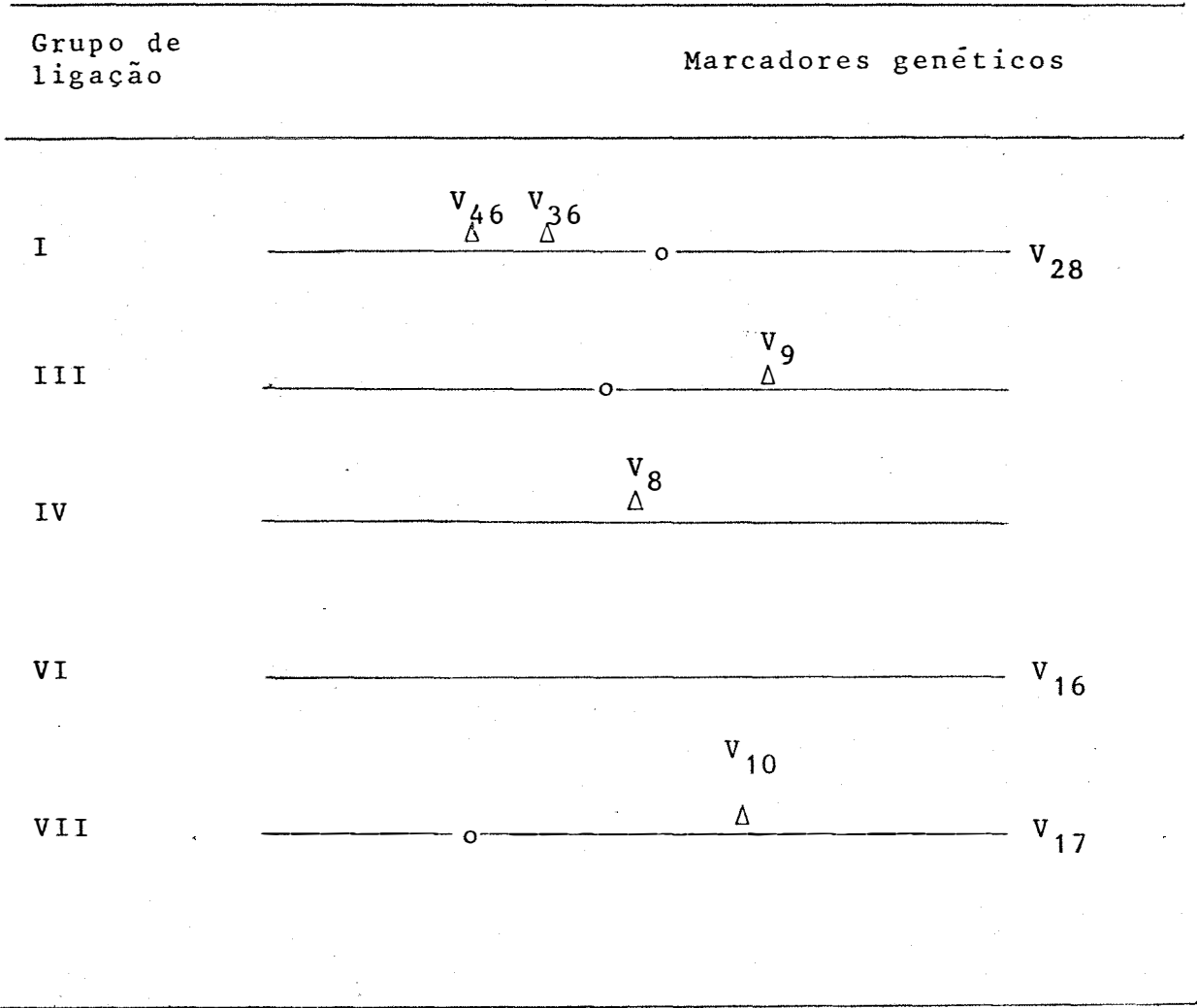


FIGURA 2. Marcadores genéticos da linhagem MSE.

As posições dos marcadores genéticos não estão em escala no mapa. Os centrômeros estão representados por o. Os fenótipos determinados pelos alelos mutantes estão descritos no item 3.1.1.



$\Delta$  = determinante de deterioração

o = centrômero

marcas à direita não estão mapeadas meioticamente.

FIGURA 3. Localização dos variantes deteriorados utilizados nos testes de alelismo.

### 3.1.1. Símbolos e características fenotípicas dos mutantes

Símbolo	Característica fenotípica
Mutantes nutricionais:	Requerem:
<i>adE</i> <sub>20</sub>	adenina
<i>biA</i> <sub>1</sub>	biotina
<i>nicB</i> <sub>8</sub>	ácido nicotínico
<i>pabaA</i> <sub>6</sub>	ácido <i>p</i> -aminobenzóico
<i>proA</i> <sub>1</sub>	prolina
<i>pyroA</i> <sub>4</sub>	piridoxina
<i>riboB</i> <sub>2</sub>	riboflavina
<i>sB</i> <sub>3</sub>	tiosulfato
Mutantes morfológicos:	
<i>v</i> <sub>8</sub> , <i>v</i> <sub>9</sub> , <i>v</i> <sub>10</sub> , <i>v</i> <sub>16</sub> ,	deterioração
<i>v</i> <sub>17</sub> , <i>v</i> <sub>28</sub> , <i>v</i> <sub>36</sub> , <i>v</i> <sub>46</sub>	
<i>wA</i> <sub>3</sub>	conídios brancos (epistático para <i>yA</i> <sub>2</sub> )
<i>yA</i> <sub>2</sub>	conídios amarelos
Outros:	
<i>facA</i> <sub>303</sub>	incapaz de utilizar acetato como fonte de carbono
<i>galA</i> <sub>1</sub>	incapaz de utilizar galactose como fonte de carbono
<i>suA</i> <sub>1</sub> <i>adE</i> <sub>20</sub>	supressão do fenótipo condicionado pelo mutante <i>adE</i> <sub>20</sub>

A origem dos mutantes pode ser encontrada no trabalho de CLUTERBUCK (1974).

### 3.2. Meios de cultura e soluções

#### 3.2.1. Meio mínimo (M.M.)

Preparado de acordo com PONTECORVO *et alii* (1953), modificado.

Nitrato de sódio .....	6,00 g
Cloreto de potássio .....	0,52 g
Sulfato de magnésio heptahidratado .....	0,52 g
Fosfato dihidrogenado de potássio .....	1,52 g
Sulfato de ferro .....	0,01 mg
Sulfato de zinco .....	0,01 mg
Glicose .....	10,00 g
Água destilada .....	1,00 l

O pH foi acertado para 6,8 com NaOH 1N, antes de autoclavar. Para meio sólido adicionou-se 15 g de ágar.

#### 3.2.2. Meio completo (M.C.)

Preparado da mesma maneira que o meio mínimo, adicionando-se por litro:

Peptona (Difco) .....	2,00 g
Caseína hidrolisada (Difco) .....	1,50 g
Extrato de leveduras (Difco) .....	0,50 g
Solução de vitaminas .....	1,00 ml
Hidrolisado de ácido nucléico de leveduras .....	2,50 ml

### 3.2.3. Solução de vitaminas

Ácido nicotínico .....	10,00 mg
Ácido p-aminobenzóico .....	1,00 mg
Aneurina (Tiamina) .....	5,00 mg
Biotina .....	0,02 mg
Piridoxina .....	5,00 mg
Riboflavina .....	10,00 mg
Água destilada .....	10,00 ml

Após adicionar todas as vitaminas à água destilada esterilizada, a solução foi mantida em banho-maria por 15 minutos. A solução foi guardada no refrigerador, em frasco escuro, com clorofórmio.

### 3.2.4. Hidrolisado de ácido nucléico de leveduras

Ácido nucléico de leveduras - 2 g em 15 ml de HCl 1N

Ácido nucléico de leveduras - 2 g em 15 ml de NaOH 1N

As soluções foram fervidas por 20 minutos, sendo então misturadas e o pH foi acertado para 6,0; filtrou-se ainda quente. O volume foi ajustado para 40 ml e a solução foi mantida em frasco escuro, com clorofórmio, no refrigerador. A solução foi sempre agitada antes de usar.

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

Adicionou-se ao meio mínimo líquido 2% de meio completo líquido. Distribuiu-se 2,5 ml em cada tubo de ensaio e estes, em seguida, foram autoclavados.

## 3.2.6. Meio de acetato de amônio

Preparado de acordo com APIRION (1962) .

Acetado de amônio .....	12,00 g
Cloreto de sódio .....	2,00 g
Sulfato de magnésio heptahidratado .....	0,50 g
Fosfato dihidrogenado de potássio .....	3,00 g
Sulfato de ferro .....	0,01 mg
Sulfato de zinco .....	0,01 mg
Ágar .....	12,00 g
Água .....	1,00 l

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

## 3.2.7. Meio mínimo - galactose

Preparado de acordo com ROBERTS (1959).

No meio mínimo, substituiu-se a glicose por igual quantidade de galactose como única fonte de carbono.

## 3.2.8. Solução de "Tween" 80

"Tween" 80 .....	0,10 ml
Água destilada .....	100,00 ml

Distribuiu-se em tubos de ensaio (2,5 ml por tubo) e autoclavou-se.

### 3.2.9. Solução salina

Cloreto de sódio .....	8,50 g
Água destilada .....	1,00 l

Colocou-se 9,0 ml da solução por frasco e autoclavou-se.

### 3.2.10. Solução de Chloroneb (1,4 - dicloro - 2,5 - dimetoxibenzeno)

Preparada de acordo com AZEVEDO e SANT'ANA (1975).

Demosan (65% de Chloroneb) .....	100,00 mg
Água destilada .....	50,00 ml

Após a adição de Chloroneb à água destilada esterilizada, a solução foi mantida em banho-maria por 15 minutos e posteriormente conservada no refrigerador.

### 3.2.11. Solução de Benlate [metil 1 - (butil-carbamoil) - 2 - benzimidazole carbamato]

Preparada segundo HASTIE (1970).

Benlate (50% de Benomyl) .....	20,00 mg
Água destilada .....	10,00 ml

Após a adição de Benlate à água destilada previamente esterilizada, a solução foi mantida em banho-maria por 15 minutos e posteriormente conservada no refrigerador.

## 3.2.12. Suplementos adicionados ao meio mínimo

As soluções estoque de cada um dos suplementos foram preparadas adicionando-se a droga em água destilada previamente esterilizada. As soluções foram, em seguida, mantidas em banho-maria por 15 minutos e posteriormente conservadas no refrigerador.

Solução estoque (mg/100 ml de H <sub>2</sub> O)		Quantidade adicionada por placa (ml/20 ml de meio de cultura)	Concentração final do meio de cultura (µg/ml)
Adenina .....	500,00	0,10	25,00
Ácido nicotínico .....	10,00	0,10	0,50
Ácido p-aminobenzóico ..	5,00	0,10	0,25
Biotina .....	4,00	0,10	0,20
Metionina .....	1.000,00	0,10	50,00
Piridoxina .....	5,00	0,10	0,25
Prolina .....	1.000,00	0,10	50,00
Riboflavina .....	10,00	0,10	0,50
Tiossulfato de sódio ...	2.000,00	0,10	100,00

## 3.2.13. Placas de análise

Para análise genética das colônias, utilizou-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 mais todos os requisitos, exceto aquele sob análise. Utilizou-se também placas de Petri com meio mínimo - galactose e meio de acetato de amônio, sendo que em ambos os casos suplementou-se com todos os requisitos nutricionais das linhagens envolvidas no cruzamento.



### 3.2.14. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e soluções, assim como as placas de Petri e tubos de ensaio para descarte, foram esterilizados em autoclave, à pressão de 1 atmosfera, por 15 minutos, exceto nos casos onde outro procedimento foi descrito.

As placas de Petri, após a lavagem, foram esterilizadas em estufa de secagem, a  $150^{\circ}\text{C}$ , por 2 horas.

A temperatura de incubação, exceto nos casos mencionados, foi de  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3. Isolamento de setores deteriorados e heterocarióticos originados espontaneamente, a partir da linhagem A

Inoculou-se a linhagem A no centro de placas de Petri invertidas, contendo meio completo, utilizando-se a técnica de inoculação por ponto. As placas permaneceram incubadas de 7 a 10 dias, tempo necessário para que a colônia crescesse por toda a superfície do meio; posteriormente, procedeu-se a contagem dos setores melhorados e deteriorados. Os setores deteriorados e heterocarióticos foram isolados em placas com meio completo e purificados através de cultura monospórica. Como alguns desses setores mostraram-se muito instáveis, a estocagem do material também foi feita em placas de Petri, além dos tubos de ensaio, no refrigerador. Como controle utilizou-se a linhagem  $proA_1$ ,  $pabaA_6$ ,  $yA_2$ .

### 3.4. Técnicas de análise genética

#### 3.4.1. Obtenção de heterocários

Para obtenção de heterocários utilizou-se dois métodos diferentes: o descrito por PONTECORVO *et alii*

(1953), modificado, e o citado por AZEVEDO (1971).

No primeiro método, conídios de ambas as linhagens, MSE e deteriorada ou heterocariótica, foram transferidos, em igual quantidade, para tubos de ensaio com 2,5 ml de meio mínimo líquido mais 2% de meio completo, o que permitiu o início da germinação e a possibilidade de ocorrer anastomose de hifas. Formou-se uma película na superfície do meio de cultura, após 3 a 4 dias de incubação, sendo a mesma transferida para uma placa de Petri com meio mínimo e recortada em 4 pedaços. A presença de núcleos geneticamente diferentes na mesma hifa (heterocário) permitiu o crescimento em meio mínimo.

A metodologia citada por AZEVEDO é indicada em cruzamentos nos quais as linhagens são muito instáveis, já que reduz o número de mitoses necessárias até a formação de conídios diplóides e de cleistotécios. Nestes casos colocou-se meio mínimo sólido em placas de Petri ( $\pm$  30 ml/placa) e, depois que o meio solidificou, foram feitos 4 orifícios com o auxílio de um tubo de ensaio estéril. Conídios das linhagens a serem cruzadas foram colocados em meio líquido mais 2% de meio completo. A suspensão de conídios foi colocada nos orifícios ("poços") abertos no meio de cultura. Após 6 a 7 dias de incubação, surgiram setores heterocarióticos, contendo os dois tipos de núcleos geneticamente diferentes na mesma hifa. Deste modo eliminou-se a necessidade de transferência da película do meio líquido para o sólido, como ocorre no método descrito anteriormente.

### 3.4.2. Isolamento de diplóides

Utilizando-se a técnica de ROPER (1952) foram obtidos diplóides heterozigotos, a partir dos setores heterocarióticos. Transferiu-se uma grande quantidade de conídios para solução de "Tween", a fim de obter-se uma suspensão com

cerca de  $10^7$  conídios/ml. Esta suspensão foi semeada em placas de Petri com meio mínimo e incubadas por 72 horas. A maioria dos conídios eram haplóides e não foram capazes de crescer em meio mínimo; mas, raramente, eram formados núcleos diplóides heterozigotos, através da fusão de núcleos haplóides de constituição genética diferente, e estes cresciam em meio mínimo.

Os critérios utilizados para o reconhecimento dos diplóides foram: a. capacidade de crescer em meio mínimo; b. cor da colônia; c. tamanho do conídio. A medida dos conídios foi feita em microscópio com ocular micrométrica, observando-se várias cadeias de 5 conídios em lâminas com lisol diluído (2: 10), que favorece a manutenção dos conídios em cadeias (PONTECORVO *et alii*, 1954).

Os diplóides obtidos foram isolados e purificados através de cultura monospórica, em meio mínimo. Foram mantidos em tubos de ensaio, com meio mínimo inclinado, no refrigerador.

Por convenção, os componentes de um núcleo diplóide foram separados pelo sinal //.

### 3.4.3. Análise mitótica

A análise mitótica foi efetuada através do ciclo parassexual. Para tal fim utilizou-se segregantes haplóides obtidos a partir dos diplóides heterozigotos (item 3.4.2.).

Induziu-se a haploidização dos diplóides com Benlate (HASTIE, 1970) ou Chloroneb (AZEVEDO e SANT'ANA, 1975) na concentração final de 0,5 µg/ml e 10,0 µg/ml de produto ativo, respectivamente, em meio completo. Os conídios

diplóides foram inoculados, em quatro pontos equidistantes ou através de estrias (SINGH e SINHA, 1976), nas placas de meio completo mais a droga, que inibe o crescimento dos diplóides, permitindo o crescimento dos setores haplóides que surgem como segregantes.

O período de incubação foi de sete dias e posteriormente os setores obtidos foram purificados, através da técnica de estrias em meio completo; a seguir foram inoculados um a um em placa de meio completo, com 26 pontos fixos na disposição  $1 + 5 \times 5$ . Após três dias de incubação esta placa serviu como placa mestra, sendo replicada para as placas de análise através de um replicador multifio (AZEVEDO *et alii*, 1976). As leituras das placas de análise foram feitas com 24 e 48 horas de incubação, anotando-se as colônias que cresceram e as que não cresceram em cada placa.

#### 3.4.4. Análise meiótica

Utilizou-se a metodologia descrita por PONTECORVO *et alii* (1953) para a análise meiótica. O *A. nidulans*, embora seja uma espécie homotática, apresenta heterotalismo relativo, o que favorece a ocorrência de cleistotécios híbridos; estes são utilizados na análise meiótica.

Para obtenção dos cleistotécios incubou-se, por 8 a 10 dias, placas de meio mínimo com heterocários (item 3.4.1.) vedadas com fita celulósica, para favorecer a formação de cleistotécios.

Usando-se microscópio estereoscópico e agulha bacteriológica, selecionou-se os maiores cleistotécios de cada cruzamento. Estes foram transferidos para placas de Petri com meio de ágar a 3% e "rolados" até que se soltassem as células de Hülle e os conídios a eles aderidos. Depois

de limpos, cada um dos cleistotécios foi colocado na parede de um tubo de ensaio com solução de "Tween" 80 e esmagado, com o auxílio de uma pipeta, contra a parede do tubo. Os ascósporos liberados foram suspensos em "Tween", transferidos para frascos com salina e mantidos no refrigerador.

Semeou-se a suspensão de ascósporos em placas de Petri com meio completo para determinar, pela coloração das colônias, se os cleistotécios eram híbridos ou autofecundados. Após 72 horas de incubação verificou-se quais, dentre os cleistotécios, eram híbridos; os autofecundados foram abandonados.

As suspensões de três cleistotécios foram semeadas em 12 placas de Petri e estas foram incubadas por 72 horas. Ao final deste período, anotou-se o número de colônias deterioradas e normais, sendo estas separadas pela cor. Estas colônias foram utilizadas na preparação de 4 placas mestras, do seguinte modo, quando o cruzamento era entre uma linhagem deteriorada e uma linhagem testadora: 1. uma placa com 26 colônias brancas; 2. uma placa com 13 colônias amarelas e 13 verdes; 3. duas placas, cada uma com 26 colônias de deterioradas. As placas foram incubadas por 72 horas e depois transferidas, através de replicador multifio, para as placas de análise. As leituras das placas de análise foram efetuadas com 24 e 48 horas de incubação, anotando-se as colônias que cresceram e as que não cresceram em cada um dos meios de cultura. Apenas as leituras para a marca biotina foram realizadas após 18 horas de incubação.

Através dos dados obtidos com a análise meiótica pode-se determinar se ocorre ligação entre dois loci, utilizando-se a fórmula:

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

onde:

C = frequência de recombinação  
 R = número de colônias recombinantes  
 T = número total de colônias analisadas

Para o cálculo do desvio padrão utilizou-se a seguinte fórmula:

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

onde:

s = desvio padrão  
 p = frequência de colônias recombinantes  
 N = número total de colônias analisadas

Observou-se também se a segregação entre os alelos era de 1:1; aplicou-se o teste  $X^2$  para concluir se os desvios observados ocorreram ao acaso.

### 3.5. Testes de alelismo

Os variantes deteriorados obtidos neste trabalho, cujos determinantes de deterioração localizavam-se no mesmo grupo de ligação, foram submetidos à análise genética através do ciclo sexual para averiguar se os determinantes de deterioração são alelos. Utilizou-se também, nos testes de alelismo, os variantes deteriorados  $V_8$ ,  $V_9$ ,  $V_{10}$ ,  $V_{16}$ ,  $V_{17}$ ,  $V_{28}$ ,  $V_{36}$  e  $V_{46}$ , anteriormente obtidos e analisados geneticamente por outros autores (item 3.1.).

Para a realização dos cruzamentos entre um variante deteriorado e um segregante de outra variante deteriorado, era necessário que ambos apresentassem deficiências nu

tricionais diferentes; deste modo a manutenção do heterocá-  
rio só seria possível através da complementação entre eles.  
Quando os determinantes genéticos de deterioração eram ale-  
los, destes cruzamentos obtinha-se apenas colônias deteriora-  
das; não sendo alelos, de acordo com a proporção entre colô-  
nias deterioradas e normais podia-se inferir se estavam liga-  
dos ou não.

### 3.6. Denominação dos variantes deteriorados e heterocariô- ticos

As linhagens deterioradas foram designadas co-  
mo  $V_{53}$ ,  $V_{54}$ , etc. Esta numeração foi continuação daquela ini-  
ciada por AZEVEDO (1971) e continuada por ROSATO (1973); ME-  
NEZES (1974); PAES DE BARROS (1977) e NIFFINEGGER E SOUZA  
(1979).

Os variantes de 1.<sup>a</sup> ordem, que apareceram duran-  
te o crescimento vegetativo, foram designados de modo a reve-  
lar suas origens. Deste modo, um variante de 1.<sup>a</sup> ordem obti-  
do a partir da linhagem deteriorada  $V_{53}$  foi designado como  
 $V_{53.1}$ .

Os determinantes de deterioração foram desig-  
nados com os mesmos números dos variantes, usando-se o  $v$  mi-  
núsculo.

Os variantes heterocarióticos foram designa-  
dos como  $H_{17}$ ,  $H_{18}$ , etc., continuando a numeração iniciada  
por NIFFINEGGER E SOUZA (1979).

### 3.7. Obtenção de linhagens apresentando todas as marcas de linhagem A e "background" genético diferente

Através do cruzamento das linhagens A e MSE, procurou-se isolar segregantes meióticos que apresentassem todas as marcas genéticas da linhagem A, inclusive o segmento duplicado, e apenas uma ou duas marcas de linhagem MSE. A metodologia empregada para obtenção de cleistotécios foi aquela descrita no item 3.4.4., sendo que apenas as colônias verdes (portadoras da duplicação) foram transferidas para as placas de análise (item 3.2.13.); aquelas que eram deficientes para a síntese de prolina e ácido *p*-aminobenzóico, prototróficas para adenina e biotina e além disso apresentavam uma ou duas marcas da linhagem MSE foram isoladas. As linhagens assim obtidas apresentavam, além das marcas da linhagem A, as seguintes características:



Linhagem <sup>a/</sup>	Incapacidade de utilizar e/ou deficiente para a síntese de:
3	galactose
4	acetato
5	piridoxina
6	tiosulfato
7	ácido nicotínico
8	riboflavina
9	piridoxina
10	piridoxina
11	galactose
12	galactose
13	tiosulfato
14	tiosulfato
15	tiosulfato e acetato
16	tiosulfato e acetato
17	tiosulfato e piridoxina
18	tiosulfato e ácido nicotínico
19	tiosulfato e riboflavina

a/ As linhagens que apresentam a mesma característica fenotípica mas números diferentes são produtos de divisões meióticas diferentes.

### 3.8. Influência da temperatura e do "background" genético na instabilidade mitótica

Observou-se a influência da temperatura: a. em três prateleiras dentro de um mesmo incubador, regulado para 37°C; b. em três incubadoras diferentes, regulados para as temperaturas de 30°, 37° e 40°C.

As linhagens com diferentes "backgrounds" genéticos isoladas durante o presente trabalho (ítem 3.7.) foram inoculadas por ponto, a partir de colônias monospóricas, em placas de Petri contendo meio completo.

O delineamento experimental em blocos ao acaso foi utilizado em ambos os casos. Em cada prateleira, ou em cada incubador, colocou-se 7 repetições.

O período de incubação das placas foi de 7 dias, tempo necessário para as colônias crescerem por toda a superfície do meio de cultura; apenas as placas incubadas a 40°C tiveram este período aumentado para 10 dias, devido a taxa de crescimento ser menor a esta temperatura.

Ao fim do período de incubação de cada um dos ensaios, cada placa foi examinada e o número e tipo de setores observados foram anotados.

Os ensaios, de acordo com as linhagens utilizadas e as condições de incubação, foram reunidos em quatro grupos de experimentos, com as seguintes características:

Experimento I - Composto de três ensaios, cada um ocupando uma prateleira de um incubador regulado para a temperatura de 37°C. Em cada um dos ensaios utilizou-se as linhagens designadas de 1 a 8. A linhagem A aparece sob a denominação de linhagem 1, enquanto a linhagem 2 é um segregante meiótico do cruzamento A x MSE que apresenta apenas as marcas da linhagem A. As características das linhagens 3 a 8 estão descritas no ítem 3.7.

Experimento II - Composto de três ensaios, cada um deles utilizando uma temperatura de incubação: 30°, 37° e 40°C. As linhagens utilizadas, em cada um dos ensaios,

foram as mesmas do experimento I.

Experimento III - As temperaturas dos três ensaios foram iguais a do experimento II. As linhagens utilizadas foram as de número 1, 3, 5 e 9 a 12; isto é, a linhagem A, três linhagens que são deficientes para a síntese de piridoxina e três que são incapazes de utilizar galactose como única fonte de carbono, além das marcas da linhagem A.

Experimento IV - As temperaturas utilizadas foram iguais as do experimento II. As linhagens utilizadas foram as de número 1, 6 e 13 a 19; destas, três necessitam apenas de tiossulfato e cinco apresentam ainda um outro marcador genético da linhagem MSE, além daqueles da linhagem A.

### 3.9. Análise estatística

Os dados relativos ao número de setores produzidos por cada uma das linhagens, nos diferentes ensaios, foram transformados pela fórmula  $\sqrt{x + 1/2}$  (STEEL e TORRIE, 1960). Os dados transformados foram submetidos à análise da variância (SNEDECOR e COCHRAN, 1980; PIMENTEL GOMES, 1976), segundo o esquema:

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	n-1	S.Q. <sub>b</sub>	S.Q. <sub>b</sub> /n-1=Q.M. <sub>b</sub>	Q.M. <sub>b</sub> /Q.M. <sub>r</sub>
Linhagens	k-1	S.Q. <sub>l</sub>	S.Q. <sub>l</sub> /k-1=Q.M. <sub>l</sub>	Q.M. <sub>l</sub> /Q.M. <sub>r</sub>
Resíduo	(n-1)(k-1)	S.Q. <sub>r</sub>	S.Q. <sub>r</sub> /(n-1)(k-1)=Q.M. <sub>r</sub>	
Total	(k.n)-1	S.Q. <sub>total</sub>		

onde: n = nº de repetições por linhagem;  
k = nº de linhagens.

As fontes de variação repetição dentro de prateleiras (ou incubadores) e interação linhagem versus prateleira (ou incubador) foram introduzidas quando os três ensaios de um experimento podiam ser submetidos à análise conjunta da variância.

Para comparar as médias, quando os valores de F foram significativos, foi utilizado o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, segundo a fórmula:

$$\Delta = q \cdot \frac{s}{\sqrt{r}}$$

onde: q = amplitude total studentizada

s = estimativa do desvio padrão residual

r = nº de repetições

Nas tabelas foi utilizada a simbologia usual para os níveis de probabilidade dos testes estatísticos empregados, como abaixo:

ns - não significativo

\* - significativo ao nível de 5%

\*\* - significativo ao nível de 1%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Obtenção espontânea de setores a partir da linhagem A

O número e os tipos de setores obtidos a partir de 257 colônias da linhagem A estão relacionados na Tabela 1 e a frequência de setores por colônia na Tabela 2. Nas 145 colônias da linhagem *proA<sub>1</sub>*, *pabaA<sub>6</sub>*, *YA<sub>2</sub>*, usada como controle, não foi observada a formação de setores.

Tanto os setores deteriorados quanto os heterocarióticos ocorreram em pequeno número; além disso, nem todos puderam ser isolados, devido ao alto grau de instabilidade.

Dentre os setores heterocarióticos obtidos, apenas um ( $H_{17}$ ) deu origem a colônias amarelas e verdes quando transferido para outra placa de Petri. Não se conseguiu manter o setor sob a forma heterocariótica. As colônias amarelas foram designadas como  $H_{17a}$  e as verdes  $H_{17v}$ . Dois outros heterocarióticos só deram origem a colônias amarelas ( $H_{18}$  e  $H_{19}$ ). A descrição das características morfológicas destes variantes heterocarióticos encontra-se na Tabela 3.

TABELA 1. Frequência de setores obtidos espontaneamente, a partir de 257 colônias, da linhagem A.

Setores	Nº observado	Frequência (%)	Nº médio/colônia
amarelos	274	77,97	1,07
verdes	48	13,47	0,19
deteriorados	26	7,31	0,11
heterocarióticos	8	2,24	0,03
Total	356	100,00	1,38

TABELA 2. Frequência total de setores por colônia da linhagem A <sup>a/</sup>.

Nº total de setores/colônia	Nº de placas	Frequência (%)
0	92	35,81
1	85	33,07
2	40	15,56
3	17	6,61
4	7	2,72
5	8	3,11
6	1	0,39
7	2	0,78
8	1	0,39
9	0	0,00
10	2	0,78
11	1	0,39
12	0	0,00
13	1	0,39
Total	257	100,00

<sup>a/</sup> Inoculação por ponto, no centro de placas de Petri com 10 cm de diâmetro.

TABELA 3. Descrição dos variantes heterocarióticos derivados espontaneamente da linhagem A.

Variante	Características morfológicas
H <sub>17a</sub>	- micélio amarelo claro, coloração do reverso da colônia clara, conidiação normal, <u>co</u> nídios amarelos.
H <sub>17v</sub>	- micélio amarelo claro, coloração do reverso da colônia marrom claro, conidiação <u>nor</u> mal, conídios verdes.
H <sub>18</sub>	- micélio amarelo claro, coloração do reverso da colônia clara, conidiação normal, <u>co</u> nídios amarelos.
H <sub>19</sub>	- micélio amarelo claro, coloração do reverso da colônia clara, conidiação normal, <u>co</u> nídios amarelos.

Os setores deteriorados foram mais facilmente isolados. Alguns, embora tenham sido isolados e purificados, não puderam ser mantidos em estoque por serem muito instáveis, originando setores melhorados cujo crescimento era tão vigoroso que o deteriorado era encoberto.

Na Tabela 4 encontram-se descritas as características morfológicas dos variantes deteriorados.

Durante os repiques sucessivos, em alguns casos, a partir do deteriorado inicial, surgiram novos setores deteriorados; estes, designados como variantes de 1ª ordem,

também foram isolados e purificados (Tabela 5).

TABELA 4. Descrição dos variantes deteriorados derivados da linhagem A.

Variante	Características morfológicas
V <sub>53</sub>	- micélio marrom claro, coloração do reverso da colônia marrom médio, conidiação escassa.
V <sub>54</sub>	- micélio creme, centro da colônia enrugado, coloração do reverso da colônia clara, conidiação escassa.
V <sub>55</sub>	- micélio marrom claro, coloração do reverso da colônia marrom claro, conidiação escassa.
V <sub>56</sub>	- micélio verde acinzentado, coloração do reverso da colônia marrom médio, conidiação média.
V <sub>57</sub>	- micélio creme, centro da colônia enrugado, coloração do reverso da colônia clara, conidiação escassa,
V <sub>58</sub>	- micélio branco acinzentado, coloração do reverso da colônia clara, conidiação normal, conídios brancos.
V <sub>59</sub>	- micélio vermelho escuro, centro da colônia enrugado, coloração do reverso da colônia marrom, conidiação escassa.
V <sub>60</sub>	- micélio marrom, centro da colônia enrugado, coloração do reverso da colônia marrom bem escuro, conidiação média, conídios esverdeados.
V <sub>61</sub>	- micélio creme, centro da colônia enrugado, coloração do reverso da colônia clara, conidiação escassa.



TABELA 5. Descrição dos variantes de 1ª ordem, derivados a partir dos variantes deteriorados originados da linhagem A.

Variante de 1ª ordem	Características morfológicas
V <sub>53.1</sub>	- micélio marrom claro, coloração do reverso da colônia marrom médio, conidiação escassa.
V <sub>54.1</sub>	- micélio creme, coloração do reverso da colônia clara, conidiação escassa.
V <sub>57.1</sub>	- micélio creme, centro da colônia enrugado, coloração do reverso da colônia clara, conidiação escassa.
V <sub>58.1</sub>	- micélio branco acinzentado, coloração do reverso da colônia clara, conidiação normal, conídios brancos.

## 4.2. Análise mitótica

### 4.2.1. Diplóides - cor, grau de instabilidade e tamanho dos conídios

Os diplóides, obtidos através do cruzamento dos variantes deteriorados com a linhagem MSE (branca), apresentaram coloração verde; a exceção foi o diplóide V<sub>53.1</sub>//MSE, que era amarelo.

Os variantes deteriorados V<sub>58</sub> e V<sub>58.1</sub>, pelo fato de serem brancos, foram cruzados com a linhagem testado

ra MSF, com conídios amarelos. O diplóide  $V_{58}$ //MSF apresentou conídios verdes, enquanto no  $V_{58.1}$ //MSF eram amarelos.

Os variantes heterocarióticos, todos cruzados com a linhagem testadora MSE, deram origem a diplóides amarelos, com exceção do  $H_{17v}$ , cujo diplóide era verde.

Observou-se que os diplóides apresentavam grau de instabilidade diferente entre eles, durante o crescimento em meio mínimo. Os diplóides  $V_{56}$ //MSE,  $H_{18}$ //MSE e  $H_{19}$ //MSE não deram origem a setores espontaneamente; os diplóides  $V_{53}$ //MSE,  $V_{55}$ //MSE e  $V_{61}$ //MSE deram origem a setores amarelos em menor frequência que o  $V_{60}$ //MSE e  $H_{17v}$ //MSE.

Além da capacidade de crescer em meio mínimo e da cor, outro critério utilizado para caracterização dos diplóides foi o diâmetro dos conídios. Na Tabela 6 pode-se observar não só o diâmetro de conídios haplóides das linhagens MSE e A, assim como o dos diplóides entre os variantes deteriorados e a linhagem testadora.

A linhagem A, portadora de uma duplicação cromossômica, apresentou conídios ligeiramente maiores que a MSE; o diâmetro médio dos conídios da primeira foi de 3,63  $\mu$  e os da outra de 3,29  $\mu$ .

O diâmetro dos conídios diplóides variou de 4,31  $\mu$  a 5,02  $\mu$ , entre os variantes obtidos a partir da linhagem A; já nos diplóides obtidos a partir do cruzamento de variantes de 1ª ordem, os menores conídios apresentaram 4,18  $\mu$  de diâmetro e os maiores 4,62  $\mu$ .

Observou-se que os conídios de diplóides obtidos pelo cruzamento de dois dos variantes heterocarióticos com a linhagem MSE apresentaram diâmetro sensivelmente menor que os do diplóide A//MSE. Como tal fato poderia ser decorrente do menor tamanho do conídio da linhagem parental, pro-

TABELA 6. Diâmetro dos conídios diplóides, obtidos através de cruzamentos entre os variantes deteriorados originados a partir da linhagem A e a linhagem MSE <sup>a/</sup>.

---

Haplóides:

MSE	=	3,29	μ
A	=	3,63	μ

Diplóides:

A	//MSE	=	4,39	μ
V <sub>53</sub>	//MSE	=	4,60	μ
V <sub>54</sub>	//MSE	=	4,68	μ
V <sub>55</sub>	//MSE	=	4,37	μ
V <sub>56</sub>	//MSE	=	4,37	μ
V <sub>57</sub>	//MSE	=	4,31	μ
V <sub>58</sub>	//MSF	=	4,40	μ
V <sub>59</sub>	//MSE	=	5,02	μ
V <sub>60</sub>	//MSE	=	4,42	μ
V <sub>61</sub>	//MSE	=	4,34	μ
V <sub>53.1</sub>	//MSE	=	4,31	μ
V <sub>54.1</sub>	//MSE	=	4,62	μ
V <sub>57.1</sub>	//MSE	=	4,18	μ
V <sub>58.1</sub>	//MSF	=	4,50	μ

---

<sup>a/</sup> Diâmetro de um conídio; média obtida a partir da medição de 25 conídios.

cedeu-se a medida dos conídios haplóides. Os resultados obtidos mostraram que tanto os conídios do variante heterocariótico H<sub>18</sub> quanto os do H<sub>19</sub> eram menores que os das linhagens A e MSE. Embora o variante H<sub>17a</sub> também apresentasse conídios haplóides menores que os das linhagens A e MSE, o diplóide obtido pelo cruzamento do variante com a linhagem MSE tinha diâmetro semelhante ao do diplóide A//MSE (Tabela 7).

TABELA 7. Diâmetro dos conídios haplóides dos variantes heterocarióticos originados da linhagem A e dos conídios diplóides, obtidos a partir do cruzamento destes variantes com a linhagem MSE <sup>a/</sup>

---

Haplóides:

A	=	3,63 $\mu$
MSE	=	3,29 $\mu$
H <sub>17a</sub>	=	3,08 $\mu$
H <sub>17v</sub>	=	3,85 $\mu$
H <sub>18</sub>	=	3,17 $\mu$
H <sub>19</sub>	=	3,08 $\mu$

Diplóides:

A	//MSE =	4,39 $\mu$
H <sub>17a</sub>	//MSE =	4,42 $\mu$
H <sub>17v</sub>	//MSE =	4,60 $\mu$
H <sub>18</sub>	//MSE =	3,81 $\mu$
H <sub>19</sub>	//MSE =	3,52 $\mu$

---

<sup>a/</sup>: Diâmetro de um conídio; média obtida a partir da medição de 25 conídios.

#### 4.2.2. Haploidização

Para facilitar a obtenção de segregantes mitóticos haplóides, utilizou-se quer solução de Chloroneb ou de Benlate adicionada ao meio completo (item 3.4.3.). Em alguns casos utilizou-se algumas placas com Chloroneb e outras com Benlate, e comparou-se os resultados obtidos.

Obteve-se setores brancos e amarelos, usando-se qualquer um dos fungicidas. Entretanto, os setores amarelos cresciam quase sempre em meio mínimo, mas como o objetivo era analisar segregantes haplóides, apenas os setores brancos foram utilizados.

Não foi possível detectar, durante a haploidização, o aparecimento de setores deteriorados, com exceção dos variantes  $V_{58}$  e  $V_{58.1}$ . Os diplóides amarelos, de um modo geral, produziram setores em menor frequência que os verdes. Não foram obtidos setores a partir dos diplóides  $H_{18}$ //MSE e  $H_{19}$ //MSE, ambos amarelos.

#### 4.2.3. Análise mitótica dos variantes deteriorados originados a partir da linhagem A

Os dados referentes à análise dos segregantes haplóides, obtidos nos diferentes cruzamentos, estão reunidos nas Tabelas 8 e 9. Através destes resultados pôde-se localizar cada um dos determinantes genéticos de deterioração em um grupo de ligação (Tabela 11).

TABELA 8. Análise mitótica dos segregantes brancos de diplóides resultantes dos cruzamentos entre os variantes deteriorados originados da linhagem A e a linhagem MSE.

Grupos de ligação	Marcadores genéticos	Variantes deteriorados//MSE <sup>a/</sup>															
		V <sub>53</sub>		V <sub>54</sub>		V <sub>55</sub>		V <sub>56</sub>		V <sub>57</sub>		V <sub>59</sub>		V <sub>60</sub>		V <sub>61</sub>	
		B	C	B	B	B	B	B	B	B	C	B	C	B	C		
I	pro <sup>+</sup> paba <sup>+</sup>	17	14	15	12	22	25	24	10	16	16	24					
	pro paba	16	8	11	9	0	1	0	6	10	5	8					
II	b/																
III	gal <sup>+</sup>	0	0	13	11	8	7	13	9	14	12	20					
	gal	32	22	13	10	14	19	11	7	12	9	12					
IV	pyro <sup>+</sup>	18	12	0	10	14	11	9	8	20	8	32					
	pyro	15	10	26	11	8	15	15	8	6	13	0					
V	fac <sup>+</sup>	14	4	9	12	9	8	16	9	7	9	14					
	fac	19	18	17	9	13	18	8	7	19	12	18					
VI	s <sup>+</sup>	11	8	10	1	10	0	9	7	19	16	16					
	s	22	14	16	20	12	26	15	9	7	5	16					
VII	nic <sup>+</sup>	9	10	19	9	10	13	10	0	0	9	13					
	nic	24	12	7	12	12	13	14	16	26	12	19					
VIII	ribo <sup>+</sup>	16	10	10	12	14	14	15	7	16	10	19					
	ribo	17	12	16	9	8	12	9	9	10	11	13					
Total		33	22	26	21	22	26	24	16	26	21	32					

<sup>a/</sup> São foram obtidos segregantes normais

<sup>b/</sup> São foram analisados setores brancos (w)

B Haploidização com Benlate

C Haploidização com Chloroneb

TABELA 9. Análise mitótica do variante deteriorado  $V_{58}$  e do variante de 1ª ordem  $V_{58.1}$  <sup>a/</sup>.

Grupos de ligação	Marcadores genéticos	$V_{58}$ //MSF		$V_{58.1}$ //MSF	
		N	D	N	D
I	pro <sup>+</sup> paba <sup>+</sup>	5	1	12	14
	pro paba	1	6	2	2
II	w <sup>+</sup>	6	0	14	0
	w	0	7	0	16
III	gal <sup>+</sup>	3	4	11	6
	gal	3	3	3	10
IV	pyro <sup>+</sup>	4	7	8	8
	pyro	2	0	6	8
V	fac <sup>+</sup>	6	5	7	5
	fac	0	2	7	11
VI	s <sup>+</sup>	2	6	8	7
	s	4	1	6	9
VII	nic <sup>+</sup>	0	7	0	16
	nic	6	0	14	0
VIII	ribo <sup>+</sup>	4	6	11	6
	ribo	2	1	3	10
Total		6	7	14	16

<sup>a/</sup> Ambos cruzados com a linhagem testadora MSF; haploidização com Chloroneb, produzindo setores normais amarelos (N) e deteriorados brancos (D).

#### 4.2.4. Análise mitótica dos variantes deteriorados de 1ª ordem

A partir dos variantes deteriorados de 1ª ordem, foram obtidos segregantes haplóides dos vários cruzamentos e estes foram submetidos à análise mitótica (Tabelas 9 e 10); estes dados permitiram a localização, nos diferentes grupos de ligação, dos determinantes genéticos de deterioração (Tabela 11).

#### 4.2.5. Análise mitótica do variante heterocariótico

Dentre os variantes heterocarióticos, os diplóides  $H_{18}$ //MSE e  $H_{19}$ //MSE não deram origem a setores e deste modo não foi possível efetuar a análise mitótica dos mesmos.

O variante heterocariótico  $H_{17}$ , que deu origem a colônias amarelas e verdes, teve os dois tipos de colônias analisadas.

Através dos dados da Tabela 12 pode-se observar que, entre os segregantes haplóides obtidos a partir dos diplóides  $H_{17a}$ //MSE e  $H_{17v}$ //MSE, não ocorreu qualquer alteração em relação à linhagem A, utilizada como controle.



TABELA 10. Análise mitótica dos segregantes brancos de diplóides resultantes dos cruzamentos entre os variantes de 1ª ordem e a linhagem MSE.

Grupos de ligação	Marcadores genéticos	Variantes de 1ª ordem//MSE <sup>a/</sup>			
		V <sub>53.1</sub>		V <sub>54.1</sub>	
		B	C	B	B
I	pro <sup>+</sup> paba <sup>+</sup>	13	4	7	13
	pro paba	5	2	5	11
II	<u>b/</u>				
III	gal <sup>+</sup>	0	0	9	12
	gal	18	6	3	12
IV	pyro <sup>+</sup>	9	4	4	0
	pyro	9	2	8	24
V	fac <sup>+</sup>	8	4	3	11
	fac	10	2	9	13
VI	s <sup>+</sup>	7	2	0	11
	s	11	4	12	13
VII	nic <sup>+</sup>	11	4	6	13
	nic	7	2	6	11
VIII	ribo <sup>+</sup>	9	5	4	16
	ribo	9	1	8	8
Total		18	6	12	24

a/ Só foram obtidos segregantes normais

b/ Só foram analisados setores brancos (w)

B Haploidização com Benlate

C Haploidização com Chloroneb

TABELA 11. Localização dos determinantes genéticos de deterioração nos grupos de ligação.

Determinantes de deterioração	Grupo de ligação
V <sub>53</sub>	III
V <sub>54</sub>	IV
V <sub>55</sub>	VI
V <sub>56</sub>	I
V <sub>57</sub>	VI
V <sub>58</sub>	VII
V <sub>59</sub>	I
V <sub>60</sub>	VII
V <sub>61</sub>	II
V <sub>53,1</sub>	III
V <sub>54,1</sub>	VI
V <sub>57,1</sub>	IV
V <sub>58,1</sub>	VII

TABELA 12; Análise mitótica das linhagens amarela (a) e verde (v) isoladas a partir do variante heterocariótico H<sub>17</sub> e da linhagem A, utilizada como controle a/.

Grupos de ligação	Marcadores genéticos	H <sub>17a</sub> //MSE	H <sub>17v</sub> //MSE	A//MSE
I	pro <sup>+</sup> paba <sup>+</sup>	11	15	13
	pro paba	12	8	12
II	<u>b/</u>			
III	gal <sup>+</sup>	14	11	14
	gal	9	12	11
IV	pyro <sup>+</sup>	7	10	12
	pyro	16	13	13
V	fac <sup>+</sup>	13	6	10
	fac	10	17	15
VI	s <sup>+</sup>	5	9	16
	s	18	14	9
VII	nic <sup>+</sup>	6	13	14
	nic	17	10	11
VIII	ribo <sup>+</sup>	5	8	12
	ribo	18	15	13
Total		23	23	25

a/ Só foram obtidos segregantes normais; para a haploidização foi utilizado o Benlate.

b/ Só foram analisados os segregantes brancos (w).

### 4.3. Análise meiótica

#### 4.3.1. Segregação meiótica

Os variantes deteriorados obtidos foram submetidos à análise meiótica (item 3.4.4.). Os dados da segregação meiótica, obtidos a partir do cruzamento dos variantes deteriorados com a linhagem testadora MSE, encontram-se na Tabela 13. A proporção esperada de segregantes normais e deteriorados era de 1:1; aplicou-se o teste do  $X^2$  aos resultados obtidos, para detectar se os desvios encontrados ocorreram ao acaso. Dentre os segregantes normais incluíam-se aqueles de coloração branca, amarela e verde, na proporção de 2:1:1.

Observou-se que nos cruzamentos dos variantes deteriorados  $V_{56}$ ,  $V_{57}$ ,  $V_{60}$  e  $V_{61}$  com a linhagem MSE, os desvios obtidos em relação à proporção 1:1 eram significativos; em todos os casos o número de segregantes deteriorados era bem menor que o de normais (Tabela 13). Por outro lado, se o fenótipo deteriorado fosse controlado por dois pares de genes, a proporção esperada seria de 3 normais:1 deteriorado. Foram obtidos desvios significativos ao nível de 1% de probabilidade, quando aplicou-se o teste do  $X^2$  para a proporção 3:1.

Os variantes deteriorados  $V_{58}$  e  $V_{58.1}$ , por apresentarem coloração branco acinzentada, foram cruzados com a linhagem testadora MSF, cujos conídios são amarelos. No cruzamento  $V_{58}$  x MSF foram obtidos segregantes deteriorados e normais (amarelos e verdes) na proporção 1:1, mas o número de amarelos era bem maior que o de verdes. Com relação ao cruzamento  $V_{58.1}$  x MSF, foram obtidos segregantes deteriorados e normais também na proporção 1:1, mas todos os segregantes normais eram amarelos (Tabela 14).

TABELA 13. Segregantes obtidos, através do ciclo sexual, pelo cruzamento dos variantes deteriorados com a linhagem MSE.

Cruzamento	Segregantes		Total	$\chi^2$ a/
	Normais	Deteriorados		
V <sub>53</sub> x MSE	67	66	133	0,01ns
V <sub>54</sub> x MSE	99	82	181	1,60ns
V <sub>55</sub> x MSE	89	79	168	0,60ns
V <sub>56</sub> x MSE	94	65	159	5,29*
V <sub>57</sub> x MSE	134	88	222	9,53**
V <sub>59</sub> x MSE	234	217	451	0,64ns
V <sub>60</sub> x MSE	171	90	261	25,14**
V <sub>61</sub> x MSE	85	48	133	10,29**
V <sub>53.1</sub> x MSE	175	156	331	0,94ns
V <sub>54.1</sub> x MSE	65	48	113	2,56ns
V <sub>57.1</sub> x MSE	55	38	93	3,11ns

a/ valores de  $\chi^2$ , para a proporção 1:1.

TABELA 14, Segregantes obtidos, através do ciclo sexual, pelo cruzamento de linhagens deterioradas com a linhagem testadora MSF.

Cruzamento	Segregantes normais		Segregantes deteriorados	Total	X <sup>2</sup>	a/
	Amarelos	Verdes				
V <sub>58</sub> x MSF	65	30	93	188	0,02ns	
V <sub>58.1</sub> x MSF	172	-	186	358	0,55ns	

a/ valores de X<sup>2</sup>, para a proporção 1:1.

Com relação aos variantes heterocarióticos, também cruzados com a linhagem MSE, os resultados obtidos encontram-se na Tabela 15. Dentre os segregantes destes cruzamentos sô surgiram colônias normais. Os variantes heterocarióticos, quando amarelos, deram origem a segregantes brancos e amarelos, na proporção de 1:1. No caso do variante verde, foram obtidos segregantes brancos, amarelos e verdes, na proporção esperada de 2:1:1.

TABELA 15. Segregantes obtidos, através do ciclo sexual, pelo cruzamento dos variantes heterocarióticos com a linhagem MSE.

Cruzamento	Segregantes normais			Total	$\chi^2$
	Brancos	Amarelos	Verdes		
H <sub>17a</sub> x MSE	157	144	-	301	0,56ns <sup>a/</sup>
H <sub>17v</sub> x MSE	35	16	10	61	2,51ns <sup>b/</sup>
H <sub>18</sub> x MSE	131	126	-	257	0,10ns <sup>a/</sup>
H <sub>19</sub> x MSE	61	51	-	112	2,23ns <sup>a/</sup>

<sup>a/</sup> valor de  $\chi^2$  para a proporção 1:1

<sup>b/</sup> valor de  $\chi^2$  para a proporção 2:1:1.

#### 4.3.2. Localização dos determinantes genéticos de deterioração nos grupos de ligação

Para detectar se os determinantes de deterioração estavam ou não ligados às marcas da linhagem testadora procedeu-se a análise meiótica, conforme descrito no item 3.

4.4. Embora pela análise mitótica já se soubesse o grupo de ligação em que cada um dos determinantes de deterioração se localizava, procedeu-se a análise meiótica para todas as marcas envolvidas no cruzamento, à exceção de adenina e biotina; deste modo foi possível confirmar que todos os alelos estavam segregando na proporção esperada de 1:1.

Nas Tabelas 16 a 27 encontram-se os dados obtidos para a segregação entre a marca da linhagem testadora e o determinante de deterioração, e também a frequência de recombinação entre estas marcas. Na prática, considera-se que os marcadores genéticos estão ligados se a frequência de

recombinação entre eles não for superior a 40%. Dentre os variantes deteriorados aqui estudados, apenas o V<sub>53</sub>, o V<sub>53.1</sub>, o V<sub>56</sub> e o V<sub>57.1</sub> apresentaram ligação entre o determinante genético de deterioração e a marca da linhagem testadora.

No caso dos variantes deteriorados cujos determinantes genéticos de deterioração estão localizados no grupo de ligação I, a partir dos dados da segregação meiótica, pode ser feito um teste de três pontos; deste modo, obteve-se a ordem dos genes, tanto para o variante V<sub>56</sub> quanto para o V<sub>59</sub> (Tabelas 28 e 29).

TABELA 16. Análise meiótica do cruzamento entre o variante deteriorado V<sub>53</sub> e a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de s	
		Deterioradas	Não deterioradas	recombinação	
III	gal <sup>+</sup>	47	9	13,46	± 3,30%
	gal	5	43		

TABELA 17. Análise meiótica do cruzamento entre o variante deteriorado V<sub>54</sub> e a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de s	
		Deterioradas	Não deterioradas	recombinação	
IV	pyro <sup>+</sup>	26	20	41,41	± 4,94%
	pyro	21	32		



TABELA 18. Análise meiótica do cruzamento entre o variante deteriorado V<sub>55</sub> e a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
VI	s <sup>+</sup>	26	32	54,45	± 4,96%
	s	23	20		

TABELA 19. Análise meiótica do cruzamento entre o variante deteriorado V<sub>56</sub> e a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
I	pro <sup>+</sup>	24	44	30,76	± 4,57%
	pro	28	8		
	paba <sup>+</sup>	23	43	30,76	± 4,57%
	paba	29	9		

TABELA 20. Análise meiótica do cruzamento entre o variante deteriorado V<sub>57</sub> e a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
VI	s <sup>+</sup>	31	35	52,48	± 4,97%
	s	18	17		

TABELA 21. Análise meiótica do cruzamento entre o variante deteriorado V<sub>58</sub> e a linhagem MSF.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
VII	nic <sup>+</sup>	13	11	46,15	± 6,91%
	nic	13	15		

TABELA 22. Análise meiótica do cruzamento entre o variante deteriorado V<sub>59</sub> e a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
I	pro <sup>+</sup>	19	28	42,70	± 5,04%
	pro	27	22		
	paba <sup>+</sup>	20	29	42,70	± 5,04%
	paba	26	21		

TABELA 23. Análise meiótica do cruzamento entre o variante deteriorado V<sub>60</sub> e a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
VII	nic <sup>+</sup>	32	30	48,07	± 4,90%
	nic	20	22		

TABELA 24. Análise meiótica do cruzamento entre o variante deteriorado V<sub>53.1</sub> e a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
III	gal <sup>+</sup>	45	6	12,50	± 3,24%
	gal	7	46		

TABELA 25. Análise meiótica do cruzamento entre o variante deteriorado V<sub>54.1</sub> e a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
VI	s <sup>+</sup>	21	31	52,80	± 5,29%
	s	16	21		

TABELA 26. Análise meiótica do cruzamento entre o variante deteriorado V<sub>57.1</sub> e a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
IV	pyro <sup>+</sup>	25	17	37,50	± 4,93%
	pyro	19	35		

TABELA 27. Análise meiótica do cruzamento entre o variante deteriorado V<sub>58.1</sub> e a linhagem MSF.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Frequência de recombinação	s
		Deterioradas	Não deterioradas		
VII	nic <sup>+</sup>	26	27	50,96	± 4,90%
	nic	26	25		

TABELA 28. Teste de três pontos  $proA_1$ ,  $pabaA_6$ ,  $v_{56}$ 

Combinações <sup>a/</sup>			Nº de colônias
$proA_1$	$pabaA_6$	$v_{56}$	
-	-	-	28
+	+	-	12
+	-	-	1
-	+	-	0
Total			41

<sup>a/</sup> Somente colônias  $v_{56}$  foram analisadas

Frequências de recombinação:

$$proA_1 - pabaA_6 = 2,44 \pm 2,41\%$$

$$proA_1 - v_{56} = 31,71 \pm 7,27\%$$

$$pabaA_6 - v_{56} = 29,27 \pm 7,11\%$$

Ordem dos genes:

$$proA_1 - paba_6 - v_{56}$$

TABELA 29. Teste de três pontos  $v_{59}$ ,  $proA_1$ ,  $pabaA_6$ .

Combinacões <sup>a/</sup>			Nº de colônias
$v_{59}$	$proA_1$	$pabaA_6$	
-	-	-	26
-	+	+	19
-	+	-	0
-	-	+	1
Total			46

<sup>a/</sup> Somente colônias  $V_{59}$  foram analisadas.

Frequências de recombinação:

$$proA_1 - pabaA_6 = 2,17 \pm 2,15\%$$

$$proA_1 - v_{59} = 41,30 \pm 7,26\%$$

$$pabaA_1 - v_{59} = 43,48 \pm 7,31\%$$

Ordem dos genes:

$$v_{59} - proA_1 - pabaA_6$$

### 4.3.3. Análise meiótica dos variantes heterocarióticos

Com relação aos variantes heterocarióticos, procedeu-se a análise meiótica para todas as marcas envolvidas no cruzamento, à exceção de adenina e biotina.

O variante heterocariótico H<sub>17</sub>, que deu origem a colônias amarelas (H<sub>17a</sub>) e verdes (H<sub>17v</sub>), teve os dois tipos de colônias cruzadas com a linhagem MSE; foram obtidos segregantes meióticos que, quando ensaiados, demonstraram a segregação 1:1 das marcas dos diferentes grupos de ligação (Tabelas 30 e 31).

Os variantes heterocarióticos H<sub>18</sub> e H<sub>19</sub>, que não puderam ser submetidos à análise mitótica já que os diplóides não deram origem a setores, também foram cruzados com a linhagem MSE. Procedeu-se a análise meiótica e as marcas genéticas em todos os grupos de ligação segregaram na proporção 1:1 (Tabelas 32 e 33).

TABELA 30. Análise meiótica do variante heterocariótico H<sub>17a</sub>, originado a partir da linhagem A, cruzado com a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Total	X <sup>2</sup> <u>a/</u>
		Branças	Amarelas		
I	pro <sup>+</sup>	14	13	27	0,08ns
	pro	12	13	25	
	paba <sup>+</sup>	15	14	29	0,69ns
	paba	11	12	23	
III	gal <sup>+</sup>	9	14	23	0,69ns
	gal	17	12	29	
IV	pyro <sup>+</sup>	15	13	28	0,31ns
	pyro	11	13	24	
V	fac <sup>+</sup>	8	12	20	2,77ns
	fac	18	14	32	
VI	s <sup>+</sup>	14	16	30	2,77ns
	s	12	10	22	
VII	nic <sup>+</sup>	15	10	25	0,08ns
	nic	11	16	27	
VIII	ribo <sup>+</sup>	13	15	28	0,31ns
	ribo	13	11	24	

a/ valores de X<sup>2</sup>, para a proporção 1:1.



TABELA 31. Análise meiótica do variante heterocariótico H<sub>17v</sub>, originado a partir da linhagem A, cruzado com a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Total	X <sup>2</sup> <u>a/</u>
		Branças	Amarelas/Verdes		
I	pro <sup>+</sup>	14	11	25	0,19ns
	pro	12	10	22	
	paba <sup>+</sup>	13	12	25	0,19ns
	paba	13	9	22	
III	gal <sup>+</sup>	13	9	22	0,19ns
	gal	13	12	25	
IV	pyro <sup>+</sup>	10	11	21	0,53ns
	pyro	16	10	26	
V	fac <sup>+</sup>	14	9	23	0,02ns
	fac	12	12	24	
VI	s <sup>+</sup>	14	10	24	0,02ns
	s	12	11	23	
VII	nic <sup>+</sup>	13	7	20	1,04ns
	nic	13	14	27	
VIII	ribo <sup>+</sup>	11	9	20	1,04ns
	ribo	15	12	27	

a/ valores de X<sup>2</sup>, para a proporção 1:1.

TABELA 32. Análise meiótica do variante heterocariótico H<sub>18</sub>, originado a partir da linhagem A, cruzado com a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Total	X <sup>2</sup> a/
		Branças	Amarelas		
I	pro <sup>+</sup>	14	10	24	0,31ns
	pro	12	16	28	
	paba <sup>+</sup>	14	12	26	0,00ns
	paba	12	14	26	
III	gal <sup>+</sup>	9	15	24	0,31ns
	gal	17	11	28	
IV	pyro <sup>+</sup>	11	15	26	0,00ns
	pyro	15	11	26	
V	fac <sup>+</sup>	10	14	24	0,31ns
	fac	16	12	28	
VI	s <sup>+</sup>	13	15	28	0,31ns
	s	13	11	24	
VII	nic <sup>+</sup>	13	12	25	0,08ns
	nic	13	14	27	
VIII	ribo <sup>+</sup>	13	12	25	0,08ns
	ribo	13	14	27	

a/ valores de X<sup>2</sup>, para a proporção 1:1.

TABELA 33. Análise meiótica do variante heterocariótico H<sub>19</sub>, originado a partir da linhagem A, cruzado com a linhagem MSE.

Grupo de ligação	Marcador genético	Colônias		Total	X <sup>2</sup> a/
		Branças	Amarelas		
I	pro <sup>+</sup>	15	8	23	0,08ns
	pro	7	18	25	
	paba <sup>+</sup>	16	9	25	0,08ns
	paba	6	17	23	
III	gal <sup>+</sup>	11	11	22	0,33ns
	gal	11	15	26	
IV	pyro <sup>+</sup>	12	15	27	0,75ns
	pyro	10	11	21	
V	fac <sup>+</sup>	12	17	29	2,08ns
	fac	10	9	19	
VI	s <sup>+</sup>	12	13	25	0,08ns
	s	10	13	23	
VII	nic <sup>+</sup>	14	15	29	2,08ns
	nic	8	11	19	
VIII	ribo <sup>+</sup>	9	16	25	0,08ns
	ribo	13	10	23	

a/ valores de X<sup>2</sup>, para a proporção 1:1.

#### 4.4. Testes de alelismo

Os variantes e segregantes deteriorados utilizados nos testes de alelismo, dos diferentes grupos de ligação, estão listados na Tabela 34.

Na Tabela 35 estão reunidos os resultados dos testes de alelismo para os diferentes grupos de ligação. A proporção 3:1 foi encontrada em vários cruzamentos, mas em outros os resultados se ajustavam à proporção 2:1.

##### 4.4.1. Grupo de ligação I

Dentre os variantes deteriorados isolados, o  $V_{56}$  e o  $V_{59}$  têm seus determinantes genéticos de deterioração localizados no grupo de ligação I. O  $V_{56}$  apresenta ligação genética com as marcas  $proA_1$  e  $pabaA_6$ .

Através da análise meiótica, a partir do cruzamento do  $V_{56}$  com um segregante do  $V_{59}$ , foram obtidos segregantes normais e deteriorados, podendo-se distinguir fenotipicamente três tipos diferentes de deteriorados. Os dados obtidos, quando submetidos ao teste do  $X^2$  para a proporção 3 deteriorados : 1 normal, mostraram um desvio significativo ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 35).

O variante deteriorado  $V_{56}$  foi cruzado com segregantes dos variantes deteriorados  $V_{36}$  e  $V_{46}$ . Em ambos os casos, embora várias tentativas para tais cruzamentos tenham sido feitas, obteve-se apenas cleistotécios autofecundados.

O variante deteriorado  $V_{59}$  foi cruzado não só com os variantes deteriorados  $V_{36}$  e  $V_{46}$ , mas também com o  $V_{28}$ . Nos cruzamentos do  $V_{59}$  com o  $V_{28}$  e o  $V_{46}$  encontrou-se segregantes normais e deteriorados (Tabela 35). No cruzamento com o  $V_{28}$  obteve-se a proporção de 3:1, sendo possível dis

TABELA 34. Variantes e segregantes utilizados nos testes de alelismo, nos diferentes grupos de ligação.

Grupo de ligação	Variantes
I	V <sub>56</sub> x V <sub>59</sub> (segr. <i>galA</i> <sub>1</sub> ; <i>nicB</i> <sub>8</sub> ; <i>riboB</i> <sub>2</sub> )
	V <sub>56</sub> x V <sub>36</sub> (segr. <i>galA</i> <sub>1</sub> ; <i>nicB</i> <sub>8</sub> ; <i>riboB</i> <sub>2</sub> )
	V <sub>56</sub> x V <sub>46</sub> (segr. <i>wA</i> <sub>3</sub> ; <i>sB</i> <sub>3</sub> )
	V <sub>59</sub> (segr. <i>galA</i> <sub>1</sub> ; <i>riboB</i> <sub>2</sub> ) x V <sub>28</sub>
	V <sub>59</sub> x V <sub>36</sub> (segr. <i>galA</i> <sub>1</sub> ; <i>nicB</i> <sub>8</sub> ; <i>riboB</i> <sub>2</sub> )
	V <sub>59</sub> (segr. <i>galA</i> <sub>1</sub> ; <i>riboB</i> <sub>2</sub> ) x V <sub>46</sub>
III	V <sub>53</sub> (segr. <i>galA</i> <sub>1</sub> ; <i>nicB</i> <sub>8</sub> ) x V <sub>9</sub>
IV	V <sub>54</sub> (segr. <i>pyroA</i> <sub>4</sub> ; <i>nicB</i> <sub>8</sub> ; <i>riboB</i> <sub>2</sub> ) x V <sub>8</sub>
VI	V <sub>55</sub> x V <sub>57</sub> (segr. <i>sB</i> <sub>3</sub> ; <i>nicB</i> <sub>8</sub> )
	V <sub>55</sub> (segr. <i>pyroA</i> <sub>4</sub> ; <i>sB</i> <sub>3</sub> ) x V <sub>16</sub>
	V <sub>57</sub> (segr. <i>sB</i> <sub>3</sub> ; <i>nicB</i> <sub>8</sub> ) x V <sub>16</sub>
VII	V <sub>58</sub> (segr. <i>sB</i> <sub>3</sub> ; <i>nicB</i> <sub>8</sub> ) x V <sub>60</sub>
	V <sub>58</sub> (segr. <i>sB</i> <sub>3</sub> ; <i>nicB</i> <sub>8</sub> ) x V <sub>10</sub>
	V <sub>58</sub> (segr. <i>sB</i> <sub>3</sub> ; <i>nicB</i> <sub>8</sub> ; <i>riboB</i> <sub>2</sub> ) x V <sub>17</sub>
	V <sub>60</sub> (segr. <i>nicB</i> <sub>8</sub> ; ) x V <sub>10</sub>
	V <sub>60</sub> (segr. <i>nicB</i> <sub>8</sub> ; ) x V <sub>17</sub>

TABELA 35. Testes de alelismo.

Cruzamento	Segregantes			Proporção D : N	X <sup>2</sup>
	Deteriorados	Normais	Total		
V <sub>56</sub> x V <sub>59</sub>	180	41	221	3:1	4,90*
V <sub>56</sub> x V <sub>36</sub> <sup>a/</sup>	-	-	-	-	-
V <sub>56</sub> x V <sub>46</sub> <sup>a/</sup>	-	-	-	-	-
V <sub>59</sub> x V <sub>28</sub>	169	43	212	3:1	2,52ns
V <sub>59</sub> x V <sub>36</sub>	185	0	185	-	-
V <sub>59</sub> x V <sub>46</sub>	131	85	216	3:1 2:1	23,73** 3,52ns
V <sub>53</sub> x V <sub>9</sub>	137	63	200	3:1 2:1	4,51* 0,30ns
V <sub>54</sub> x V <sub>8</sub>	87	158	245		
V <sub>55</sub> x V <sub>57</sub>	91	60	151	3:1 2:1	17,49** 2,78ns
V <sub>55</sub> x V <sub>16</sub>	151	81	232	3:1 2:1	12,16** 0,26ns
V <sub>57</sub> x V <sub>16</sub>	92	74	166	3:1 2:1	33,94** 9,45**
V <sub>58</sub> x V <sub>60</sub>	124	74	198	3:1 2:1	16,17** 1,45ns
V <sub>58</sub> x V <sub>10</sub>	117	47	164	3:1	1,17ns
V <sub>58</sub> x V <sub>17</sub>	208	0	208	-	-
V <sub>60</sub> x V <sub>10</sub>	113	30	143	3:1	1,23ns
V <sub>60</sub> x V <sub>17</sub>	196	73	269	3:1	0,66ns

<sup>a/</sup> nestes cruzamentos, todos os cleistotécios analisados eram autofecundados.

tinguir dois tipos de deteriorados; já no cruzamento com o  $V_{46}$  observou-se colônias deterioradas de um só tipo e o  $\chi^2$  encontrado para a proporção 3:1 apresentou um desvio significativo.

No cruzamento do  $V_{59}$  com o  $V_{36}$  obteve-se apenas colônias deterioradas; estas apresentavam segregação 1:1 para as marcas envolvidas no cruzamento, demonstrando que não eram provenientes de cleistotécios autofecundados. Foi possível separar as 185 colônias deterioradas, quanto a aparência, em dois grupos: 92 eram semelhantes ao  $V_{36}$  e 93 ao  $V_{59}$ .

#### 4.4.2. Grupo de ligação III

O determinante genético de deterioração do  $V_{53}$  foi mapeado no grupo de ligação III, estando ligado à marca  $galA_1$ .

O variante deteriorado  $V_{53}$  foi cruzado com o  $V_9$  e, através da análise meiótica, obteve-se segregantes deteriorados e normais; aplicando-se o  $\chi^2$  para a proporção 3:1 este foi significativo ao nível de 5%. Para a proporção 2:1, o valor do  $\chi^2$  não foi significativo (Tabela 35).

#### 4.4.3. Grupo de ligação IV

Neste grupo de ligação localiza-se o variante deteriorado  $V_{54}$ . Um segregante dele foi cruzado com o  $V_8$ , obtendo-se segregantes meióticos normais e deteriorados (Tabela 35). Contrariando a expectativa, os segregantes normais ocorreram com frequência quase duas vezes maior que os deteriorados. O cruzamento foi repetido três vezes e os resulta

dos apresentaram sempre a mesma proporção - 1 amarelo normal : 1 verde normal : 1 deteriorado.

#### 4.4.4. Grupo de ligação VI

Dentre os variantes deteriorados isolados, o  $V_{55}$  e o  $V_{57}$  têm seus determinantes genéticos de deterioração localizados no grupo de ligação VI.

O  $V_{55}$  foi cruzado com um segregante do  $V_{57}$ ; obteve-se segregantes normais e deteriorados (Tabela 35).

Segregantes dos deteriorados  $V_{55}$  e  $V_{57}$  foram cruzados com o  $V_{16}$ . Em ambos os cruzamentos foram obtidos ascósporos normais e deteriorados, indicando que nenhum deles é alelo do  $V_{16}$  (Tabela 35).

No cruzamento do segregante do  $V_{57}$  com o  $V_{16}$ , o número de segregantes deteriorados e normais, quando testado quer para a proporção 3:1 ou para 2:1, apresentou desvio significativo ao nível de 1% de probabilidade.

#### 4.4.5. Grupo de ligação VII

Os determinantes genéticos de deterioração do  $V_{58}$  e  $V_{60}$  foram mapeados no grupo de ligação VII.

Um segregante do  $V_{58}$  foi cruzado com o  $V_{60}$ ; obteve-se segregantes deteriorados e normais na proporção 2:1 (Tabela 35).

Um segregante do  $V_{58}$  foi cruzado com os variantes deteriorados  $V_{10}$  e  $V_{17}$ . No primeiro cruzamento obteve-se segregantes na proporção de 3 deteriorados : 1 normal (Tabela 35). Já no cruzamento dos variantes deteriorados



V<sub>58</sub> e V<sub>17</sub> obteve-se apenas segregantes deteriorados.

Um segregante do V<sub>60</sub> foi cruzado com o V<sub>10</sub> e com o V<sub>17</sub>. Em ambos os cruzamentos obteve-se segregantes deteriorados e normais, na proporção 3:1 (Tabela 35).

#### 4.5. Influência da temperatura e do "background" genético na instabilidade mitótica

Durante o isolamento de variantes deteriorados estudados neste trabalho, originados a partir da linhagem A, fortuitamente observou-se que as placas inoculadas por ponto, de acordo com a prateleira em que eram incubadas, produziam maior ou menor número de setores. A partir desta constatação, quando os segregantes com os diferentes "backgrounds" genéticos foram obtidos, utilizou-se para os ensaios também as diferentes prateleiras de um incubador regulado para 37°C, além dos três incubadores com as temperaturas de 30°, 37° e 40°C.

##### 4.5.1. Experimento I: linhagens com diferentes "backgrounds" genéticos crescidas simultaneamente em diferentes prateleiras do mesmo incubador

Utilizando-se um incubador regulado para a temperatura de 37°C, foram realizados três ensaios simultaneamente, colocando-se cada um deles em uma prateleira. A prateleira mais alta foi designada de A e a mais baixa (próxima à resistência) de C. Em todos os ensaios utilizou-se as linhagens de número 1 a 8 (item 3.7.). Na Tabela 36 está discriminado o número total de setores obtidos, em cada uma das placas, nos três ensaios. Na Tabela 37 estão agrupados os dados, referentes a cada tipo de setor, obtidos em cada um dos ensaios; observou-se que o número de placas com setor

e o número total de setores aumentou da prateleira A para a prateleira C. Os setores amarelos são os mais frequentes em todos os ensaios e seu número aumenta da prateleira A para a C; já os setores verdes têm sua frequência sensivelmente diminuída da prateleira A para a C.

O número de setores obtidos por placa (Tabela 36) foi transformado utilizando-se a fórmula  $\sqrt{x + 1/2}$  e os dados transformados, de cada um dos ensaios, foram submetidos à análise da variância; como nenhum dos valores de quadrado médio do resíduo foi quatro vezes superior a qualquer outro ( $Q.M._A = 0,1087$ ;  $Q.M._B = 0,1254$ ;  $Q.M._C = 0,2131$ ), pôde-se fazer a análise conjunta da variância para os dados obtidos nas três prateleiras, sem a correção dos graus de liberdade (Tabela 38). Como os valores de F foram significativos para as fontes de variação linhagens, prateleiras e repetições/prateleiras, utilizou-se o teste de Tukey para detectar os contrastes que diferiam entre si (Tabela 39). Através dos valores obtidos para  $\Delta$  pode-se constatar que não há diferença significativa entre o número de setores produzidos nas prateleiras A e B, mas os valores para estas duas são diferentes daqueles obtidos na prateleira C; com relação às diferentes linhagens, observou-se que a maioria delas difere da linhagem 6, que requer tiossulfato, inclusive a linhagem 1 - que vem a ser a linhagem A.

#### 4.5.2. Experimento II: linhagens com diferentes "backgrounds" genéticos crescidas nas temperaturas de 30<sup>o</sup>, 37<sup>o</sup> e 40<sup>o</sup>C.

Nestes ensaios foram utilizadas as linhagens 1 a 8 (item 3.7.), incubadas nas temperaturas citadas. Na Tabela 40 está discriminado o número total de setores obtidos, em cada uma das placas nos ensaios realizados nas três

temperaturas. Os dados referentes ao número de placas com setor e aos diferentes tipos de setores, obtidos em cada uma das temperaturas de incubação utilizadas, estão reunidos na Tabela 41. Pode-se observar que, na temperatura mais alta, em quase todas as placas ocorreu a formação de setores; da mesma forma que no experimento I, onde as variações de temperatura de uma prateleira para outra eram menores, aqui também o número de setores cresceu nitidamente com o aumento da temperatura. Os setores amarelos são os mais frequentes em todos os ensaios. A frequência dos setores verdes diminuiu consideravelmente com o aumento da temperatura; à temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ , sua frequência é praticamente o triplo daquelas encontradas a  $37^{\circ}$  e  $40^{\circ}\text{C}$ .

A partir dos dados transformados do número de setores observados em cada placa nos três ensaios, foi feita a análise da variância. Os valores dos quadrados médios dos resíduos, para as três temperaturas, foram os seguintes:  $\text{Q.M.}_{30^{\circ}\text{C}} = 0,1350$ ;  $\text{Q.M.}_{37^{\circ}\text{C}} = 0,2841$  e  $\text{Q.M.}_{40^{\circ}\text{C}} = 0,2581$ . Como nenhum desses valores era quatro vezes maior que qualquer outro, procedeu-se a análise conjunta dos dados (Tabela 42). Os valores de F foram significativos, quer a nível de 5% ou 1%, para todas as fontes de variação. O teste de Tukey foi empregado para determinar as médias que diferiam entre si, tanto para os resultados obtidos nas três temperaturas quanto para os das diferentes linhagens e para a interação linhagem versus incubadores (Tabela 43). Os valores de  $\Delta$  mostraram que não existe diferença significativa entre o número de setores produzidos a  $30^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C}$ , mas a média obtida a  $40^{\circ}\text{C}$  é significativa em relação às duas anteriores; entre as linhagens, embora ocorra diferença entre elas, não foi detectada diferença entre nenhuma delas com relação à linhagem 1 (linhagem A). Quando analisamos a interação linhagem versus incubador, observamos que a  $30^{\circ}\text{C}$  não ocorre diferença entre as linhagens, embora isto aconteça a  $37^{\circ}$  e  $40^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5.3. Experimento III: ensaios para observação da instabilidade na linhagem A, nas linhagens deficientes para a síntese de piridoxina e nas incapazes de utilizar galactose

Quando da análise dos dados dos experimentos I e II, observou-se que a linhagem 5 (deficiente para a síntese de piridoxina) produziu setores numa frequência bem baixa, quando comparada com as outras; já a linhagem 3 (incapaz de utilizar galactose como única fonte de carbono), em ambos os experimentos produziu setores com uma frequência acima da média. A partir destes dados, procurou-se analisar outros segregantes meióticos que apresentassem as marcas em questão, para detectar se a frequência de setores estava associada com a marca presente. Deste modo, nos ensaios do experimento III, foram utilizadas as linhagens 1, 3, 5 e 9 a 12, incubadas nas temperaturas de 30°, 37° e 40°C.

Na Tabela 44 pode ser observado o número de setores produzidos por placa, por cada uma das linhagens. Na Tabela 45 estão reunidos os dados referentes ao número de setores de cada tipo produzido por ensaio, assim como o número total de placas que produziu setores em cada ensaio. Pode-se observar que o número de placas com setor aumentou com a temperatura. Em todas as temperaturas os setores amarelos foram os mais frequentes, podendo-se também observar uma queda na frequência dos setores verdes, conforme aumentava a temperatura.

Para a análise da variância utilizou-se a transformação dos números da Tabela 44. Os valores dos quadrados médios dos resíduos foram 0,1826; 0,2553 e 0,2274, para as temperaturas de 30°, 37° e 40°C, respectivamente. Já que estes dados assim o permitiam, realizou-se a análise conjunta (Tabela 46). Dentre as fontes de variação estudadas, apenas foi significativo o valor de F para os dados obtidos

nas diferentes temperaturas. O teste de Tukey foi empregado para a detecção dos contrastes que diferiam entre si; constatou-se que as médias obtidas em cada uma das temperaturas diferiam entre si (Tabela 47).

#### 4.5.4. Experimento IV: instabilidade na linhagem A e em oito linhagens que requerem tiossulfato

A partir dos resultados obtidos nos experimentos I e II, ficou patente que, quando se analisava a média de setores obtida nos três ensaios de cada um dos experimentos, a linhagem 6 (que necessita de tiossulfato) era a que apresentava a menor média. Para observar se era apenas este segregante que apresentava este comportamento, instalou-se o experimento IV. Nele foram utilizadas as linhagens 1, 6 e 13 a 19, incubadas nas temperaturas de 30°, 37° e 40°C. Uma das linhagens era a A e, dentre as outras oito, três necessitavam apenas de tiossulfato enquanto cinco apresentavam ainda mais um marcador genético da linhagem MSE, além daqueles da linhagem A. A colocação de mais um marcador genético era para observar se sua presença aumentaria a frequência de setores, mesmo associado com a marca tiossulfato.

Os dados referentes ao número total de setores produzidos por cada uma das placas, nos diferentes ensaios, estão reunidos na Tabela 48. Na Tabela 49 estão discriminados os números de setores por tipo e o número de placas com setor, em cada um dos ensaios. Na temperatura de 30°C, a frequência de setores verdes foi maior do que a de amarelos; mas, ainda assim, quando comparamos os três ensaios, a frequência dos setores amarelos aumenta com a temperatura, enquanto a dos verdes diminui. A frequência de setores por placa mostrou uma relação direta com o aumento da temperatura.

Realizou-se a análise da variância para os dados transformados da Tabela 48. Como nenhum dos valores de quadrado médio do resíduo foi quatro vezes superior a qualquer outro ( $Q.M._{30^{\circ}C} = 0,1925$ ;  $Q.M._{37^{\circ}C} = 0,2003$ ;  $Q.M._{40^{\circ}C} = 0,2155$ ), pôde-se fazer a análise conjunta da variância, para os dados obtidos nas três temperaturas (Tabela 50). Os valores de F foram significativos apenas para as fontes de variação linhagens e incubadores; utilizou-se o teste de Tukey para detectar os contrastes que diferiam entre si (Tabela 51). Obteve-se os valores de  $\Delta$  e pôde-se constatar que não houve diferença significativa entre a média de setores produzidos nas temperaturas de  $37^{\circ}C$  e  $40^{\circ}C$ , mas ambas foram significativamente diferentes daquela obtida à  $30^{\circ}C$ . Entre as linhagens, embora ocorressem diferenças entre algumas delas, não foi encontrada diferença na média de setores produzidos pela linhagem A em relação a qualquer das outras linhagens utilizadas no experimento. Não foi possível discriminar, pela diferença na produção de setores, as linhagens que apresentavam apenas a marca tiosulfato daquelas que apresentavam mais uma marca.

TABELA 36. Número total de setores obtidos, a partir de linhagens com diferentes "backgrounds" genéticos, em cada uma das placas, nas diferentes prateleiras de um incubador regulado para a temperatura de 37°C (Experimento I).

Prateleira	Repetição nº	Linhagem							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A	1	0	2	●	2	0	0	1	0
	2	0	2	1	1	2	0	0	1
	3	1	0	0	0	0	0	1	0
	4	1	2	1	0	2	0	0	1
	5	0	1	2	2	1	0	1	0
	6	1	2	1	0	0	1	0	0
	7	2	1	1	1	1	0	2	0
	Total		5	10	6	6	6	1	5
B	1	3	4	2	0	0	0	1	1
	2	2	3	2	4	0	0	3	0
	3	1	3	1	2	0	1	3	0
	4	1	0	1	1	1	0	0	0
	5	2	1	1	2	0	0	2	0
	6	0	1	1	1	●	0	1	1
	7	1	1	0	0	1	0	1	1
	Total		10	13	8	10	2	1	11
C	1	3	2	3	3	0	2	5	2
	2	2	8	3	1	0	1	3	2
	3	3	3	2	5	2	0	3	0
	4	2	0	0	1	0	1	1	0
	5	0	1	3	2	1	0	1	1
	6	1	1	4	3	0	0	0	3
	7	0	3	1	5	1	1	1	1
	Total		11	18	17	20	4	5	14
Total		26	41	31	36	12	7	30	14

TABELA 37, Classificação dos setores por tipo e número de colônias com setor, por ensaio - Experimento I.

Tipo de setor	Prateleiras <sup>a/</sup>		
	A	B	C
Amarelo	26 (0,64)	43 (0,74)	89 (0,91)
Verde	9 (0,22)	10 (0,17)	3 (0,03)
Deteriorado	5 (0,12)	4 (0,07)	5 (0,05)
Outros	1 (0,02)	1 (0,02)	1 (0,01)
Total	41	58	98
Colônias com setor	30 (0,54)	35 (0,63)	43 (0,77)

<sup>a/</sup> Os valores entre parênteses referem-se à percentagem de cada tipo de setor.



TABELA 38. Análise conjunta da variância para os dados obtidos nos três ensaios do experimento I.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Repetições/Prateleiras	18	4,6957	0,2609	1,75*
Entre linhagens (L)	7	7,1128	1,0161	6,81**
Entre prateleiras (P)	2	3,4279	1,7140	11,50**
L x P	14	1,8066	0,1290	0,87ns
Resíduo (L x Reprs./P)	126	18,7805	0,1491	
Total	167	35,8235		

C.V. = 32,04%

TABELA 39. Comparação entre as médias do número de setores produzidos, por prateleira e por linhagem, pelo teste de Tukey (Experimento I).

a. Aplicação para os dados das prateleiras -  $\Delta = 0,17$ 

Prateleira:	C	B	A
Média :	1,40	1,16	1,05

b. Aplicação para os dados das linhagens -  $\Delta = 0,37$ 

Linhagem:	2	4	3	7	1	8	5	6
Média :	1,48	1,40	1,33	1,31	1,25	1,02	0,98	0,87

TABELA 40. Número total de setores obtidos, a partir de linhagens com diferentes "backgrounds" genéticos, em cada uma das placas, nas temperaturas de 30°, 37° e 40°C (Experimento II).

Temperatura	Repetição nº	Linhagem							
		1	2	3	4	5	6	7	8
30°C	1	0	1	1	0	2	2	1	2
	2	0	1	4	3	1	3	1	2
	3	0	2	2	2	2	1	1	2
	4	1	2	2	1	0	0	3	1
	5	0	1	1	1	1	0	0	1
	6	1	2	0	2	1	0	0	4
	7	0	4	1	1	1	0	0	1
	Total		2	13	11	10	8	6	6
37°C	1	2	0	2	0	0	1	3	1
	2	0	7	3	0	0	1	1	1
	3	7	2	4	4	0	2	3	1
	4	5	0	1	1	1	0	3	0
	5	4	0	1	1	1	0	4	0
	6	3	1	0	4	3	0	3	1
	7	1	0	1	2	1	0	8	0
	Total		22	10	12	12	6	4	25
40°C	1	8	8	4	4	4	3	7	4
	2	7	6	0	6	3	5	5	5
	3	3	7	4	6	1	3	9	3
	4	2	9	4	5	1	3	6	4
	5	9	9	9	3	8	3	7	4
	6	8	11	5	4	1	2	3	1
	7	3	5	4	3	1	3	0	0
	Total		40	55	30	31	19	22	37
Total		64	78	53	53	33	32	68	38

TABELA 41. Classificação dos setores por tipo e número de colônias com setor, por ensaio - Experimento II.

Tipo de setor	Temperaturas <sup>a/</sup>		
	30°C	37°C	40°C
Amarelo	45 (0,65)	76 (0,80)	187 (0,74)
Verde	15 (0,22)	7 (0,07)	21 (0,08)
Deteriorado	7 (0,10)	12 (0,13)	44 (0,17)
Outros	2 (0,03)	0 (0,00)	3 (0,01)
Total	69	95	255
Colônias com setor	41 (0,73)	39 (0,70)	54 (0,96)

<sup>a/</sup> Os valores entre parênteses referem-se à percentagem de cada tipo de setor.

TABELA 42. Análise conjunta da variância para os dados obtidos nos três ensaios do experimento II.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Repetições/Incubadores	18	7,2634	0,4035	1,79*
Entre linhagens (L)	7	5,9669	0,8524	3,78**
Entre incubadores (I)	2	27,4650	13,7325	60,82**
L x I	14	10,3496	0,7393	3,27**
Resíduo (L x Repls./I)	126	28,4465	0,2258	
Total	167	79,4914		

C.V. = 29,93%

TABELA 43. Comparação entre as médias do número de setores produzidos, por temperatura e por linhagem, pelo teste de Tukey (Experimento II).

a. Aplicação para os dados obtidos

em cada uma das temperaturas -  $\Delta = 0,21$

Temperatura:	40°C	37°C	30°C
Média :	2,16	1,35	1,25

b. Aplicação para os dados das linhagens -  $\Delta = 0,45$

Linhagem:	2	7	1	4	3	8	5	6
Média :	1,86	1,78	1,69	1,64	1,63	1,43	1,34	1,32

- continua -

TABELA 43, continuação

c. Aplicação para os dados obtidos da interação  
linhagens versus incubadores -  $\Delta = 0,78$

Temperatura: 30°C

Linhagem	:	2	8	3	4	5	7	6	1
Média	:	1,51	1,51	1,38	1,34	1,25	1,09	1,07	0,85

---

Temperatura: 37°C

Linhagem	:	7	1	3	4	2	5	8	6
Média	:	1,96	1,80	1,42	1,38	1,20	1,09	1,00	0,98

---

Temperatura: 40°C

Linhagem	:	2	1	7	4	3	6	8	5
Média	:	2,87	2,42	2,29	2,20	2,09	1,90	1,79	1,69

---

TABELA 44. Número total de setores obtidos, a partir da linhagem A e de linhagens piridoxina e galactose, em cada uma das placas, nas temperaturas de 30°, 37° e 40°C (Experimento III).

Temperatura	Repetição nº	Linhagem						
		1	5	9	10	11	3	12
30°C	1	0	1	1	2	3	2	2
	2	0	1	1	3	2	1	1
	3	4	0	1	0	1	1	5
	4	2	2	1	2	2	2	0
	5	2	1	0	0	4	2	3
	6	1	1	1	0	1	2	2
	7	1	1	1	2	2	1	0
	Total	10	7	6	9	15	11	13
37°C	1	4	0	1	1	3	3	3
	2	2	1	2	3	5	2	2
	3	2	2	3	1	8	3	1
	4	0	3	1	4	2	2	4
	5	5	2	0	2	2	3	0
	6	0	3	3	2	4	0	3
	7	1	2	3	6	4	4	2
	Total	14	13	13	19	28	17	15
40°C	1	0	3	4	5	4	0	4
	2	3	6	1	4	4	6	7
	3	9	6	3	6	4	6	9
	4	5	2	3	4	3	5	2
	5	5	4	5	6	4	6	4
	6	9	6	9	5	4	5	4
	7	9	6	4	3	6	4	5
	Total	40	33	29	33	29	32	35
Total	64	53	48	61	72	60	63	

TABELA 45. Classificação dos setores por tipo e número de colônias com setor, por ensaio - Experimento III.

Tipo de setor	Temperaturas <sup>a/</sup>		
	30°C	37°C	40°C
Amarelo	37 (0,52)	60 (0,50)	151 (0,65)
Verde	25 (0,35)	14 (0,12)	39 (0,17)
Deteriorado	8 (0,11)	42 (0,35)	39 (0,17)
Outros	1 (0,02)	3 (0,03)	2 (0,01)
Total	71	119	231
Colônias com setor	40 (0,82)	43 (0,91)	47 (0,97)

<sup>a/</sup> Os valores entre parênteses referem-se à percentagem de cada tipo de setor.

TABELA 46. Análise conjunta da variância para os dados obtidos nos três ensaios do experimento III.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Repetições/Incubadores	18	4,8519	0,2696	1,22ns
Entre linhagens (L)	6	1,6396	0,2733	1,23ns
Entre incubadores (I)	2	20,0584	10,0292	45,24**
L x I	12	1,7659	0,1472	0,66ns
Resíduo (L x Reps./I)	108	23,9473	0,2217	
Total	146	52,2631		

C.V. = 27,15%

TABELA 47. Comparação entre as médias do número de setores produzidos, em cada temperatura, pelo teste de Tukey (Experimento III).

Aplicação para os dados obtidos em  
cada uma das temperaturas -  $\Delta = 0,23$

Temperatura:	40°C	37°C	30°C
Média :	2,23	1,64	1,34



TABELA 48. Número total de setores obtidos, a partir da linhagem A e de oito linhagens que requerem tiosulfato, em cada uma das placas, nas temperaturas de 30°, 37° e 40°C (Experimento IV).

Temperatura	Repetição nº	Linhagem								
		1	6	13	14	15	16	17	18	19
30°C	1	0	0	0	0	1	2	2	5	0
	2	0	1	1	1	2	1	0	2	0
	3	0	2	0	1	3	0	0	1	3
	4	0	0	0	0	1	1	0	1	0
	5	0	0	3	3	2	0	0	1	1
	6	1	1	1	0	2	2	1	2	1
	7	4	3	0	0	0	1	1	1	0
	Total	5	7	5	5	11	7	4	13	5
37°C	1	1	2	4	0	3	0	2	2	1
	2	3	0	4	0	1	0	2	2	0
	3	1	1	5	1	0	2	2	0	5
	4	3	4	1	1	1	3	1	3	1
	5	4	2	0	0	3	1	2	4	4
	6	0	0	1	1	0	4	0	1	1
	7	1	2	2	0	0	3	0	1	2
	Total	13	11	17	3	8	13	9	13	14
40°C	1	2	3	2	0	0	3	2	2	2
	2	3	0	1	0	0	2	2	2	1
	3	0	4	1	0	3	1	1	6	1
	4	2	2	0	1	3	1	1	0	3
	5	4	2	1	1	2	5	1	1	1
	6	2	3	1	0	2	0	1	5	1
	7	1	5	4	0	3	2	2	1	2
	Total	14	19	10	2	13	14	10	17	11
Total	32	37	32	10	32	34	23	43	30	

TABELA 49. Classificação dos setores por tipo e número de colônias com setor, por ensaio - Experimento IV.

Tipo de setor	Temperaturas <sup>a/</sup>		
	30°C	37°C	40°C
Amarelo	17 (0,27)	35 (0,35)	42 (0,38)
Verde	29 (0,47)	26 (0,26)	26 (0,24)
Deteriorado	15 (0,24)	37 (0,36)	41 (0,37)
Outros	1 (0,02)	3 (0,03)	1 (0,01)
Total	62	101	110
Colônias com setor	37 (0,59)	52 (0,82)	51 (0,81)

<sup>a/</sup> Os valores entre parênteses referem-se à percentagem de cada tipo de setor.

TABELA 50. Análise conjunta da variância para os dados obtidos nos três ensaios do experimento IV.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Repetições/Incubadores	18	5,5900	0,3106	1,53ns
Entre linhagens (L)	8	4,4219	0,5527	2,73**
Entre incubadores (I)	2	2,8819	1,4410	7,10**
L x I	16	3,1634	0,1977	0,97ns
Resíduo (L x Repls./I)	144	29,2028	0,2028	
Total	188	45,2610		

C.V. = 34,35%

TABELA 51. Comparação entre as médias do número de setores produzidos, por temperatura e por linhagem, pelo teste de Tukey (Experimento IV).

a. Aplicação para os dados obtidos

em cada uma das temperaturas -  $\Delta = 0,19$

Temperatura:	40°C	37°C	30°C
Média :	1,42	1,36	1,14

b. Aplicação para os dados das linhagens -  $\Delta = 0,43$

Linhagem:	18	6	16	15	13	1	19	17	14
Média :	1,52	1,41	1,37	1,35	1,34	1,32	1,31	1,21	0,93

#### 4.6. Influência da temperatura e do "background" genético na obtenção de setores deteriorados

No desenvolvimento deste trabalho um dos pontos primordiais foi o isolamento e a análise genética de variantes deteriorados; como a influência da temperatura e do "background" genético foi observada em diferentes experimentos (item 4.5), procurou-se detectar se estes parâmetros afetavam o aparecimento de setores deteriorados.

A linhagem A estava presente em todos os ensaios, logo foi possível comparar a frequência de setores deteriorados, por ela produzidos, por placa em cada experimento; esta frequência foi de 0,19 no experimento I, quando utilizou-se as diferentes prateleiras de um incubador regulado para 37°C, e variou de 0,19 a 0,29 nos outros experimentos, onde as temperaturas utilizadas eram de 30°, 37° e 40°C. Em termos de número de setores, a variação foi de 4 para 6; a alteração na frequência é decorrência do tamanho da amostra, 21 placas no total (Tabela 52),

No experimento I, o número de setores deteriorados produzido por todas as linhagens envolvidas no experimento foi praticamente igual nas três prateleiras; quando compara-se a frequência de deteriorados com a dos outros tipos de setores observa-se que a dos primeiros foi maior na prateleira A (Tabela 37),

Nos experimentos II, III e IV, onde foram utilizadas diferentes linhagens, o número de setores observados foi menor à 30°C - quer em números absolutos, quer em relação à frequência dos outros tipos de setores produzidos nesta temperatura (Tabelas 41, 45, 49 e 52).

O número de setores deteriorados foi maior à 40°C no experimento II, enquanto nos experimentos III e IV o número de setores deteriorados foi semelhante à 37° e 40°C.

TABELA 52, Número de setores deteriorados obtidos a partir da linhagem A e pelo conjunto das linhagens em cada um dos experimentos.

Experimento	Linhagem A		Conjunto das linhagens		
	Nº de sets. deteriorados	Nº de <sup>a/</sup> placas	Nº de sets. deteriorados	Nº de <sup>a/</sup> placas	
I	Prat. A	3	7	5	56 (0,09)
	Prat. B	1	7	4	56 (0,07)
	Prat. C	0	7	5	56 (0,09)
	Total	4	21 (0,19)	14	168 (0,08)
II	30°C	1	7	7	56 (0,13)
	37°C	2	7	12	56 (0,21)
	40°C	2	7	44	56 (0,79)
	Total	5	21 (0,24)	63	168 (0,38)
III	30°C	0	7	8	49 (0,16)
	37°C	1	7	42	49 (0,86)
	40°C	3	7	39	49 (0,80)
	Total	4	21 (0,19)	89	147 (0,61)
IV	30°C	4	7	15	63 (0,24)
	37°C	2	7	37	63 (0,59)
	40°C	0	7	41	63 (0,65)
	Total	6	21 (0,29)	93	189 (0,49)

<sup>a/</sup> Entre parênteses encontram-se os valores em percentagem.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Obtenção espontânea de setores a partir da linhagem A de *A. nidulans*

Através dos dados da Tabela 53 pode ser observada uma variação grande no número médio de setores por colônia entre os dados obtidos pelos diferentes autores, e até mesmo entre aqueles obtidos pelo mesmo autor em experimentos diferentes - como os de MENEZES (1974) e NIFFINEGGER E SOUZA (1979). Estas diferenças não são devidas apenas ao tamanho das amostras, que variam de 40 a 298 colônias analisadas.

Nos casos em que um grande número de colônias é analisado, normalmente os dados não são obtidos simultaneamente devido a limitação de espaço no incubador. Poder-se-ia imaginar que, devido as diferentes condições de incubação encontradas durante a obtenção dos resultados e ao tamanho amostral, estes dados não fossem muito discrepantes. Mas isto não é observado se comparamos os dados de AZEVEDO (1971), NIFFINEGGER E SOUZA (1979), PACCOLA (1982) (Tabela 53) e os obtidos na Tabela 1, onde o número médio de setores por colônia variou de 0,89 a 2,0. Na Tabela 2 está discrimi

TABELA 53. Frequência de setores espontâneos, obtida por diferentes autores, a partir da inoculação por ponto da linhagem A, crescida à temperatura de 37°C.

Autor	Nº de re- petições	Frequência de setores (%)				Média de setores/ colônia
		Amarelos	Verdes	Deterio- rados	Heteroca- rióticos	
AZEVEDO (1971)	250	278 (0,66)	116 (0,27)	31 (0,07)	-	425 1,70
MENEZES (1974)	56	96 (0,90)	4 (0,04)	6 (0,06)	-	106 1,89
MENEZES (1974)	90	92 (0,79)	19 (0,16)	6 (0,05)	-	117 1,30
NIFFINEGGER E SOUZA (1979)	298	428 (0,72)	73 (0,12)	74 (0,12)	22 (0,04)	597 2,00
NIFFINEGGER E SOUZA (1979)	40	55 (0,65)	18 (0,21)	7 (0,08)	5 (0,06)	85 2,13
PIZZIRANI-KLEINER (1981)	80	180 (0,78)	37 (0,16)	6 (0,03)	8 (0,03)	231 2,89
OLIVEIRA (1982)	40	111 (0,74)	27 (0,18)	10 (0,07)	2 (0,01)	150 3,75
PACCOLA (1982)	171	101 (0,66)	33 (0,22)	18 (0,12)	1 (0,01)	153 0,89



nado o total de setores originado por colônia. Dentro da grande variação observada, chama a atenção o fato de 35,81% das colônias não apresentarem setor algum.

A variação da temperatura durante o período de incubação talvez seja o fator mais importante na origem da instabilidade. Este aspecto será discutido no item 5.6., mas é fácil entender que, embora o incubador seja regulado para 37°C, ocorre variação de temperatura dentro do mesmo; além disso, normalmente as placas com a linhagem A são incubadas junto com placas de outros experimentos. Quanto maior o número de placas dentro do incubador menos homogênea é a temperatura no seu interior. Deste modo, para comparar a instabilidade de duas linhagens deve-se utilizá-las simultaneamente, sem outras placas no incubador e tendo-se o cuidado de fazer uso de um delineamento experimental adequado, que seja capaz de eliminar da análise as diferenças nas condições existentes dentro do incubador.

Pelos resultados da Tabela 53, podemos inferir que no experimento de PACCOLA (1982) a temperatura média deve ter ficado aquém de 37°C, enquanto no de OLIVEIRA (1982) deve ter se situado acima de 37°C.

### 5.1.1. Setores heterocarióticos

Foram observados oito setores heterocarióticos, a partir de 257 colônias da linhagem A inoculadas no centro de placas de Petri, mas apenas três foram analisados geneticamente.

A manipulação dos setores heterocarióticos mostrou-se bastante complexa; muitas vezes não foi possível mantê-los, durante as tentativas de isolamento. Isto poderia ser explicado pelos diferentes valores adaptativos dos

componentes do setor. Mesmo quando os setores heterocarióticos eram maiores, de tal modo que era possível transferir um bloco de ágar com o setor para outra placa de Petri com meio completo, ainda assim não foi possível manter a heterocariose.

Apenas um dos setores heterocarióticos ( $H_{17}$ ) deu origem a colônias verdes ( $H_{17v}$ ) e amarelas ( $H_{17a}$ ), quando transferido para outra placa de Petri. Os resultados obtidos através das análises mitóticas (Tabela 12) e meióticas (Tabelas 30 e 31) sugerem que as colônias verdes são a própria linhagem A e as amarelas um setor melhorado. O aparecimento delas sob a forma de setor heterocariótico seria um evento fortuito, já que nenhuma delas necessita da presença da outra para sobreviver.

Dois setores heterocarióticos ( $H_{18}$  e  $H_{19}$ ) só deram origem a colônias amarelas. Nestes casos os conídios verdes deveriam apresentar alguma modificação em sua estrutura genética que os tornariam inviáveis quando do rompimento do equilíbrio existente dentro do setor heterocariótico. Talvez uma deleção no grupo de ligação I, de tamanho maior do que o segmento duplicado e transposto para o grupo de ligação II, fosse a causa da incapacidade das colônias verdes crescerem na ausência das amarelas.

As colônias amarelas provenientes dos setores heterocarióticos  $H_{18}$  e  $H_{19}$  foram submetidas apenas à análise meiótica (Tabelas 32 e 33), já que os diplóides formados não produziram setores para serem analisados através do ciclo parassexual. As colônias amarelas devem ter se originado pela perda de parte ou da totalidade do segmento em duplicata do grupo de ligação I, transposto para o grupo de ligação II.

Os setores heterocarióticos são pouco frequentes, sendo que em alguns trabalhos não são nem mencionados.

Na Tabela 53 estão compilados os dados de diversos autores sobre instabilidade na linhagem A. Dentre estes trabalhos, apenas no de NIFFINEGGER E SOUZA (1979) foram analisados geneticamente setores heterocarióticos. Dentre os 16 analisados, quatro davam origem a colônias verdes e amarelas e os outros 12 produziam apenas colônias verdes. Nos heterocarióticos que originavam colônias viáveis verdes e amarelas, as verdes apresentavam diferenças morfológicas em relação à linhagem A, quando analisadas citologicamente. Os resultados obtidos levaram-na a aventar a hipótese de que o setor heterocariótico seja resultado de um evento que envolva recombinação mitótica entre os segmentos em duplicata, produzindo dois componentes diferentes da linhagem A original que então formariam um heterocário balanceado.

ROPER e NGA (1969) detectaram um variante amarelo inviável, potencialmente hipohaplóide, em um setor heterocariótico. Conídios semeados a partir deste setor não davam origem a colônias amarelas, mesmo variando a temperatura e modificando o meio de cultura. Observaram então um total de 435 colônias da linhagem A e conseguiram detectar 23 setores heterocarióticos, sendo que destes 22 apresentavam o componente amarelo inviável. Os autores pensaram que o setor amarelo inviável era mantido na condição heterocariótica com um variante mitótico verde da linhagem A, mas ao analisarem o componente verde de um setor heterocariótico concluíram que ele era idêntico à linhagem A.

SEXTON e ROPER (1984) observaram que a linhagem DpA2, com duplicação, produzia uma alta frequência de setores heterocarióticos; amostras de conídios semeadas a partir desses setores deram origem apenas a colônias verdes do tipo parental, com duplicação, embora os setores parecessem ter 50% dos conídios amarelos. Os componentes amarelos eram provavelmente hipohaplóides; presumivelmente uma deleção eli

minando  $yA^+$  no segmento translocado removeria também uma parte essencial do cromossomo V. Deste modo os hipohaplóides só poderiam ser mantidos em associação heterocariótica com a linhagem parental.

Pelos dados de NIFFINEGGER E SOUZA (1979), PIZZIRANI-KLEINER (1981) e OLIVEIRA (1982), que utilizaram diferentes temperaturas - variando de  $28^{\circ}$  a  $44^{\circ}$  C - para a incubação da linhagem A, os setores heterocarióticos aparecem com maior frequência na temperatura de  $37^{\circ}$  C, sendo que em 120 placas incubadas à  $28^{\circ}$  C não foi encontrado qualquer setor heterocariótico. Com relação aos setores amarelos, a frequência aumenta com a elevação da temperatura enquanto os setores verdes apresentam uma diminuição na frequência com o aumento da temperatura.

O fato de neste trabalho terem sido obtidos setores heterocarióticos nos quais são colônias amarelas eram viáveis e no de NIFFINEGGER E SOUZA (1979) onde são as verdes eram viáveis leva a supor que a temperatura pode ter influência no tipo de setor que será viável. Isto porque, durante a obtenção dos setores, na prateleira superior (menor temperatura) foram originados aqueles que deram apenas colônias amarelas e na prateleira inferior (maior temperatura) aqueles que deram colônias verdes.

Se a temperatura influi no tipo de colônia do heterocário que será viável, estes resultados são antagônicos àqueles obtidos para os setores verdes e amarelos, a partir da linhagem A. Quando o setor heterocariótico dá origem a um só tipo de colônia viável, tanto as colônias amarelas quanto as verdes apresentam conídios com diâmetro menor que os da linhagem A, logo ambas devem sofrer deleção. Para tentar explicar estes resultados seria interessante analisar as colônias verdes e amarelas quanto a sua capacidade de cres-

cer em meio sem adenina e sem biotina.

### 5.1.2. Setores deteriorados

A frequência de setores deteriorados é baixa, variando de 0,03 a 0,12, segundo os dados de diferentes autores (Tabela 53). A frequência encontrada neste trabalho foi de 0,07.

Dos 26 setores deteriorados observados, a partir da inoculação por ponto da linhagem A, apenas nove foram analisados geneticamente (Tabelas 1, 11, 16-23). Vários deles eram tão instáveis que não foi possível mantê-los durante o tempo suficiente para executar as análises genéticas; cinco chegaram a ser submetidos à análise mitótica, mas não chegaram a ser analisados através do ciclo sexual. Nos cinco, os determinantes genéticos de deterioração pareciam estar localizados nos grupos de ligação envolvidos na duplicação.

NGA e ROPER (1968) não analisaram geneticamente os deteriorados muito instáveis, já que poderiam ocorrer mudanças não detectadas durante o estágio heterocariótico que precede as análises mitótica e meiótica.

AZEVEDO e ROPER (1970) chamaram atenção para o fato de que a maioria dos deteriorados analisados como sendo presumivelmente originais, apresentavam os determinantes genéticos de deterioração na parte do genoma não envolvida na duplicação. Segundo eles, não se pode ter certeza de que estes sejam os deteriorados originais; eles podem ser derivados mais estáveis dos mesmos, que sobreviveram durante os processos de purificação e manutenção.

Setores deteriorados extremamente instáveis

são frequentes; possivelmente eles são originados por duplicações em tandem que ocorrem nos segmentos em duplicata e que, numa segunda etapa, dão origem aos deteriorados mais estáveis. Atualmente são feitas tentativas para analisar estes setores mais instáveis, e seus variantes de 1.<sup>a</sup> ordem, na suposição de que eles possam esclarecer mais a respeito da origem dos deteriorados.

O *A. nidulans* não é um material propício para a análise citogenética. Isto dificulta ainda mais o estudo da instabilidade, já que não podemos complementar os dados da análise genética com observações citológicas.

As técnicas de sequenciamento de DNA também não têm sido empregadas para estudar a instabilidade em *A. nidulans*, embora já exista uma quantidade apreciável de informação sobre DNA repetitivo e elementos de transposição em bactérias e leveduras (KLECKNER, 1977; CAMERON *et alii*, 1979; CALOS e MILLER, 1980; SHAPIRO, 1983). Os determinantes de deterioração, que podem ser transpostos de um local para outro do genoma, talvez sejam flanqueados por elementos semelhantes às sequências de inserção.

## 5.2. Diâmetro de conídios - variação dependente do grau de ploidia e da forma de medição

Segundo ROPER (1952), um dos critérios utilizados para determinar o grau de ploidia de uma linhagem é a medida do diâmetro dos seus conídios, sendo de 1:1,3 a relação entre o diâmetro de conídios haplóides e diplóides.

Neste trabalho os conídios dos diplóides, obtidos a partir dos cruzamentos das linhagens deterioradas com as linhagens testadoras, foram medidos, usando-se como controle as linhagens MSE (haplóide, normal) e A (haplóide, com

duplicação). O diâmetro dos conídios diplóides variou de 4,31 a 5,02  $\mu$ , sendo que o do diplóide A//MSE foi de 4,39  $\mu$  (Tabela 6); embora alguns deteriorados apresentem diâmetro dos conídios menor do que os da linhagem A, nenhum deles é menor do que 4,28  $\mu$  (que corresponde a 1,3 vezes o diâmetro da linhagem MSE). Estes dados foram obtidos com conídios da mesma idade observados a fresco e medidos com ocular micrométrica.

CASE e ROPER (1978), também utilizando conídios a fresco e ocular micrométrica, obtiveram um diâmetro médio de 3,3  $\mu$  para a linhagem MSE, 3,9  $\mu$  para a linhagem A e 4,5  $\mu$  para o diplóide A//MSE.

NIFFINEGGER E SOUZA (1979) determinou o diâmetro de conídios diplóides de diferentes deteriorados cruzados com a linhagem MSE, mas neste caso o material era corado, já que havia também como objetivo a medição do diâmetro de núcleos. Isto faz com que os valores encontrados sejam bem menores do que aqueles obtidos a fresco. O diâmetro dos conídios corados, nos diplóides entre as linhagens deterioradas e as testadoras, variou de 3,80 a 4,01  $\mu$ ; logo o maior valor obtido para os conídios corados é inferior ao menor valor encontrado para os conídios a fresco.

Em se tratando dos setores heterocarióticos foram medidos os conídios das colônias haplóides e das diplóides obtidas do cruzamento com a linhagem MSE (Tabela 7). Todas as colônias amarelas haplóides apresentaram conídios com diâmetro menor do que os da linhagem A, enquanto na colônia verde haplóide o diâmetro dos conídios era maior do que os da linhagem A. Estes dados concordam com os obtidos por NIFFINEGGER E SOUZA (1979), em termos de variação das colônias verdes e amarelas quando comparadas com a linhagem A, embora os valores por ela obtidos sejam menores em decorrên-

cia dos conídios serem corados.

Com relação aos conídios de diplóides obtidos pelo cruzamento de heterocarióticos com a linhagem MSE, NIFFINEGGER E SOUZA (1979) observou que, tanto os diplóides provenientes de colônias amarelas quanto de verdes, apresentavam um diâmetro menor do que o do A//MSE. Mas neste trabalho apenas os diplóides oriundos de colônias amarelas, e em que as verdes eram inviáveis, apresentaram conídios com diâmetro menor do que o A//MSE. (Tabela 7). Os diplóides obtidos a partir da colônia verde e da amarela, provenientes do setor heterocariótico H<sub>17</sub>, apresentaram diâmetro superior aos conídios do diplóide A//MSE.

Embora os cromossomos do *A. nidulans* sejam pequenos (ELLIOTT, 1960) e este fungo não seja empregado em estudos citogenéticos, em alguns casos é possível complementar os dados obtidos a partir da análise genética com aqueles obtidos através de observações citológicas - como no caso do diâmetro de núcleos e de conídios.

Nos variantes deteriorados o aumento da quantidade de material genético não é muito pronunciado; nestes deve-se medir o diâmetro dos conídios haplóides já que no diplóide a diferença sendo pequena poderá não ser detectada. A medida do diâmetro dos núcleos evidencia mais facilmente as diferenças entre os deteriorados, devendo ser utilizada como apoio às análises genéticas (NIFFENEGGER E SOUZA, 1979).

### 5.3. Utilização de fungicidas para a indução da haploidização

A recuperação de segregantes haplóides, a partir de diplóides heterozigotos, é de vital importância na análise genética baseada na segregação mitótica.



Segundo KÄFER (1960), os segregantes haplóides seriam originados espontaneamente a partir de aneuplóides, por perdas sucessivas de cromossomos. MORPURGO (1961) e LHOAS (1961) utilizaram a *p*-fluorfenilalanina (*p*F<sub>A</sub>) para induzir haploidização mitótica, adicionando-a ao meio completo sólido na concentração de 1:10.000 p/v. Outras substâncias vêm sendo empregadas na indução da haploidização, dentre elas os fungicidas Benlate (HASTIE, 1970) e Chloroneb (AZEVEDO e SANT'ANA, 1975).

Quando se compara os resultados da análise mitótica de segregantes haplóides obtidos por indução com Chloroneb em relação àqueles com Benlate, observa-se que em alguns casos o Chloroneb parece selecionar preferencialmente a marca *pyro*<sup>+</sup>. Na Tabela 8 pode-se comparar os resultados obtidos a partir de segregantes haplóides induzidos pelo uso dos dois fungicidas. No caso dos deteriorados V<sub>61</sub> e V<sub>60</sub>, há um nítido aumento na classe *pyro*<sup>+</sup> (32:0 e 20:6, respectivamente), quando haploidiza-se com Chloroneb. No V<sub>53</sub> o número de colônias *pyro*<sup>+</sup> e *pyro* é semelhante, não importando o fungicida. No grupo de ligação IV, associado com a marca *pyroA*<sub>4</sub>, deve existir um gene que não apresenta manifestação fenotípica que parece estar presente em algumas das linhagens utilizadas. Um alelo deste gene seria selecionado pelo Chloroneb, fazendo com que em alguns cruzamentos fossem obtidas quase 100% de colônias *pyro*<sup>+</sup>; em outros cruzamentos onde este gene silencioso parece não estar presente, a segregação seria normal para a marca *pyro*<sup>+</sup> (Tabela 8).

PIZZIRANI-KLEINER (1981) ao mapear o gene *bina*<sub>1</sub> induziu a haploidização com Chloroneb, mas este atuou seletivamente, permitindo somente a detecção de setores haplóides *pyro*<sup>+</sup>. Utilizando *p*F<sub>A</sub>, ela conseguiu obter haplóides *pyro* e localizou o gene *bina*<sub>1</sub> no grupo de ligação IV (o mesmo do gene *pyroA*<sub>4</sub>).

O Chloroneb, segundo PACCOLA (1982), não deve ser utilizado na haploidização de linhagens portadoras de rearranjos cromossômicos pois além de selecionar algumas marcas, como  $galA_1$  e  $riboB_2$ , também provoca um aumento na frequência de permuta mitótica.

A ausência de setores deteriorados, na maioria dos cruzamentos entre linhagens deterioradas e testadoras, pode ser decorrente da substância empregada para aumentar a frequência de haploidização. Nos trabalhos em que a *p*-fluorfenilalanina era utilizada na haploidização foram obtidos segregantes haplóides deteriorados (AZEVEDO, 1971; MENEZES, 1974); no entanto, dependendo de sua concentração no meio, a *p*FA inibe o aparecimento de haplóides portadores de duplicação (NGA e ROPER, 1968).

AZEVEDO (1971), utilizou normalmente a *p*FA na concentração final de 40  $\mu\text{g/ml}$  de meio, mas diminuía a concentração para 15  $\mu\text{g/ml}$  quando necessitava recuperar segregantes com a duplicação.

PACCOLA (1982), para efeito de comparação, utilizou *p*FA (40  $\mu\text{g/ml}$ ), Chloroneb (20  $\mu\text{g/ml}$ ) e Benlate (0,2 ou 0,3  $\mu\text{g/ml}$ ) na haploidização de quatro diplóides obtidos através do cruzamento de deteriorados com a linhagem testadora MSE. Dentre os 342 segregantes haplóides analisados, apenas seis eram deteriorados; um deles foi originado em meio com Benlate, dois em Chloroneb e três em *p*FA. Como a *p*FA foi utilizada numa concentração acima do limite ideal para o isolamento de segregantes deteriorados a frequência foi semelhante às obtidas com o uso do Benlate e Chloroneb.

Neste trabalho foram empregados dois fungicidas, o Chloroneb e o Benlate, devido à facilidade de obtenção e o baixo custo. A ausência de segregantes haplóides de

teriorados pode ser creditada à inibição de seu crescimento pelo fungicida ou ao seu menor valor adaptativo em relação a outros segregantes.

#### 5.4. Análise mitótica e meiótica dos variantes deteriorados

Os determinantes genéticos de deterioração dos nove variantes deteriorados e dos quatro variantes de 1.<sup>a</sup> ordem obtidos neste trabalho comportaram-se como genes simples. Através dos dados das análises mitóticas (Tabelas 8, 9 e 10), os determinantes genéticos de deterioração puderam ser localizados nos diferentes grupos de ligação (Tabela 11). Apenas nos grupos de ligação V e VIII não foram mapeados determinantes de deterioração.

Para detectar se os determinantes de deterioração estão ligados às marcas da linhagem testadora procedeu-se a análise meiótica. A frequência dos segregantes meióticos, em alguns cruzamentos, apresentou um desvio da proporção esperada de 1 normal: 1 deteriorado (Tabela 13). Este desvio pode ser devido ao menor valor adaptativo dos deteriorados e/ou à densidade de colônias semeadas por placa.

KÄFER (1960), semeando amostras de conídios de uma linhagem diplóide, observou que ao colocar 50 colônias por placa obtinha segregantes com uma frequência de 1/150, enquanto que diminuindo a densidade de semeadura, a frequência aumentava até 1/40.

Nas Tabelas 16 a 27 encontram-se as frequências de recombinação entre os determinantes genéticos de deterioração e as marcas das linhagens testadoras. Apenas quatro deteriorados ( $V_{53}$ ,  $V_{53.1}$ ,  $V_{56}$  e  $V_{57.1}$ ) apresentaram liga-

ção entre o determinante de deterioração e a marca da linhagem testadora.

De acordo com a localização dos determinantes de deterioração, os variantes deteriorados encontrados podem ser agrupados nas seguintes classes:

1. o determinante de deterioração está associado com uma deleção no grupo de ligação I;
2. o determinante de deterioração está localizado no segmento translocado;
3. o determinante de deterioração está localizado em qualquer outra região do genoma.

O  $V_{56}$  é um exemplo de deteriorado cujo determinante de deterioração está associado com uma deleção no grupo de ligação I. A deleção atingiu o braço direito, sendo distal à marca  $y^A_2$ ; deste modo o deteriorado requer adenina e biotina. AZEVEDO (1971) mapeou vários determinantes de deterioração associados à deleção no braço direito do grupo de ligação I, no segmento que está presente em duplicata na linhagem A.

O variante deteriorado  $V_{56}$  pode ser considerado um setor melhorado, já que perdeu material genético presente em duplicata; isto faz com que sua morfologia não seja tão característica quanto a de outros deteriorados e sua produção de conídios não seja escassa.

Quando o  $V_{56}$  é cruzado com a linhagem MSE, através do ciclo sexual, a proporção esperada entre os segregantes é de duas colônias normais: uma deteriorada, já que a classe que recebe o grupo de ligação I do  $V_{56}$  e o gru-

po de ligação II da linhagem MSE apresenta deleção no grupo de ligação I.

No caso do variante  $V_{61}$ , os dados da análise mitótica indicaram que o determinante genético de deterioração está localizado no grupo de ligação II. Como este grupo de ligação apresenta unido a si um segmento em duplicata do grupo de ligação I, o determinante de deterioração poderia estar localizado quer no segmento em duplicata ou realmente no grupo de ligação II original. Pelo aparecimento espontâneo de setores amarelos normais, a partir do variante deteriorado, concluiu-se que o determinante de deterioração está localizado no segmento translocado.

Dentre os segregantes obtidos através do ciclo sexual, pelo cruzamento do variante  $V_{61}$ , relativamente instável, com a linhagem MSE, observou-se um aumento significativo no número de colônias normais em relação às deterioradas (Tabela 13). Este resultado poderia ser explicado quer pelo menor valor adaptativo do deteriorado em relação aos normais ou pelo fato de que, sendo o variante instável, algumas colônias normais teriam se originado através da perda de segmento do grupo de ligação I que se encontra ligado ao grupo de ligação II.

AZEVEDO (1971) localizou no grupo de ligação II, no segmento em duplicata translocado, os determinantes de deterioração dos variantes deteriorados  $V_4$  e  $V_{31}$ , o primeiro originado a partir da linhagem B e o outro da A. Quando estes variantes são cruzados com a linhagem MSE, os segregantes normais aparecem com uma frequência muito superior a dos deteriorados. Logo, parece ser comum que o determinante localizado no complexo I-II esteja situado no segmento translocado, que as linhagens com este genótipo sejam instáveis e que entre os segregantes obtidos através da análise meiôti

ca ocorra um predomínio das colônias não deterioradas.

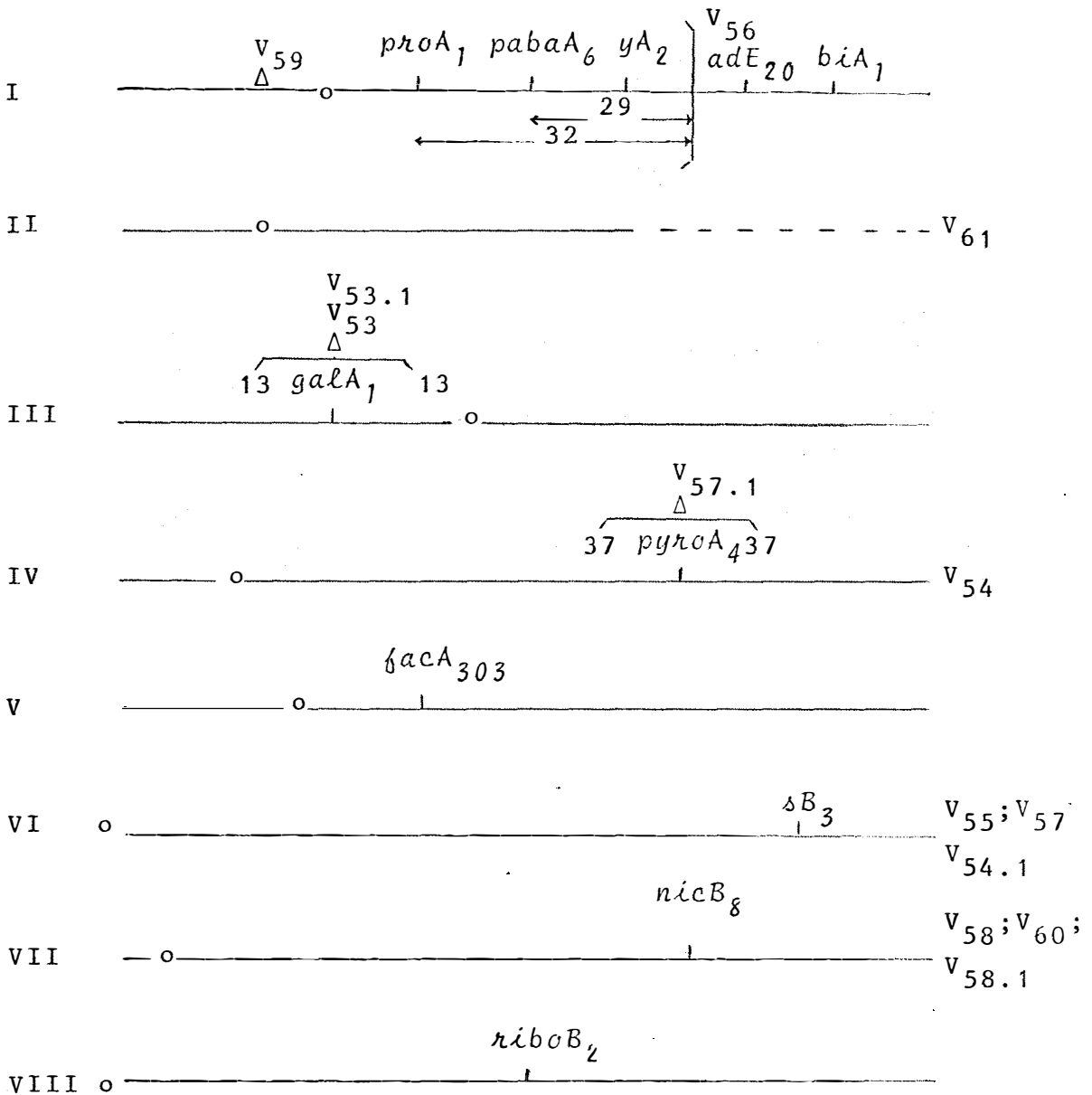
A maioria dos variantes deteriorados analisados não estava localizada na região duplicada (Figura 4). Dentre eles, alguns tiveram seus variantes de 1.<sup>a</sup> ordem analisados geneticamente.

O variante deteriorado  $V_{53}$  e seu variante de 1.<sup>a</sup> ordem  $V_{53.1}$  estão ligados à marca  $galA_1$ , os dois apresentando a mesma frequência de recombinação. O diplóide  $V_{53.1} // MSE$  é amarelo, induzindo à suposição de que o variante de 1.<sup>a</sup> ordem  $V_{53.1}$  tenha se originado pela perda da parte duplicada do grupo de ligação I portadora do alelo  $yA_2^+$ .

O determinante de deterioração do  $V_{54}$ , mapeado no grupo de ligação IV, não se encontra ligado à marca  $pyrA_4$  nem é alelo do  $v_8$ . Como os determinantes de deterioração do  $V_{15}$  e do  $V_{18}$ , assim como o do  $V_8$ , são ligados à marca  $pyrA_4$  (AZEVEDO, 1971), seria interessante cruzar através do ciclo sexual o  $V_{54}$  e uma linhagem com a marca  $methG_1$ , que está no braço esquerdo do grupo de ligação IV. Já o determinante de deterioração do  $V_{57.1}$  está ligado à marca  $pyrA_4$ , devendo ter se originado pela transposição do determinante de deterioração  $v_{57}$  do grupo de ligação VI para o IV.

No grupo de ligação VI estão localizados os determinantes genéticos de deterioração dos variantes  $V_{55}$ ,  $V_{57}$  e do variante de 1.<sup>a</sup> ordem  $V_{54.1}$ ; nenhum deles apresenta ligação com a marca  $\delta B_3$ .

Na análise mitótica do  $V_{57}$  (Tabela 8) a segregação obtida para as marcas  $proA_1$  e  $pabaA_6$  deixa dúvida quanto ao possível envolvimento do grupo de ligação I na determinação da deterioração. Os dados obtidos pela análise meiótica, para os segregantes normais brancos e coloridos e também para os deteriorados, demonstram que o grupo de ligação I



$\Delta$  determinante de deterioração  
 ' marcador genético  
 o centrômero

} deleção  
 --- segmento em duplicata translocado  
 — ligado à marca correspondente, podendo estar de qualquer lado  
 as marcas à direita não estão mapeadas meioticamente  
 as marcas não estão em escala no mapa.

FIGURA 4. Localização dos determinantes de deterioração nos grupos de ligação do *A. nidulans*.

não está envolvido com a deterioração.

O variante de 1.<sup>a</sup> ordem  $V_{54.1}$  deve ter se originado pela transposição do determinante genético de deterioração do grupo de ligação IV para o grupo de ligação VI; ambos apresentam morfologia bem semelhante.

No grupo de ligação VII foram localizados os variantes deteriorados  $V_{58}$  e  $V_{60}$ , além do variante de 1.<sup>a</sup> ordem  $V_{58.1}$ ; nenhum deles apresenta ligação com a marca  $nicB_8$ .

Os variantes deteriorados  $V_{58}$  e  $V_{58.1}$ , devido à cor dos seus conídios, foram cruzados com a linhagem testadora MSF. Como os variantes deteriorados e a linhagem MSF não apresentam o marcador genético  $wA_3$ , que condiciona conídios brancos, nestes cruzamentos não aparecem segregantes normais brancos.

No cruzamento  $V_{58}$  x MSF, a maior frequência de segregantes amarelos em relação aos verdes pode ser explicada pela perda do segmento duplicado do grupo de ligação I transposto para o grupo de ligação II, que contém o alelo  $yA_2^+$ , em algumas colônias que seriam verdes. Na presença do alelo selvagem do  $v_{58}$ , estando presente o  $yA_2^+$  no grupo de ligação II a colônia é verde; caso ocorra perda do  $yA_2^+$  a colônia é amarela (Tabela 14).

No caso do variante de 1.<sup>a</sup> ordem  $V_{58.1}$ , pode-se supor que tenha ocorrido uma deleção do segmento do grupo de ligação I translocado para o grupo de ligação II. O diplóide  $V_{58.1}$ //MSF é amarelo. A ausência do alelo  $yA_2^+$  impossibilitaria o aparecimento de colônias verdes, quando do cruzamento com a linhagem MSF. Já que as marcas para coloração nos grupos de ligação I e II ficavam idênticas, a cor das colônias passava a depender apenas da presença ou não do determinante de deterioração do  $V_{58.1}$ , no grupo de ligação



VII; a colônia seria branco acinzentada (deteriorada) se o determinante de deterioração estivesse presente, ou amarela na sua ausência.

### 5.5. Testes de alelismo

Os variantes deteriorados cujos determinantes de deterioração estavam localizados no mesmo grupo de ligação foram submetidos à análise genética através do ciclo sexual, para averiguar se os determinantes de deterioração eram alelos. Foram também utilizados nos cruzamentos variantes deteriorados analisados por outros autores (item 3.1.).

Espera-se uma segregação de três colônias deterioradas: uma colônia normal, quando os determinantes genéticos de deterioração dos dois variantes cruzados não são alelos e não estão ligados; havendo ligação entre os determinantes de deterioração, a proporção de deteriorados aumenta e seu número será tanto maior quanto mais próximos estiverem os determinantes de deterioração. Quando os determinantes de deterioração são alelos, não são encontradas colônias normais; sendo obtidas apenas colônias deterioradas, é importante analisar as outras marcas envolvidas no cruzamento, para distinguir se ocorreu autofecundação de um dos deteriorados ou se realmente os cleistotécios eram híbridos, embora os determinantes de deterioração sejam alelos.

A proporção 3:1 foi encontrada em alguns cruzamentos, enquanto em outros os resultados se ajustavam à proporção 2:1 (Tabela 35). O menor número de colônias deterioradas em relação às normais poderia ser decorrência do menor valor adaptativo dos deteriorados, da densidade de semeadura ou ainda de uma pressão de seleção forte atuando sobre os segregantes portadores dos dois determinantes de dete

rioração.

No cruzamento  $V_{57} \times V_{16}$  os dados da segregação não se ajustam quer a proporção de 3:1 nem a de 2:1. No cruzamento com a linhagem testadora (Tabela 13), o  $V_{57}$  já apresentou um número de segregantes deteriorados inferior ao esperado - 134 normais: 88 deteriorados. Com o  $V_{16}$  (AZEVEDO, 1971) os resultados obtidos também fugiram ao esperado - 105:61. Deste modo, não se poderia esperar uma segregação de 3:1 quando os dois deteriorados foram cruzados, já que o valor adaptativo de ambos é baixo e o dos segregantes com os dois determinantes de deterioração deve ser ainda menor.

No cruzamento  $V_{54} \times V_8$  o número de segregantes normais, contrariando todas as expectativas, foi bem maior do que o de deteriorados. No cruzamento  $V_{54} \times \text{MSE}$  o número de segregantes normais e deteriorados se ajusta à proporção 1:1 (Tabela 13). O  $V_8$ , quando cruzado tanto com a linhagem  $biA_1; methG_1$  quanto com a MSE, apresentou uma frequência de deteriorados mais baixa do que o esperado, ficando os valores de  $\chi^2$  situados próximos ao limite de 5% de probabilidade (AZEVEDO, 1971). Uma possível explicação para estes dados seria a presença de uma deleção no  $V_{54}$  enquanto a deterioração do  $V_8$  seria devido a uma duplicação, na qual estaria presente o segmento deletado do  $V_{54}$ . Quando os dois determinantes estão juntos dão origem a colônias com o fenótipo normal. Deste modo dever-se-ia esperar a proporção de 1 normal: 1 deteriorado; esta proporção não é atingida porque os segregantes  $v_{54}^+ v_8$ , devido a presença do alelo  $v_8$ , têm sua frequência reduzida. O variante  $V_{54}$  necessita ser mais estudado para se tentar elucidar sua origem.

No grupo de ligação I os determinantes de deterioração dos dois deteriorados obtidos,  $V_{56}$  e  $V_{59}$ , não são alelos. No cruzamento entre eles foi observado que o número de segregantes deteriorados sobrepujava o de normais (Tabela

35). Como os determinantes de deterioração estão mapeados em braços diferentes do cromossomo (Tabelas 28 e 29 e Figura 4) não parece provável que haja ligação entre os dois determinantes genéticos de deterioração, embora os dados se ajustem à proporção 6:1. Pode ser que alguns segregantes normais tenham sido classificados como deteriorados já que o  $V_{56}$ , devido a deleção, não apresenta um aspecto deteriorado característico. Resultados mais conclusivos poderiam ser obtidos através de cruzamentos utilizando-se outros marcadores situados entre os dois determinantes genéticos de deterioração.

O determinante de deterioração do  $V_{59}$  não é alelo do  $v_{28}$  nem do  $v_{26}$ . No cruzamento do  $V_{59}$  com o  $V_{36}$  foram obtidos apenas segregantes deteriorados, logo seus determinantes de deterioração são alelos. Os segregantes deteriorados obtidos podiam ser separados em dois grupos, cada um semelhante a um dos deteriorados; isto talvez seja devido aos determinantes de deterioração apresentarem alteração em sítios diferentes dentro do mesmo gene. Na análise meiótica do  $V_{59}$ , através do teste de três pontos, foram obtidas as distâncias de 41 e 43 unidades entre o determinante genético de deterioração e as marcas  $proA_1$  e  $pabaA_6$ . MENEZES (1974) encontrou as distâncias de 24 e 40 unidades, respectivamente, entre o determinante de deterioração do  $V_{36}$  e as marcas  $proA_1$  e  $pabaA_6$ . A discrepância dos valores obtidos para a distância entre o determinante de deterioração e  $proA_1$  é bem grande. O número de segregantes analisados no teste de três pontos, a partir do cruzamento entre o  $V_{59}$  e a linhagem MSE, deveria ser aumentado na tentativa de confirmar se os determinantes de deterioração  $v_{36}$  e  $v_{59}$  são alelos.

No grupo de ligação III, o determinante genético do  $V_{53}$ , que está ligado à marca  $galA_1$ , não é alelo do  $v_9$ . Tanto MENEZES (1974) quanto NIFFINEGGER E SOUZA (1979)

obtiveram um variante deteriorado ligado à marca  $galA_1$ , mas não devem ser alelos do  $V_{53}$  porque ambos foram mapeados a mais de 30 unidades de  $galA_1$ . Já AZEVEDO (1971) só encontrou deteriorados localizados no braço direito do grupo de ligação III.

Os determinantes de deterioração do  $V_{55}$  e do  $V_{57}$ , localizados no grupo de ligação VI, não são alelos; também foi observado que seus determinantes de deterioração não são alelos do  $v_{16}$ .

No grupo de ligação VII foram obtidos dois variantes deteriorados - o  $V_{58}$  e o  $V_{60}$  - cujos determinantes de deterioração não são alelos. Estes variantes foram cruzados com o  $V_{10}$  e o  $V_{17}$ . O determinante de deterioração  $v_{60}$  não é alelo do  $v_{10}$  nem do  $v_{17}$ , mas o determinante de deterioração  $v_{58}$  é alelo do  $v_{17}$ .

Neste trabalho três determinantes genéticos de deterioração foram localizados no grupo de ligação VI, mas nenhum deles apresentou ligação com a marca  $\Delta B_3$ . Também AZEVEDO (1971), MENEZES (1974) e NIFFINEGGER E SOUZA (1979) obtiveram variantes deteriorados localizados neste grupo de ligação e cujos determinantes de deterioração não eram ligados à marca  $\Delta B_3$ . Seria interessante utilizar outra linhagem, que não a MSE, para cruzar com estes variantes deteriorados e também realizar todos os testes de alelismo possíveis entre os deteriorados existentes.

No grupo de ligação VIII, onde existe um grande número de determinantes de deterioração mapeados, não foi encontrado qualquer variante deteriorado neste trabalho; o mesmo ocorreu em relação ao grupo de ligação V. Os variantes de deterioração localizados através dos testes de alelismo encontram-se na Figura 5.



Segundo ELLIOTT (1960) três dos oito cromossomos do *A. nidulans* são grandes, dois de tamanho médio, dois pequenos e um muito pequeno. Quanto maior o tamanho físico do cromossomo maior é a probabilidade de ocorrer qualquer fenômeno genético nele. AZEVEDO *et alii* (1983) tentaram correlacionar os grupos de ligação com os cromossomos de *A. nidulans* baseados nos seguintes parâmetros: número de quebras cromossômicas, número médio de recessivos letais, unidades de recombinação e variantes morfológicas. Através destes dados correlacionaram os grupos de ligação VIII, I e VII com os cromossomos de maior tamanho, o II e o III com os cromossomos de tamanho médio e os IV, VI e V com os de menor tamanho, sendo o último o menor deles.

O agrupamento de determinantes de deterioração nos grupos de ligação VIII, I e VII não deve refletir uma localização preferencial mas ser decorrente do tamanho maior destes cromossomos em relação aos outros. De qualquer modo, o fato da maioria dos determinantes de deterioração mapeados no grupo de ligação VIII estarem situados próximos à marca  $ribOB_2$  e vários deles serem alelos não permite que seja descartada a hipótese de que há localização preferencial. Um número maior de variantes deteriorados precisaria ser estudado e dever-se-ia tentar, dentro do possível, realizar testes de alelismo entre os variantes já mapeados.

#### 5.6. Influência da temperatura e do "background" genético na instabilidade mitótica

As aberrações cromossômicas parecem ser uma das mais importantes causas da instabilidade mitótica em fungos filamentosos. Vários fatores, quer físicos ou químicos, são capazes de alterar o padrão normal de instabilidade em linhagens com duplicação cromossômica.

LIEBER (1976a) estudou o efeito da temperatura na instabilidade em linhagens de *A. nidulans* com duplicação cromossômica. Ele observou que, embora as deleções possam ocorrer em qualquer dos dois segmentos em duplicata, na maioria das vezes é o segmento translocado que sofre a elisão. Além disso, a frequência total de deleções, a partir de uma linhagem com duplicação, depende não só da temperatura em que se realiza o crescimento, mas também da linhagem em estudo.

NIFFINEGGER E SOUZA *et alii* (1978) observaram a produção de setores pela linhagem A de *A. nidulans* nas temperaturas de 28°, 37° e 40°C e também o comportamento de segregantes meióticos frente a temperatura de 37°C. Em ambos os casos detectou-se uma variação média de setores por placa.

Neste trabalho foram realizados quatro experimentos, considerando as variáveis temperatura e "background" genético.

Segundo CLUTTERBUCK (1974), as linhagens de Glasgow podem ser consideradas relativamente isogênicas, por terem derivado de um único isolado selvagem. Assim sendo, não faria diferença utilizar o ciclo parassexual ou o ciclo sexual para se isolar os segregantes com diferentes "backgrounds" genéticos.

No ciclo parassexual teriam que ser isolados segregantes haplóides que tivessem substituído em seu genoma um grupo de ligação da linhagem A, que não o I e o II - onde estão localizados os segmentos em duplicata, por um grupo de ligação da linhagem MSE. O problema seria a seleção dos segregantes adequados, contendo os segmentos em duplicata; na haploidização, assim como, nos diplóides, os portadores de duplicações cromossômicas têm seu crescimento inibido.

Neste trabalho foram utilizados os fungicidas Benlate e Chloroneb; embora eles favoreçam o crescimento de haplóides em relação aos diplóides no *A. nidulans* (HASTIE, 1970; SANT'ANA, 1974), parece que estes fungicidas também inibem os haplóides portadores de duplicação.

No ciclo sexual ocorreria permuta entre todos os cromossomos homólogos, mas isto seria desprezível em sendo as linhagens isogênicas. Pela facilidade da utilização, foi escolhido o ciclo sexual, embora a incorporação de apenas uma marca da linhagem MSE por vez - mantendo-se todas as da linhagem A - fosse difícil de ocorrer.

A instabilidade foi detectada pela produção de setores; os dados obtidos pela contagem do número de setores por placa, em cada um dos ensaios, foram transformados antes da análise estatística. Isto porque nos casos de contagens, para uma aplicação válida dos testes de significância, é necessário que os dados tenham uma distribuição normal, ou aproximadamente normal; daí ser comumente necessário algum tipo de transformação de dados.

A transformação em raiz quadrada é a mais indicada quando os dados são representados por números inteiros e os eventos têm pequena probabilidade de ocorrência. BARLETT (1947) mostrou que a transformação em  $\sqrt{x + 1/2}$  é a mais indicada para números entre 0 e 10. Esta foi então utilizada, principalmente porque nos dados obtidos muitas vezes ocorreu ausência de setor.

### 5.6.1. Experimentos I e II

Nos experimentos I e II foram utilizadas as mesmas linhagens, sendo que a variação de temperatura no primeiro foi menor. As médias do número de setores produzidas



nas duas temperaturas mais baixas não diferem entre si, mas ambas diferem da média da temperatura mais alta (Tabelas 39 e 43). No caso do experimento II, uma diminuição de 7°C na temperatura ótima de incubação não alterou marcadamente a instabilidade, mas um aumento de 3°C teve efeito significativo. Isto pode ser devido ao fato da temperatura conveniente para o desenvolvimento do *A. nidulans* variar de 25°C a 42°C (ROPER, 1971); a temperatura mais baixa utilizada neste trabalho ficava mais distante do limite inferior do que a temperatura mais alta. Além disso, tanto para a linhagem normal quanto para linhagens portadoras de duplicação, a taxa de crescimento, medida em termos de extensão linear, é menor à 40°C do que nas outras duas temperaturas (FAVRAUD *et alii*, 1980). Não se sabe se este crescimento mais lento poderia, de alguma forma, propiciar o aumento da instabilidade.

Durante o isolamento dos segregantes com os diferentes "backgrounds" genéticos foi obtido um que, embora produto do cruzamento A x MSE, apresentava apenas as marcas da linhagem A. Esta linhagem e o segregante meiótico semelhante a ela, aparecem designados como linhagens 1 e 2 nos experimentos I e II.

Nas Tabelas 36 e 40 observa-se que há uma variação apreciável no número de setores produzidos pelas duas linhagens, nos diferentes ensaios; se as linhagens são semelhantes em "background", seria esperada menor variação entre elas do que em relação às outras linhagens.

Na Tabela 54 estão representados a média do número de setores (dados transformados) e o número de placas sem setor em cada ensaio dos experimentos I e II, para as linhagens 1 e 2. Levando-se em consideração o número de placas em que não surgiram setores, estes dados já não parecem tão discrepantes. No experimento II, a linhagem 1 apresen-

tou a menor média de setores a  $30^{\circ}\text{C}$ , mas neste ensaio, cinco placas não apresentaram setor. A própria linhagem A apresenta uma ampla variação no número de setores produzidos por placa; quando observou-se 257 colônias, 35,81% delas não apresentaram setor (Tabela 2). Como nos experimentos I e II o número de repetições (sete) de cada linhagem não podia ser aumentado, devido ao número de linhagens ensaiadas, a variação nos valores obtidos deve ser decorrente do tamanho da amostra.

TABELA 54. Relação entre média de setores e número de placas sem setor.

Experimento	Linhagem 1		Linhagem 2	
	Média de <sup>a/</sup> setores	Placas s/setor	Média de <sup>a/</sup> setores	Placas s/setor
Prat. A	1,05	3	1,35	1
I Prat. B	1,34	1	1,46	1
Prat. C	1,36	2	1,63	1
II $30^{\circ}\text{C}$	0,85	5	1,51	0
$37^{\circ}\text{C}$	1,80	1	1,20	4
$40^{\circ}\text{C}$	2,42	0	2,87	0

<sup>a/</sup> Dados transformados.

Na Tabela 39 e 43, os resultados dos testes de Tukey mostram que não há diferença entre as duas linhagens, quando se compara as médias dos três ensaios de cada experimento.

Nos dois experimentos as linhagens 8, 5 e 6 foram as que produziram as menores médias de setores, enquanto a linhagem 2 produziu a maior média; no experimento I ape

nas a linhagem 6 diferiu da 1 (linhagem A), enquanto no experimento II não houve diferença entre qualquer das linhagens em relação à A (Tabelas 39 e 43b).

Nos dois experimentos a fonte de variação repetições dentro de incubador (ou prateleira) apresentou um valor de F significativo ao nível de 5%. A utilização do delineamento em blocos ao acaso permitiu que esta fonte de variação fosse isolada na análise, não aumentando o erro residual. Embora seja citado que em experimentos de laboratório as condições são bastante homogêneas, isto nem sempre ocorre. A variação encontrada entre os blocos pode ser explicada pela perda de calor na frente do incubador, perto da porta.

Para a interação linhagem versus prateleiras, o valor de F encontrado no experimento I não foi significativo, o que pode ser explicado pela menor variação de temperatura que ocorre entre as diferentes prateleiras. No experimento II, quando utilizou-se as três temperaturas, a interação L x I apresentou um valor significativo ao nível de 1%. Este resultado pode ser decorrência das linhagens 2, 5, 6 e 8 apresentarem menor número de setores na temperatura de 37°C, já que de uma maneira geral ocorre uma correlação direta e positiva entre o número de setores e a temperatura. Logo o comportamento dessas linhagens não seria consistente para cada incubador. Mas na Tabela 40 observa-se que estas linhagens, na temperatura de 37°C, não produziram setores em cerca da metade das placas utilizadas no experimento. Como à 40°C o número de setores produzidos aumenta e o número de placas com setor não mostra discrepância entre as diferentes linhagens, não se deve inferir que o comportamento das linhagens não é consistente.

Quando na análise da variância a interação li

nhagem versus incubadores apresenta valor de F significativo, normalmente não se aplica o teste de Tukey juntando os dados das linhagens nas diferentes temperaturas. Mas neste caso é o mais compatível com a realidade, devido ao grande número de placas sem setor nas diversas linhagens à 37°C (Tabela 43b).

Analisando-se os dados dos experimentos I e II, observa-se que o "background" genético por si só não influencia tanto na instabilidade quanto a temperatura; à 30°C as médias de setores produzidas pelas diferentes linhagens não são diferentes entre si, mas com o aumento da temperatura ocorre variação entre as médias das linhagens (Tabela 43).

#### 5.6.2. Experimentos III e IV

No experimento III, na análise da variância, o único valor de F significativo foi o relativo às diferentes temperaturas de incubação; neste caso, as médias do número de setores obtidas em cada uma das temperaturas diferiam entre si (Tabela 47).

Na Tabela 46 observa-se que a diferença entre as linhagens não foi significativa. Este resultado poderia ser explicado pelo fato da variabilidade ter sido restringida, já que utilizou-se no experimento três linhagens com a marca piridoxina e três com a marca galactose, além da linhagem A. Efetuou-se a análise da variância para os dados obtidos com as três linhagens de cada tipo, separadamente; em ambos os casos os valores de F para a fonte de variação entre linhagens foram não significativos. Isto evidencia que estes segregantes meióticos obtidos independentemente, mas com a mesma marca genética, não diferem entre si quanto ao grau de instabilidade.

No experimento IV, sô foi observado aumento na frequência de setores quando a temperatura de incubação variou de 30<sup>o</sup> para 37<sup>o</sup> C; entre 37<sup>o</sup> e 40<sup>o</sup> C não ocorreu diferença significativa (Tabela 51). Logo, além de produzirem poucos setores, estas linhagens não respondem ao aumento da temperatura de maneira similar à encontrada nos outros experimentos.

Os dados obtidos no experimento IV, com relação às três linhagens apenas com a marca tiosulfato e as cinco com mais uma marca da linhagem MSE além de tiosulfato, foram separados e submetidos à análise da variância, em dois grupos isoladamente. Nos dois casos os valores de F para a fonte de variação linhagens foram não significativos.

Em relação à análise dos segregantes somente com a marca tiosulfato, os resultados confirmam os obtidos no experimento III - os segregantes meiôticos com a mesma marca genética não diferem entre si quanto ao grau de instabilidade.

No caso dos segregantes com outra marca além de tiosulfato, o resultado pode ser decorrente da simples presença da marca tiosulfato causar uma diminuição na frequência de setores, não importando que outras marcas possam estar presentes; além disso, o número de setores sendo pequeno, não é possível detectar a diferença entre os segregantes. Isto pode estar ocorrendo, já que em outros experimentos não é possível discriminar entre as médias das diferentes linhagens à 30<sup>o</sup> C, onde a frequência de setores é normalmente a mais baixa (Tabela 43).

### 5.6.3. Obtenção de setores deteriorados nos diferentes experimentos

NIFFINEGGER E SOUZA (1979) observou a influência da temperatura na produção de setores na linhagem A de *Aspergillus nidulans*; utilizou as temperaturas de 30°, 37° e 40°C analisando 40 colônias em cada uma delas. A frequência de setores deteriorados foi de 0,05, 0,08 e 0,04, respectivamente.

PIZZIRANI-KLEINER (1981) utilizou as temperaturas de 28°, 37° e 44°C, analisando o comportamento de 80 colônias da linhagem A em cada uma delas; obteve as seguintes frequências de setores deteriorados - 0,02 a 28°C e 0,03 a 37° e 44°C. Já OLIVEIRA (1982) não encontrou setores deteriorados dentre 40 placas inoculadas com a linhagem A e incubadas a 28°C; nas temperaturas de 37° e 42°C encontrou setores deteriorados numa frequência de 0,07 e 0,03, respectivamente.

No presente trabalho a linhagem A, que estava incluída nos experimentos II, III e IV, foi ensaiada nas temperaturas de 30°, 37° e 40°C. Em cada um dos ensaios, por experimento, foram utilizadas 7 placas. Os dados obtidos nas 21 placas utilizadas em cada uma das temperaturas nos três experimentos citados, estão apresentados na Tabela 55. A frequência de setores deteriorados é semelhante às encontradas por NIFFINEGGER E SOUZA (1979) nas temperaturas de 37° e 40°C (0,10 e 0,05, respectivamente), embora aqui o número de repetições utilizado tenha sido praticamente a metade. A 30°C, a frequência de setores deteriorados encontrada neste trabalho foi significativamente maior (0,29) quando comparada com a de NIFFINEGGER E SOUZA; esta diferença pode ser decorrente do tamanho da amostra e da frequência de setores em geral ser baixa nesta temperatura.

TABELA 55. Produção de setores pela linhagem A em diferentes temperaturas.

Setores	Temperatura		
	30° C	37° C	40° C
Amarelos	6	37	79
Verdes	6	5	9
Deteriorados	5	5	5
Outros	0	2	1
Total	17	49	94

No experimento II, o número de setores deteriorados foi maior nas linhagens 5, 6 e 8, justamente aquelas que produziram a menor média de setores (Tabelas 40 e 43). Do total de 63 setores deteriorados produzidos pelas oito linhagens, 42 foram originados a partir das linhagens 5, 6 e 8.

No experimento IV, as linhagens utilizadas foram as que apresentaram as menores médias de setores por placa. Os setores deteriorados ocorreram com uma frequência relativa alta, sendo superior a 0,30 nas temperaturas de 37° e 40° C (Tabela 49).

Observa-se que quanto menor a frequência de setores em geral produzidos pela linhagem, maior é a frequência de setores deteriorados. Este fato pode estar relacionado à competição; os deteriorados, que têm menor taxa de crescimento, teriam mais possibilidade de não serem suplantados pelo crescimento de setores melhorados.

Em relação à temperatura, observa-se que

30°C a frequência de setores deteriorados por placa é inferior àquela encontrada à 37° e 40°C (Tabela 52).



## 6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. A linhagem A, portadora de uma duplicação cromossômica, não deve ser caracterizada pelo número de setores produzidos por colônia, já que este apresenta variação apreciável, mesmo mantendo-se as condições de cultivo constantes.
2. A elevação da temperatura, dentro dos limites de 30° a 40°C, aumenta a instabilidade da linhagem A e de linhagens dela derivadas com diferentes "backgrounds" genéticos.
3. Diferentes segregantes meióticos com o mesmo marcador genético não apresentam diferenças significativas entre as médias dos setores produzidos.
4. A temperatura tem mais influência na instabilidade do que o "background" genético.
5. Os setores deteriorados aparecem com maior frequência nas

linhagens menos instáveis dentre aquelas com "backgrounds" genéticos diferentes; a temperatura de 37°C é a mais indicada para a obtenção de deteriorados.

6. Quando do isolamento de segregantes meióticos dos variantes deteriorados, para utilização nos testes de alelismo, deve-se selecionar aqueles que apresentem marcadores genéticos que diminuam a instabilidade, como o tiosulfato, para serem mantidos mais facilmente.

## 7. LITERATURA CITADA

- ALIKHANIAN, S.I., 1962. Induced mutagenesis in the selection of microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 4: 1-50.
- APIRION, D., 1962. A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice-versa in micro-organisms. *Nature*, 195: 959-961.
- AZEVEDO, J.L., 1971. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. England, University of Sheffield, 240 p. (Ph.D. Thesis).
- AZEVEDO, J.L., 1975. Altered instability due to genetic change in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 26: 55-61.
- 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. SANT'ANA, 1975. The use of Chloroneb to obtain haploid segregants from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 13:6.

- AZEVEDO, J.L., A. OLIVEIRA e A.J. ROCHA CAMPOS, 1976. Replí-  
cador multifio para transferência de esporos de fungos fi-  
lamentosos. *Summa Phytopathologica*, 2: 237-241.
- AZEVEDO, J.L., E.P. SANTANA e R. BONATELLI JR., 1977.  
Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-  
-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*,  
48: 163-172.
- AZEVEDO, J.L., A.A. PIZZIRANI-KLEINER e M.M.C. DANTAS-DARCE,  
1983. Survival of haploid, diploid and disomic conidia  
of *Aspergillus nidulans* to mutagenic agents. *Revista de  
Biologia*, 12: 271-278.
- BAINBRIDGE, B.W. e J.A. ROPER, 1966. Observations on the  
effects of a chromosome duplication in *Aspergillus  
nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 42:417-424.
- BALL, C., 1966. Instability associated with chromosome  
translocation in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 21: 531.
- BARNETT, W.E. e F.J. DE SERRES, 1963. Fixed genetic  
instability in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 48: 717-723.
- BARTLETT, M.S., 1947. The use of transformations.  
*Biometrics*, 3:39-52.
- BEALE, G.H. e A.C. FABERGÉ, 1941. Effect of temperature on  
the mutation rate of an unstable gene in *Portulaca  
grandiflora*. *Nature*, 147:356-357.
- BIANCO, M., S.O.P. COSTA, V.D.M. PACE, C.A. BUSKO, M. MELLY  
e M. BITTAR, 1982. Influência do transposon canamicina  
na instabilidade da protease em *Proteus mirabilis*. In:  
IXª Reunião Anual de Genética de Microrganismos, Brasília,  
p. 26.

- BIRKETT, J.A. e J.A. ROPER, 1975. A temperature sensitive phenotype associated with the TVI-VII translocation, *Aspergillus News Letter*, 13: 7-8.
- BIRKETT, J.A. e J.A. ROPER, 1977. Chromosome aberrations in *Aspergillus nidulans*. In; SMITH, J.E. e J.A. PATEMAN, Ed. *Genetics and Physiology of Aspergillus*. London, Academic Press, p. 293-303.
- BONATELLI JR., R. e J.L. AZEVEDO, 1977. Effects of ethidium bromide in diploid and duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Experientia*, 33: 311-312.
- BURNS, J.A. e D.U. GERSTEL, 1967. Flower color variegation and instability of a block of heterochromatin in *Nicotiana*. *Genetics*, 57:155-167.
- BURR, K.W., J.A. ROPER e J. RELTON, 1982. Modification of chromosome instability in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 128: 2899-2907.
- CALOS, M.P. e J.H. MILLER, 1980. Transposable elements. *Cell*, 20: 579-595.
- CAMERON, J.R., E.Y. LOH e R.W. DAVIS, 1979. Evidence of transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell*, 16: 739-751.
- CASE, B.L. e J.A. ROPER, 1978. Conidiospore size in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 14: 20-23.
- CASE, B.L. e J.A. ROPER, 1981. Mitotic processes which restore genome balance in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 124:9-16.
- CLARKE, C.H. e D.M. SHANKEL, 1975. Antimutagenesis in microbial systems. *Bacteriological Reviews*, 39: 33-53.

- CLUTTERBUCK, A.J., 1970. A variegated position effect in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 16: 303-316.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1974. *Aspergillus nidulans*. In: KING, R.C., Ed. *Handbook of Genetics*. New York, Plenum Press, v. 1, p. 447-510.
- COOKE, P., J.A. ROPER e W. WATMOUGH, 1970. Trypan blue-induced deletions in duplications strains of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 226: 276-277.
- CROFT, J.H., 1966. A reciprocal phenotypic instability affecting development in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 21: 565-579.
- DAWSON, G.W.P. e P.F. SMITH-KEARY, 1963. Episomic control of mutation in *Salmonella typhimurium*. *Heredity*, 18:1-20.
- DEMEREK, M., 1926. Miniature-alpha; a second frequently mutating character in *Drosophila virilis*. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, 12: 687-690.
- DEMEREK, M., 1931. Behavior of two mutable genes in *Delphinium ajacis*. *Journal of Genetics*, 24: 179-193.
- DEMEREK, M., 1932. Effect of temperature on the rate of change of the unstable miniature 3-gamma gene of *Drosophila virilis*. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, 18:430-434.
- DEMEREK, M., 1937. Frequency of spontaneous mutations in certain stocks of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 22: 469-478.
- DEMEREK, M., 1941. Unstable genes in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 9: 145-150.

- DOOLITTLE, W.F. e G. SAPIENZA, 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, 284: 601-603.
- EGEL, R., 1976. The genetic instabilities of the mating-type locus in fission yeast. *Molecular General Genetics*, 145: 281-286.
- ELLIOTT, C.G., 1960. The cytology of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 1: 462-476.
- EMERSON, R.A., 1914. The inheritance of a recurring somatic variation in variegated ears of maize. *American Naturalist*, 48: 87-115.
- ENGELS, W.R., 1983. The P family of transposable elements in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics*, 17: 315-344.
- FABERGÉ, A.C. e G.H. BEALE, 1942. An unstable gene in *Portulaca*; mutation rate at different temperatures. *Journal of Genetics*, 43: 173-187.
- FAVRAUD, L., D.R. NIFFINEGGER E SOUZA e J.L. AZEVEDO, 1980. Taxa de crescimento e instabilidade em linhagens de *Aspergillus nidulans* com duplicação. *Ciência e Cultura*, Suplemento, 7: 692.
- FINCHAM, J.R.S., 1973. Localized instabilities in plants - a review and some speculations. *Genetics*, Supplement, 73: 195-205.
- FINCHAM, J.R.S. e B.J. HARRISON, 1967. Instability at the *pal* locus in *Antirrhinum majus*. II. Multiple alleles produced by mutation of one original unstable allele. *Heredity*, 22: 211-224.

- FINCHAM, J.R.S. e G.R.K. SASTRY, 1974. Controlling elements in maize. *Annual Review of Genetics*, 8: 15-50.
- GABRIELLI, A.C. e J.L. AZEVEDO, 1980. A strain of *Aspergillus nidulans* producing a high frequency of disomics. *Transactions of the British Mycological Society*, 75: 15-20.
- GAVAZZI, G., 1975. Transposition of a member of a duplicated region in maize. *Heredity*, 35: 389-400.
- GAVAZZI, G., M. SANDRI, G. ANZANI e A. GHIDONI, 1977. Chromosomal instability associated with duplications in maize. *Heredity*, 38: 349-358.
- GERSTEL, D.U. e J.A. BURNS, 1967. Phenotypic and chromosomal abnormalities associated with the introduction of heterochromatin from *Nicotiana otophthora* into *N. tabacum*. *Genetics*, 56: 483-502.
- GOLDSTEIN, A. e J.S. SMOOT, 1955. A strain of *Escherichia coli* with an unusually high rate of auxotrophic mutation. *Journal of Bacteriology*, 70: 588-595.
- GREEN, M.M., 1967. The genetics of a mutable gene at the white locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 56: 467-482.
- GREEN, M.M., 1969a. Mapping a *Drosophila melanogaster* "controlling element" by interallelic crossing-over. *Genetics*, 61: 423-428.
- GREEN, M.M., 1969b. Controlling element mediated transpositions of the white gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 61: 429-441.
- GREEN, M.M., 1970. The genetics of a mutator gene in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 10: 353-363.



- GREEN, M.M., 1975. Genetic instability in *Drosophila melanogaster*; mutable miniature ( $m^u$ ). *Mutation Research*, 29: 77-84.
- GREER, H. e G.R. FINK, 1979. Unstable transpositions of *his 4* in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, U.S.A., 76: 4006-4010.
- GUNDERSEN, W.B., K. JYSSUM e S. LIE, 1962. Genetic instability with episome - mediated transfer in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 83: 616-623.
- HASTIE, A.C., 1970. Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, 226: 771.
- JINKS, J.L., 1966. Extranuclear inheritance. In: AINSWORTH, G.C. e A.S. SUSSMAN, Ed. *The Fungi - An advanced treatise*. New York, Academic Press, v. 2, p. 619-660.
- KÄFER, E., 1960. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 186: 619-620.
- KÄFER, E., 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46: 1581-1609.
- KLECKNER, N., 1977. Translocatable elements in procaryotes. *Cell*, 11: 11-23.
- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with para-fluorophenylalanine. *Nature*, 190: 744.
- LIEBER, M.M., 1976a. The effects of temperature on genetic instability in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 34: 93-122.

- LIEBER, M.M., 1976b. The genetic instability and mutagenic interaction of chromosomal duplications present together in haploid strains of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 37: 33-66.
- MAJERFELD, I.H. e J.A. ROPER, 1978. The effects of coumarin on the frequency of deletions in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 159: 203-206.
- McCLINTOCK, B., 1951. Chromosome organization and gene expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 16: 13-47.
- McCLINTOCK, B., 1953. Induction of instability at selected loci in maize. *Genetics*, 38: 579-599.
- McCLINTOCK, B., 1955. Intranuclear systems controlling gene action and mutation. *Brookhaven Symposia Biology*, 8: 58-71.
- McCLINTOCK, B., 1956. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 21: 197-216.
- McCLINTOCK, B., 1961. Some parallels between gene control systems in maize and in bacteria. *American Naturalist*, 95: 265-277.
- McCULLY, K.S. e E. FORBES, 1965. The use of p-fluorophenyl alanine with "master" strains of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research*, 6: 352-359.
- MENEZES, E.M., 1974. Análise genética de variantes deteriorados e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP, 114 p. (Dissertação de Mestrado).

- MENEZES, E.M. e J.L. AZEVEDO, 1978. Reversion in variants from a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 164:255-258.
- MILLINGTON-WARD, A.M., 1967. A vegetative instability in *Aspergillus nidulans*. *Genetica*, 38: 191-207.
- MOHN, G. e F.E. WÜRGLER, 1972. Mutator genes in different species. *Humangenetik*, 16: 49-58.
- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregation induced by p-fluorophenylalanine. *Aspergillus News Letter*, 2: 10.
- MULLER, H.J., 1928. The measurement of gene mutation rate in *Drosophila*, its high variability and its dependence on temperature. *Genetics*, 13: 280-357.
- MÜLLER, I. e A.P. JAMES, 1961. The influence of genetic background on the frequency and the direction of radiation-induced mutations affecting a quantitative character. *Genetics*, 46: 1721-1733.
- NEVERS, P. e H. SAEDLER, 1977. Transposable genetic elements as agents of gene instability and chromosomal rearrangements. *Nature*, 268:109-115.
- NEWMEYER, D., 1965. Somatic instability in *Neurospora* resulting from a pericentric inversion. *Genetics*, 52: 462-463.
- NEWMEYER, D. e C.W. TAYLOR, 1967. A pericentric inversion in *Neurospora* with unstable duplication progeny. *Genetics*, 56: 771-791.
- NEWMEYER, D. e D.R. GALEAZZI, 1977. The instability of *Neurospora* duplication Dp (IL → IR) H4250, and its genetic control. *Genetics*, 85:461-488.

- NEWMAYER, D. e D.R. GALEAZZI, 1978. A meiotic U.V. - sensitive mutant that causes deletion of duplications in *Neurospora*. *Genetics*, 89: 245-270.
- NEWMAYER, D., A. SCHROEDER e D.R. GALEAZZI, 1978. An apparent connection between histidine, recombination and repair in *Neurospora*. *Genetics*, 89: 271-280.
- NEWTON, S.M.C., M. BIANCO e S.O.P. COSTA, 1982. Mutação em alta frequência do gene da C.P.S. Possível participação de um transposon em *Proteus mirabilis*. *Ciência e Cultura*, Suplemento, 7: 709.
- NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1966. A chromosomal process giving rise to vegetative instability in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 21: 530-531.
- NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1968. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 58: 193-209.
- NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1969. A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 14: 63-70.
- NIFFINEGGER E SOUZA, D.R., 1979. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 244 p. (Dissertação de Mestrado).
- NIFFINEGGER E SOUZA, D.R., L. FAVRAUD e J.L. AZEVEDO, 1978. Influência da temperatura e do "background" genético na instabilidade em *Aspergillus nidulans*. *Relatório Científico*. Instituto de Genética, Piracicaba, ESALQ/USP, 12: 194-200.
- OHNO, S., 1970. *Evolution by Gene Duplication*. New York, Springer-Verlag. 160 p.

- OLIVEIRA, F.M., 1982. Análise genética de setores melhora- dos de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 101 p. (Tese de Doutorado).
- ORGEL, L.E. e F.H.C. CRICK, 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, 284: 604-607.
- PACCOLA, L.D., 1982. Estudos genético e citológico em vari- antes deteriorados de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba , ESALQ/USP, 131 p. (Dissertação de Mestrado).
- PAES DE BARROS, J., 1977. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piraci caba, ESALQ/USP, 81 p. (Dissertação de Mestrado).
- PALMER, H.M. e J.A. ROPER, 1970. Induced deletions in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 11: 20.
- PARAG, Y. e J.A. ROPER, 1975. Genetic control of chromosome instability in *Aspergillus nidulans* as a mean for gene amplification in eukaryotic microorganism. *Molecular General Genetics*, 140: 275-287.
- PERKINS, D.D. e E.G. BARRY, 1977. The cytogenetics of *Neurospora*. *Advances in Genetics*, 19: 133-285.
- PIMENTEL GOMES, F., 1976. *Curso de Estatística Experimental*. 6ª ed. Piracicaba, Livraria Nobel. 430 p.
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A., 1981. Efeito do gene *binA<sub>1</sub>* na for- mação de conídios de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 141 p. (Tese de Doutorado).
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONS, K.D. MACDONALD e A.W.J. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5: 141-238.

- PONTECORVO, G., E. TARR GLOOR e E. FORBES, 1954. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Genetics*, 52: 226-237.
- PONTECORVO, G. e E. KÄFER, 1958. Genetic analysis based on mitotic recombination. *Advances in Genetics*, 9: 71-104.
- RASMUSON, B. e M.M. GREEN, 1974. Genetic instability in *Drosophila melanogaster*. A mutable tandem duplication. *Molecular General Genetics*, 133: 249-260.
- REANNEY, D., 1979. RNA splicing and polynucleotide evolution. *Nature*, 277: 598-600.
- RHOADES, M.M., 1941. The genetic control of mutability in maize. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 9: 138-144.
- ROBERTS, C.F., 1959. A replica plating technique for the isolation of nutritionally exacting mutants of a filamentous fungus (*A. nidulans*). *Journal of General Microbiology*, 20: 540-548.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8: 14-15.
- ROPER, J.A., 1971. *Aspergillus*. In: HOLLAENDER, A., Ed. *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection*. New York, Plenum Press, v. 2, p. 343-363.
- ROPER, J.A., e B.H. NGA, 1969. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*; the production of hypodiploid and hypohaploid nuclei. *Genetical Research*, 14: 127-136.
- ROSATO, Y.B., 1973. Efeitos do etil-metano-sulfonato e acriflavina na instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 74 p. (Dissertação de Mestrado).

- ROSATO, Y.B., e J.L.AZEVEDO, 1978. Acriflavine and ethyl methanesulfonate - induced mutants of *Aspergillus nidulans* strains with chromosome duplication. *Revista Brasileira de Genética*, 1: 247-262.
- SAGER, R., 1979. Transposable elements and chromosomal rearrangements in cancer - a possible link. *Nature*, 282: 447-448.
- SAND, S.A., 1957. Phenotypic variability and the influence of temperature on somatic instability in cultures derived from hybrids between *Nicotiana langsdorffii* and *N. sanderae*. *Genetics*, 42: 685-703.
- SAND, S.A., 1962. Temperature response of the genetically stable R locus in comparison with the mutable V locus in a clone of *Nicotiana*. *Nature*, 196: 91-92.
- SANT'ANA, E.P., 1974. Alteração na frequência de recombinação mitótica e mutantes resistentes a fungicidas em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP, 63 p. (Dissertação de Mestrado).
- SEXTON, C.E. e J.A. ROPER, 1984. Spontaneous duplications and transpositions of a large chromosome segment in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 130: 583-595.
- SHAPIRO, J.A., 1983. *Mobile Genetic Elements*. New York, Academic Press. 688 p.
- SINGH, M. e U. SINHA, 1976. Chloral hydrate induced haploidization in *Aspergillus nidulans*. *Experientia*, 32: 1144-1145.

- SMITH, H.H. e S.A. SAND, 1957. Genetic studies on somatic instability in cultures derived from hybrids between *Nicotiana langsdorffii* and *N. sanderae*. *Genetics*, 42: 560-582.
- SMITH-KEARY, P.F., 1958. An unstable mutation in *Salmonella typhimurium*. *Nature*, 181: 1672.
- SNEDECOR, G.W. e W.G. COCHRAN, 1980. *Statistical Methods*. 7ª ed. Ames, Iowa State University Press. 507 p.
- STARLINGER, P., 1977. DNA rearrangements in procaryotes. *Annual Review of Genetics*, 11: 103-126.
- STELL, R.G.D. e J.H. TORRIE, 1960. *Principles and Procedures of Statistics*. New York, McGraw-Hill Book Company. 481 p.
- TAYLOR, A.L., 1963. Bacteriophage - induced mutation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 50: 1043-1051.
- TREFFERS, H.P., V. SPINELLI e N.O. BELSER, 1954. A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 40: 1064-1071.
- VON BORSTEL, R.C., S.K. QUAH, C.M. STEINBERG, F. FLURY e D. J.C. GOTTLIEB, 1973. Mutants of yeast with enhanced spontaneous mutation rates. *Genetics, Supplement*, 73: 141-151.
- WEISBERG, R.A. e S. ADHYA, 1977. Illegitimate recombination in bacteria and bacteriophage. *Annual Review of Genetics*, 11: 451-473.



ZUCCHI, T.M.A.D., 1975. Instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina/USP, 96 p. (Tese de Doutorado).

ZUCCHI, T.M.A.D. e J.L. AZEVEDO, 1979. Mitotic instability in a III-VIII duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Revista Brasileira de Genética*, 2: 93-108.