

ESTUDOS GENÉTICO E CITOLÓGICO EM VARIANTES
DETERIORADOS DE *Aspergillus nidulans*

LUZIA DORETTO PACCOLA

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Julho - 1982

À

Jandira e Ernesto Paccola

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

Expressamos o nosso agradecimento à todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

- Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação, confiança e exemplo.
 - Prof.^a Aline Pizzirani-Kleiner, pela colaboração.
 - Prof.^a Flávia Maria de Oliveira, pela valiosa contribuição e apoio constante.
 - Prof.^a Yoko B. Rosato, pela atenção, sugestões oferecidas, e auxílio na execução das fotomicrografias.
 - Prof. Cláudio Lopez de Souza Júnior, pela inestimável orientação na execução das análises estatísticas.
- Genovefa Peisino, pelas sugestões e cooperação amiga; Maria Helena Fungaro, Geraldo Costa Sampaio e José Albertino Lordelo, pela convivência e alegrias compartilhadas.
- Antonio Carlos Monteiro, pelo incentivo e colaboração.
 - Instituto de Genética da ESALQ/USP, na pessoa de seu Diretor Prof. Ernesto Paterniani.
 - Professores do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

- Colegas do Curso de Pós-Graduação pelo companheirismo e esperanças compartilhadas.
- Funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP, e em particular: *Antônio José Rocha Campos*, *Luiz Próspero* e *Paulo Ortolan*, pela eficiência nos serviços técnicos prestados e carinho recebido.
- *Srs. José Bróglia* e *Cleusval Bissi*, pelos trabalhos de montagem, fotografia e datilografia.
- Amigos do Departamento de Biologia Geral do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade concedida.
- Universidade Estadual de Londrina, que através do convênio PICD-CAPES concederam-me a Bolsa de Estudos.

CURRICULUM VITAE

LUZIA DORETTO PACCOLA, natural de Bernardino de Campos, Estado de São Paulo, licenciou-se em Ciências Biológicas pela Fundação Estadual de Londrina em 1977. Iniciou a carreira universitária nessa mesma Universidade em 1978 na qualidade de Auxiliar de Ensino no Departamento de Biologia Geral.

Ingressou no Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em 1980.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
RESUMO	xiii
SUMMARY.	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.	3
2.1. Mediadores de recombinação ilegítima.	4
2.2. Instabilidade cromossômica em fungos.	7
2.3. Aberrações cromossômicas.	12
2.4. Aberrações cromossômicas estruturais.	14
2.4.1. Translocações.	16
2.4.1.1. Importância das translocações	19
2.4.2. Inversões.	22
2.4.2.1. Importância das inversões	24
2.4.3. Deleções e duplicações	25
2.4.3.1. Importância das deleções e duplicações. .	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.	32
3.1. Linhagens utilizadas.	32
3.2. Marcadores genéticos e fenótipos das marcas utilizadas. .	35
3.3. Meios de cultura e soluções	36
3.3.1. Meio mínimo.	36
3.3.2. Meio completo.	36

	<u>Página</u>
3.3.3. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo..	37
3.3.4. Meio mínimo de galactose.	37
3.3.5. Meio de acetato de amônia	37
3.3.6. Solução de vitaminas.	38
3.3.7. Suplementos adicionados ao meio mínimo.	38
3.3.8. Solução salina 0,85%.	39
3.3.9. Solução tween "80"	39
3.3.10. Solução de cloroneb 2%.	39
3.3.11. Solução benlate.	40
3.3.12. Solução de <i>p</i> -fluorofenilalanina (<i>p</i> -FA)	40
3.3.13. Solução de albumina 5%.	40
3.3.14. Solução tampão fosfato pH 6,9	41
3.3.15. Solução estoque Giemsa.	41
3.3.16. Solução Helly.	41
3.3.17. Formol neutro	42
3.3.18. Fixador Carnoy.	42
3.3.19. Meios de análise.	42
3.4. Esterilização e incubação.	43
3.5. Equipamentos para microscopia e fotografias.	43
3.6. Obtenção espontânea e manutenção dos variantes deteriorados.	43
3.7. Análise genética	44
3.7.1. Obtenção do heterocário	44
3.7.2. Análise genética através do ciclo parassexual . .	44
3.7.2.1. Isolamento de diplóides.	44
3.7.2.2. Análise mitótica.	45
3.7.3. Análise meiótica.	46
3.7.4. Teste de alelismo	47

	<u>Página</u>
3.8. Análises citológicas.	48
3.8.1. Contagem de ascósporos no interior de cada asco. .	48
3.8.2. Coloração de asco.	49
3.8.2.1. Fixação.	49
3.8.2.2. Albuminização	49
3.8.2.3. Hidrólise	49
3.8.2.4. Lavagem	50
3.8.2.5. Coloração	50
3.8.2.6. Montagem.	50
3.8.3. Coloração de conídios.	52
3.9. Análises estatísticas.	52
4. RESULTADOS.	55
4.1. Obtenção de variantes deteriorados.	55
4.2. Análises genéticas dos variantes deteriorados	57
4.2.1. Cruzamentos controles.	57
4.2.2. Variantes deteriorados	60
4.2.2.1. V ₂₅	60
4.2.2.2. V _{5.2}	65
4.2.2.3. V ₆₇	68
4.2.2.4. V ₆₈	72
4.3. Análises citológicas.	74
4.3.1. Análise de ascos	74
4.3.2. Diâmetro de conídios e seus núcleos; número de nú- cleos.	83

	<u>Página</u>
5. DISCUSSÃO.	88
5.1. Características dos variantes deteriorados.	88
5.2. Análises genéticas.	89
5.2.1. Cruzamentos controles.	89
5.2.2. Variantes deteriorados	89
5.3. Análise de ascos e ascósporos	100
5.4. Núcleos e conídios.	105
5.5. Efeito de diferentes agentes na haploidização	107
6. CONCLUSÕES.	109
7. BIBLIOGRAFIA	111

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Linhagens e variantes utilizados.	34
2 - Concentrações finais de benlate no meio de cultura . . .	46
3 - Número de setores obtidos espontaneamente a partir da linhagem A.	55
4 - Segregantes haplóides de A//MSE e ppy//MSE	58
5 - Análise meiótica dos cruzamentos A//MSE e ppy//MSE . . .	59
6 - Segregação meiótica das marcas para cor nos cruzamentos controles.	60
7 - Análise mitótica do variante V_{25}	62
8 - Análise meiótica do variante V_{25}	63
9 - Segregação meiótica do fenótipo deteriorado: $V_{25} \times MSE$. .	64
10 - Análise mitótica do variante $V_{5.2}$	66
11 - Análise meiótica de $V_{5.2}$	66
12 - Análise da segregação meiótica do fenótipo deteriorado de $V_{5.2}$	67
13 - Análise mitótica do variante V_{67}	69

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
14 - Análise meiótica do variante V_{67}	70
15 - Segregação do fenótipo deteriorado V_{67}	71
16 - Análise mitótica do variante V_{68}	73
17 - Diâmetros médios (\hat{m}) e respectivos desvios padrões (s) de ascos com diferentes números de ascósporos.	75
18 - Análise da variância considerando o diâmetro médio dos ascos em grupos com 8 - 7 - 6 - 5 - 4 ascósporos	76
19 - Valores médios (\hat{m}) e os desvios padrões (s) de 30 conídios e núcleos haplóides em alguns variantes deteriorados e nas linhagens A, MSE e ppy.	84
20 - Análise da variância da medida de diâmetro de conídios e núcleos haplóides de variantes deteriorados e das li- nhagens A, MSE e ppy.	85
21 - Comparação das médias dos diâmetros de núcleos e conídios através do teste de Tukey, de variantes deteriora- dos e das linhagens A, MSE e ppy.	86
22 - Frequência de conídios haplóides uni, bi e trinucleados no variante V_{32} gal níc ac.	87

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	- Marcadores genéticos do <i>A. nidulans</i> utilizados.	33
2	- Variantes deteriorados utilizados para estudos genéticos e citológicos.	56
3	- Segregantes normais e deteriorados (compactos e não compactos) do cruzamento $V_{5.2} \times MSE$	68
4	- Possível constituição do variante V_{68} , com relação aos grupos de ligação I e II.	72
5	- Reta obtida através da equação de regressão.	77
6	- Ascospores contendo esporos abortivos	78
7	- Ascospores contendo um número de ascospores inferior a 8.	79
8	- Asco proveniente do cruzamento $V_{5.2} \times MSE$	80
9A	- Asco do cruzamento A \times MSE.	81
9B	- Asco do cruzamento ppy \times MSE	81
10	- Asco proveniente do cruzamento $V_{25} \times MSE$, corado pela técnica HCl-Giemsa.	82
11	- Conídios uni, bi e trinucleados do variante $V_{32} gal nic ac$	83

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
12	- Possível constituição da linhagem V_{25} dissômica para o grupo de ligação VI e do diplóide V_{25}/MSE	92
13	- Modelo proposto para explicar a segregação mitótica dos cromossomos I e VI de diplóides V_{25}/MSE	93
14	- Permuta mitótica e segregação no diplóide V_{25}/MSE , considerando uma translocação VIII - VII.	94
15	- Origem e constituição de ascas contendo esporos deficientes, provenientes de cruzamentos entre linhagem portadora de translocação insercional com linhagem normal, tendo ou não ocorrido permuta única.	103
16	- Pareamento meiótico de uma translocação insercional invertida com seu cromossomo cromólogo normal, ocorrendo permuta nas alças e posterior segregação.	104

ESTUDOS GENÉTICO E CITOLÓGICO EM VARIANTES
DETERIORADOS DE *Aspergillus nidulans*

Luzia Doretto Paccola

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

- Orientador -

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo o estudo genético e citológico de setores deteriorados em *A. nidulans*, originados a partir de uma linhagem portadora de duplicação cromossômica. Localizou-se os determinantes de deterioração e, com apenas uma exceção quando dois genes estavam envolvidos, e nos demais casos um único determinante de deterioração foi responsável pela morfologia alterada. Foi feita a análise citológica dos ascospores provenientes de cruzamentos destes variantes com a linhagem MSE, constatando-se a presença de ascospores defectivos em algumas linhagens. Também a comparação entre três agentes haploidizantes (clonob, benlate, pFA), foi observada.

Verificou-se que, além dos determinantes de deterioração, algumas das linhagens são também portadoras de aberrações cromossômicas estruturais, às quais não apenas causam alterações morfológicas, mas também um padrão de inviabilidade semelhante àqueles verificados em outros seres vivos. A presença de duplicação alterou o diâmetro dos núcleos nas linhagens portadoras e em variantes deteriorados. Finalmente mostrou-se

que a estocagem e repicagem sucessiva, durante um longo tempo desses variantes deteriorados, podem levar à alterações no genoma dos mesmos, devido à instabilidade do sistema e possivelmente à presença de elementos transponíveis.

GENETICAL AND CYTOLOGICAL STUDY IN DETERIORATED
VARIANTS OF THE *Aspergillus nidulans*

Luzia Doretto Paccola

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

- Adviser -

SUMMARY

This research was carried out aiming the study of deteriorated sectors which appear in strains with chromosome duplications in *A. nidulans*. One deterioration determinant was found in each analysed variant, with just one exception where two determinants were involved. It was made a cytological analysis of ascus obtained from crossings between these variants and a master strain. The pattern of action of three haploidizant agents, Cloroneb, Benlate and pFA was also observed.

Besides determinants of deterioration, some strain were also carriers of chromosomal structural aberrations which not only caused morphological alteration but also an inviability pattern similar to those found in other organisms. The duplication modified the nuclear diameter of the conidia in carrier strain and in deteriorated variants. Finally it was showed that storage and successive replication of deteriorated variants during a long period may lead to genome alterations due to the instability of the system possible due to the presence of transposable elements.

1. INTRODUÇÃO

A mutação e a recombinação são dois mecanismos responsáveis pelas variações genéticas individuais ou de populações, e exercem um importante papel evolutivo. As mutações que ocorrem a nível do cromossomo levam à rearranjos na estrutura linear dos genes e podem ser detectados citológica e geneticamente em materiais favoráveis. No fungo filamentosso *A. nidulans*, estudos genéticos a esse respeito, são favorecidos pela natureza do material; entretanto o mesmo não ocorre com as análises citológicas, que apresentam maior dificuldade devido ao tamanho reduzido dos cromossomos desta espécie (ELLIOTT, 1960). A presença de duplicações cromossômicas e a transposição dos segmentos em duplicata para novos locais no genoma torna a maioria das linhagens desse fungo instáveis mitoticamente produzindo três tipos de setores designados de melhorados, deteriorados e heterocarióticos. A instabilidade pode ser alterada por uma série de agentes físicos ou químicos.

Os efeitos das aberrações cromossômicas na meiose são bem conhecidos e não só conduzem ao aparecimento de produtos inviáveis, como também interferem no pareamento e na formação de quiasmas, reduzindo a

freqüência de permutas.

O presente trabalho teve por objetivo a obtenção espontânea de setores deteriorados a partir de uma linhagem portadora de duplicação, a localização dos determinantes de deterioração e das aberrações cromossômicas através de análises genéticas utilizando os ciclos sexual e parassexual. Objetivou também a análise citológica de variantes deteriorados, com relação ao tamanho de conídios e respectivos núcleos e dos ascospores quanto ao seu diâmetro e número de ascosporos viáveis e inviáveis contidos no seu interior. Foi também considerado de interesse a comparação entre três agentes haploidizantes em linhagens portadoras de aberrações cromossômicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O termo "recombinação ilegítima" foi usado por CAMPBELL (1962) para descrever certos rearranjos cromossômicos, tais como, deleções, duplicações, inversões e translocações que se caracterizam por serem obtidos independentemente das funções recombinacionais normais e de homologia de bases entre os segmentos cromossômicos participantes. Portanto elas envolvem recombinação entre regiões cromossômicas aparentemente não homólogas, o que leva a uma alteração na sequência de informações genéticas. Esses processos, em muitos casos observados com alta frequência, despertaram especulações sobre seu significado biológico. As recombinações ilegítimas, além de serem importantes mediadores de evolução e de diferenciação (HOZUMI e TONEGAWA, 1976) são também responsáveis pela instabilidade de vários dos sistemas genéticos (NEVERS e SAEDLER, 1977).

2.1. Mediadores de recombinação ilegítima

Alterações drásticas na organização cromossômica foram frequentemente encontradas com locos contendo "elementos controladores" (McCLINTOCK, 1951; 1953; 1955; 1956; 1965; PETERSON, 1968; 1970a; 1970b; 1976; FINCHAM e SASTRY, 1974; COHEN e KOPECKO, 1976) que regulam a expressão fenotípica em milho. Entretanto um "elemento controlador" não permanece fixo em um sítio no cromossomo, mas é capaz de mover-se de uma posição à outra, causando instabilidade na expressão gênica e alterações estruturais em cada novo loco. Dessa forma, os elementos controladores foram relatados como possíveis agentes de recombinação ilegítima.

Muitas das mutações e rearranjos promovidos por elementos genéticos transponíveis (transposons) são deletérios. Entretanto, algumas mutações mediadas por segmentos de DNA transponíveis oferecem vantagens seletiva e adaptabilidade ao organismo.

Sistemas translocacionais tem sido estudados em vários organismos, desde bactéria até o homem.

DAWSON e SMITH-KEARY (1963), propuseram o nome de "epissomos controladores" aos elementos responsáveis pela instabilidade em *Salmonella*.

SAEDLER e STARLINGER (1967), isolaram a seqüência de inserção (IS) em procariotos. As propriedades de elementos IS em bactérias e elementos controladores em milho foram descritas em detalhes por

FINCHAM e SASTRY (1974). As sequências IS além de controlar a expressão gênica, também foram encontradas em associação com aberrações cromossômicas (REIF e SAEDLER, 1975).

O bacteriófago Mu-1 responsável pela mutação polar através de sua inserção no cromossomo de *E. coli*, semelhante às IS, foi descrito por COHEN (1976).

A estrutura molecular dessas sequências, assim como suas funções, tem sido recentemente estudadas (SAEDLER *et alii*, 1980; CORNELIS e SAEDLER, 1980; AVERSWALD *et alii*, 1980; GRINDLEY e JOYCE, 1980).

Um grande número de elementos genéticos transponíveis bacterianos codificam também resistência à vários antibióticos. Eles são de interesse devido a sua importância na proliferação entre populações bacterianas, resistentes à terapêutica dos antibióticos, bem como podem ser usados como sistema modelo para estudos dos processos de transposição (KLECKNER *et alii*, 1979; GRINDLEY e JOYCE, 1980; ROTHSTEIN *et alii*, 1980).

Transposição da região *Lac* do cromossomo de *E. coli*, através do episossomo F *lac* foi estudada por vários autores (BECKWITH e SIGNER, 1966; BECKWITH *et alii*, 1966; IPPEN *et alii*, 1971).

Os elementos transponíveis incapazes de replicação autônoma foram classificados ou como transposons, quando transportam genes detectáveis, ou como sequências de inserção, quando não transportam genes detectáveis. Transposons normalmente são flanqueados por sequências de DNA repetitivo, e algumas dessas sequências parecem ser elementos IS. Em

alguns casos os terminais repetidos podem ter orientação direta (IIDA e ARBER, 1980) ou invertida (SO *et alii*, 1979).

IIDA *et alii* (1980), mostraram que elementos IS_1 podem causar deterioração dos transposons, ou por deleção, excisão ou por recombinação homóloga. Os mesmos autores observaram que transposons flanqueados com terminais repetidos invertidos são mais estáveis que aqueles flanqueados com terminais repetitivos diretos.

O primeiro alelo mutável em *D. melanogaster* foi o alelo w^c no loco "white" (GREEN, 1967; 1969; 1973). Com base na instabilidade de w^c e na instabilidade de mutantes em milho quando associados com elementos transponíveis, como estudado por McCLINTOCK (1965), GREEN sugere que a mutação w^c pode resultar da presença de um elemento translocável no loco "white".

Estudos citológicos em cromossomos de glândulas salivares de *Drosophila* foram feitos com a finalidade de se localizar os elementos transponíveis, através de bandamento pela observação de bandas extras inseridas entre as bandas padrões), (LIM, 1980; ISING e BLACK, 1980).

Em plantas, elementos genéticos transponíveis são bem estudados em milho. Esses estudos tiveram seu início quando EMERSON (1914; 1917) descreveu o elemento controlador $P-vv$, localizado no loco pericarpo. Recentemente tem-se observado elementos controladores em *Antirrhinum majus* e *Impatiens balsamina* (SASTRY *et alii*, 1980).

Elementos genéticos transponíveis também foram encontrados

em *Saccharomyces cerevisiae* (LATEN *et alii*, 1976; CAMERON *et alii*, 1979; GREER e FINK, 1979; FINK *et alii*, 1980; KLAR *et alii*, 1980), em *Aspergillus nidulans* (NGA e ROPER, 1968; AZEVEDO e ROPER, 1970) e em *Ascobolus immersus* (DECARIS *et alii*, 1980).

Como foi mencionado, elementos genéticos transponíveis, além de serem mediadores de rearranjos cromossômicos, são também responsáveis pela instabilidade do material genético em muitos organismos, desde bactérias até o homem.

2.2. Instabilidade cromossômica em fungos

BARNETT e De SERRES (1963) trabalhando com *Neurospora* sugeriram que a causa da instabilidade poderia ser relacionada com transição de bases. NEWMAYER e TAYLOR (1967) estudaram um caso de instabilidade e a relacionaram com uma inversão pericêntrica. Quando ocorre permuta nessa inversão, origina-se produtos duplicados e deficientes letais. NEWMAYER e GALEAZZI (1977) descreveram mutantes que afetam a frequência de deleções em *Neurospora*. E além disso, esses mutantes, quando em homozigose, bloqueiam completamente a meiose e a formação de ascósporos; são sensíveis à luz ultra violeta e aumentam a instabilidade de duplicações (NEWMAYER e GALEAZZI, 1978). TURNER (1975, 1977) fez uma análise detalhada de uma translocação em *Neurospora*. Em *Aspergillus nidulans*, a instabilidade está relacionada com a presença de material genético em excesso. O ciclo parassexual é um processo geneticamente instável (ROPER,

1966). Os produtos resultantes desse processo, podem ser cromossomicamente balanceados e não balanceados. A não disjunção ou perda de cromossomos dá origem à genomas segregantes balanceados (KÄFER, 1961). Genomas não balanceados são caracterizados por morfologia alterada. A aneuploidia e duplicação cromossômica são as causas mais comuns desse desbalanceamento, causando conseqüentemente, instabilidade fenotípica. Os aneuplóides são bastante instáveis e raramente passam pelo processo de meiose (BALL e ROPER, 1966). Linhagens com duplicação parcial são instáveis na mitose (BAINBRIDGE e ROPER, 1966; NGA e ROPER, 1968). Três linhagens duplicadas de *Aspergillus nidulans* foram analisadas por esses autores e os mesmos verificaram que elas possuem padrões semelhantes de instabilidade. Linhagens com duplicação, apresentam morfologia "crinkled" e taxa de crescimento e conidiação reduzidas (NGA e ROPER, 1968). Essas linhagens produzem setores que são facilmente manipuláveis, e são resultantes de alterações intracromossômicas que podem envolver um ou ambos os segmentos em duplicata. Deleções de um ou outro segmento dão origem aos setores melhorados, os quais são estáveis e com taxa de crescimento maior que a linhagem parental (NGA e ROPER, 1968). Novas duplicações em tandem, inversões e transposições do segmento duplicado no mesmo ou em outro grupo de ligação dão origem aos variantes deteriorados (AZEVEDO e ROPER, 1970). Esta instabilidade recebeu o nome de não-conformidade mitótica (NGA e ROPER, 1969; AZEVEDO e ROPER, 1970; ROPER *et alii*, 1972). Variantes deteriorados muitas vezes apresentam uma maior instabilidade. AZEVEDO e ROPER (1970), sugeriram que a transposição dos segmentos duplicados para regiões sem duplicação reduz a instabilidade.

Além dos setores melhorados e deteriorados, ROPER e NGA (1969) obtiveram mais um tipo de setor em uma linhagem com duplicação I-II; os chamados setores heterocarióticos, de frequência rara. NGA e ROPER (1966), explicaram o fenômeno da instabilidade como sendo devido à deleções terminais, permuta desigual entre cromatídeos irmãos e permuta mitótica. NGA e ROPER (1969); ZUCCHI (1975) e NIFFINEGGER e SOUZA (1979), sugeriram que o desbalanço cromossômico é o responsável pela instabilidade, que as deleções cromossômicas produzidas são confinadas aos segmentos que provocam a instabilidade, e estas deleções podem se estender mais além da região duplicada. CASE e ROPER (1975), estudando diplóides não balanceados, atribuíram permuta mitótica como sendo responsável pela instabilidade. Segundo BIRKETT e ROPER (1977), o processo mais preciso de instabilidade vem de duas fontes. A primeira envolve condições na qual o reparo de DNA está provavelmente reduzido, ou seja, as deleções se originam através de lesões do DNA, talvez "vazios" em fios únicos, sendo que a maioria dessas lesões são reparáveis. Redução do reparo por cafeína, ultravioleta ou por mutações dariam uma impressão mais acurada da incidência de erros iniciais. A segunda linha de evidência é obtida de produtos da instabilidade. Alguns desses variantes tiveram um acúmulo de mutações sucessivas em todos os oito grupos de ligação, afetando a morfologia e a instabilidade; outros produzem dissômicos ou geram letais recessivos.

Vários são os fatores que afetam a instabilidade, tais como, presença de drogas no meio de cultura, agentes mutagênicos, temperatura, etc. O Quadro 1, mostra alguns desses agentes que afetam a instabilidade.

Quadro 1 - Agentes que afetam a instabilidade.

Agente	A ç ã o	R e f e r ê n c i a s
pFA	Aumenta a instabilidade em diplóides.	MORPURGO, 1961
Azul de tripan	Aumenta a instabilidade em linhagens com duplicação.	COOKE <i>et alii</i> , 1970
Cafeína	Reduz quebras e previne reparos. Aumenta a instabilidade em linhagens duplicadas.	PALMER e ROPER, 1970
Atebrina	Aumenta a frequência de deleções no segmento translocado.	PALMER e ROPER, 1970
Verde malaquita	Aumenta a frequência de deleções.	PALMER e ROPER, 1970
Benzimidazois e Tifanato	Aumenta a instabilidade em diplóides.	HASTIE, 1970 KAPPAS <i>et alii</i> , 1973
Genes que conferem sensibilidade ao U.V.	Aumentam a instabilidade	BURR <i>et alii</i> , 1971
Trimetil-benzeno-antaceno	Obtenção de linhagens instáveis com translocações.	LEE e NGA, 1973
stf-1	Reduz a instabilidade	AZEVEDO, 1975

Quadro 1 - Continuação.

Agente	A ç ã o	R e f e r ê n c i a s
Ultra-violeta	Aumenta a instabilidade em linhagens com duplicação.	PARAG e ROPER, 1975
Radiação gama	Induz translocações	ALMEIDA e AZEVEDO, 1981
Cloroneb	Aumenta a instabilidade	AZEVEDO <i>et alii</i> , 1977
Vitavax	Reduz a instabilidade com ação diferencial sobre a duplicação.	AZEVEDO <i>et alii</i> , 1977
Brometo de etídio	Reduz a instabilidade em diplóides e em linhagens com duplicações.	BONATELLI e AZEVEDO, 1977
Cumarina	Aumenta a instabilidade através de deleção do segmento translocado em linhagens com duplicação.	MAJERFELD e ROPER, 1978a
EMS	Induz instabilidade	ROSATO e AZEVEDO, 1978
Acriflavina	Eliminação de material genético adicional em variantes deteriorados.	ROSATO e AZEVEDO, 1978

- Continua -

Quadro 1 - Continuação.

Agente	A ç ã o	R e f e r ê n c i a s
Temperatura	Variação na temperatura, <u>al</u> tera a instabilidade.	LIEBER, 1976 NIFFINEGGER e SOUZA,1979
Ultrasom	Aumenta a instabilidade de diplóides.	HOUGHTON e O'DOWD,1979
Gene <i>binA₁</i>	Reduz a instabilidade	PIZZIRANI-KLEINER, 1981

Existem inúmeros outros agentes causadores de instabilidade.

Os estudos relativos à instabilidade genética são de grande interesse não só no sentido acadêmico, mas também para aplicações industriais, principalmente no que diz respeito ao melhoramento e prevenção de degeneração em linhagens industriais (BALL e AZEVEDO, 1976).

2.3. Aberrações cromossômicas

Quando o número de cromossomos de um grupo de indivíduos de uma mesma espécie é determinado, espera-se, em condições normais, que este número permaneça constante. Esta situação é esperada pois as espécies são entidades biológicas razoavelmente constantes e essa estabilidade está relacionada a uma constância nos números, estrutura e genes dos cromossomos. O número de cromossomos de uma espécie é um dado biológico

significativo. Porém o cromossomo, como os genes, são passível de sofrer alterações estruturais e numéricas, às quais desempenham importante papel evolucionário.

A variação no número de cromossomos pode levar à produção de células com, (1) complementos cromossômicos que são múltiplos exatos do número básico característico da espécie (euplóides), ou (2), com complementos que são múltiplos irregulares do número básico (aneuplóides).

As aberrações que levam a rearranjos na ordem linear dos genes podem ser agrupadas em quatro classes: (1), deleções, (2), duplicações, (3) inversões e (4) translocações. As três primeiras em regra geral, afetam somente cromossomos únicos, enquanto que a translocação pode envolver um, dois ou mais cromossomos.

Em material favorável a detecção dessas aberrações pode ser feita tanto genética quanto citologicamente. Porém dependendo do material, certas aberrações podem ser observadas a partir de configurações cromossômicas na metáfase e anáfase I da meiose (SWANSON, MERZ e YOUNG, 1969).

A primeira aberração a ser detectada em *A. nidulans* foi a diploidia (ROPER, 1952). Como um raro evento, pares de núcleos haplóides diferentes fundem-se nas hifas heterocarióticas originando diplóides, os quais são razoavelmente estáveis na mitose. Durante o crescimento vegetativo os diplóides podem sofrer permuta mitótica e haploidização,

processos que levam à recombinação.

Dentro dos objetivos propostos nesse trabalho, abordaremos nessa revisão principalmente as aberrações cromossômicas estruturais, enfatizando sua ocorrência e suas implicações.

2.4. Aberrações cromossômicas estruturais

O primeiro estudo sobre rearranjos cromossômicos em fungos foi feito utilizando tetrades ordenadas, onde número e posição dos produtos meióticos defectivos proporcionaram informações sobre os tipos de rearranjos (McCLINTOCK, 1945).

HESLOT (1958), pioneiro nos estudos simultâneos de rearranjos cromossômicos com mutantes para cor de esporos em *Sordaria macrospora*, donde deduziu a natureza de dois rearranjos com padrões de esporos abortivos em ascas ordenadas.

Rearranjos cromossômicos em geral são estudados através de 4 métodos diferentes:

- 1) Quando em heterozigose com cromossomos estruturalmente normais o rearranjo causa um padrão de inviabilidade entre os produtos da meiose. Pelo padrão de aborto de ascosporos, os vários tipos de rearranjos cromossômicos podem ser caracterizados em *Ascomícetos* (PERKINS, 1974; PERKINS e BARRY, 1977). STRICKLAND (1958) empre-

gou a técnica de análise de tétrades em *A. nidulans*, e ELLIOTT (1960), observou os padrões de aborto de ascosporos e número de esporos menores que oito, o que provavelmente era um heterozigoto para pelo menos três aberrações.

- 2) Rearranjamentos dos segmentos tem como resultado distorções características nas relações de ligação, e em fungos este é o método mais aplicado para identificar tais rearranjos. Os estudos de recombinação mitótica em *A. nidulans* (ROPER, 1952; PONTECORVO e ROPER, 1953) proporcionaram novos métodos genéticos, não apenas para localização e mapeamento de genes, mas também para detecção de aberrações, principalmente translocações (PONTECORVO e KÄFER, 1958; KÄFER, 1958).
- 3) Espera-se encontrar uma alta frequência de segregantes com duplicação entre os produtos viáveis da meiose de um heterozigoto para o rearranjo (MYLYK, 1975; BIRKETT e ROPER, 1977; PERKINS, 1972; 1975; PERKINS e BARRY, 1977).
- 4) Em alguns fungos, os rearranjos cromossômicos podem ser reconhecidos através de observações microscópicas no paquíteno de um heterozigoto (BARRY, 1967; PERKINS e BARRY, 1977).

2.4.1. Translocações

Translocações em *A. nidulans* são facilmente detectadas através da meiose, ou através de haploidização de um diplóide heterozigoto para a translocação. Métodos de haploidização mitótica de diplóides marcados foram usados por KÄFER (1958; 1965), PONTECORVO e KÄFER (1958). Esse método porém não diferencia entre translocações recíprocas e insercionais, mas é bem empregada para localização e formação de pedigrees de translocações (KÄFER, 1965).

Em muitos organismos a não disjunção meiótica é aumentada em heterozigotos para a translocação, principalmente entre os dois homólogos envolvidos no rearranjo (GREEL, 1959). POLLARD *et alii* (1968) também observaram este fenômeno em *A. nidulans*, quando estudaram uma translocação recíproca T_1 (VI; VII). Análise meiótica é um bom método para detectar essas aberrações através da alta frequência de progênie dissômica (UPSHALL e KÄFER, 1974) fenotipicamente anormal, e em casos favoráveis, identificar as translocações heterozigotas caracterizando a progênie não disjuncional geneticamente. Isso é possível em *A. nidulans* uma vez que dissômicos para os oito grupos de ligação, mostram fenótipos específicos (KÄFER, 1961). KÄFER e UPSHALL (1973) isolaram e caracterizaram todas as possíveis dissomias e trissomias em *A. nidulans*, as quais são reconhecidas pela morfologia anormal, crescimento lento e instabilidade. Essa instabilidade pode ser reduzida pela indução de letais recessivos em um sistema balanceado no par de homólogos (PIZZIRANI, 1977).

PERKINS (1974) desenvolveu estudos em tétrades não ordenadas em *Neurospora crassa*, caracterizando uma série de rearranjos. O mesmo autor analisou uma série de ascos resultantes do cruzamento entre linhagens com translocações recíprocas e linhagens normais, e estes mostraram uma distribuição distinta das frequências de tipos de ascos: a) ascos com oito ascósporos inviáveis (8 dupl./def.) e ascos com 8 esporos viáveis ($4N+4T$) em igual probabilidade; ambos resultantes de disjunção normal dos centrômeros dos dois cromossomos envolvidos na translocação, não existindo permuta nos segmentos intersticiais proximais aos dois pontos de quebra; b) ascos com quatro ascósporos normais e quatro inviáveis ($2Def:2T:2Dup/Def:2N$) resultantes de permuta intersticial.

Em translocações intersticiais a distribuição das frequências de tipos de ascos é diferente das translocações recíprocas. Assim, em heterozigotos para translocações intersticiais, pode-se obter ascos com oito ascósporos viáveis ($4T:4N$) ou 4 viáveis e 4 inviáveis ($4Dupl:4Def$), quando não ocorre permuta, ou 6 viáveis e dois inviáveis ($2T:2Def:2Dupl:2N$), se ocorrer permuta.

Uma translocação heterozigota não recíproca dá uma classe de recombinantes viáveis, mas como esta carrega um segmento duplicado e cresce pobremente, eles são raramente isolados (BIRKETT e ROPER, 1977).

Translocações recíprocas com pontos de quebra terminais também geram duplicações (BURNHAM, 1932; CLUTTERBUCK, 1970). O resultado do cruzamento entre linhagens normais com linhagens portadoras de translocação recíproca quase terminal pode ser:

- a) ascos com 8 ascósporos viáveis(4T:4N) ou 4 viáveis e 4 inviáveis(4Dupl/Def:4Def/Dupl), quando não existe permuta.
- b) ascos com 6 esporos viáveis e 2 inviáveis(2T:2Def/Dupl:2Dupl/Def:2N), quando ocorre permuta.

Portanto, quando o aborto de esporos é causado por uma translocação, vários padrões de ascos são encontrados, ao contrário do que ocorre quando um gene é o fator responsável (PERKINS, 1979).

NGA (1968) através da radiação gama verificou a ocorrência de várias translocações em *A. nidulans*, às quais se mantiveram morfológicamente normais e estáveis. TURNER (1977) estudou geneticamente uma translocação terminal em *Neurospora*.

Em translocações recíprocas também pode ocorrer não disjunção de um dos pares de centrômeros homólogos na anáfase I, resultando em segregação 3:1, dando trissômicos terciários tendo dois segmentos em excesso, junto com o produto deficiente (PERKINS, 1974; UPSHALL e KÄFER, 1974). KÄFER (1965) estudou uma translocação insercional também em *A. nidulans*; PERKINS (1972), PERKINS e BARRY (1977) estudaram em *Neurospora* e BOND (1979), em *Sordaria*, completando as análises de HESLOT (1958).

Análises genéticas muitas vezes podem ser complementadas pelas análises citológicas. Cada tipo de rearrançamento é reconhecido citologicamente pelo pareamento meiótico heterozigoto ou através de pontes anafásicas e presença de segmentos acêntricos. Em fungos análises citol

gicas não são feitas rotineiramente, embora em *Neurospora* ela seja mais aplicada devido ao fato de que produtos meióticos inviáveis são visivelmente não pigmentado (BARRY, 1967).

Já em 1945 (McCLINTOCK), mostrou que em *Neurospora* o estado heterozigoto para uma translocação recíproca leva à formação de anéis na metáfase I, resultando na produção de uma certa proporção de ascósporos inviáveis. BARRY & PERKINS (1969), estudaram citologicamente uma translocação recíproca heterozigota e observaram a formação de quadrivalentes no paquíteno. Em *A. nidulans* análises citológicas são dificultadas pelo tamanho diminuto de seus cromossomos (ELLIOTT, 1960). Nesse fungo, o paquíteno não é o melhor estágio para estudos cromossômicos, entretanto na diacinese e metáfase I, onde os cromossomos estão mais condensados, são os melhores estágios para se estudar as aberrações (BOOTHROYD, 1978). Catenações compactas e anéis foram vistos nessas duas fases, e cromossomos "atrasados" foram observados pelo mesmo autor, em heterozigotos para translocações durante anáfase I e II e telófase I, II.

As evidências limitadas desse estudo mostrou que o comportamento cromossômico meiótico em um heterozigoto para translocação em *A. nidulans* é provavelmente igual ao de organismos superiores.

2.4.1.1. Importância das translocações

Segundo BURNHAM (1962) as translocações tem as seguintes aplicações:

1) São um bom exemplo para mostrar as relações entre cromossomos e genes, entre cromossomos e mapas de ligação, e concordância de resultados genéticos e citológicos.

2) São empregados para se determinar a posição de centrômeros e outros marcadores citológicos, em relação à marcadores genéticos.

Estas informações são úteis para se estudar problemas relacionados com o comportamento citológico dos cromossomos, tais como:

- a) fatores que afetam a segregação cromossômica em translocações de milho e *Neurospora*.
- b) fatores que afetam a redução da recombinação em decorrência de translocações.
- c) estudos dos efeitos do tamanho dos cromossomos na recombinação.
- d) estudos dos efeitos da região organizadora do nucléolo e dos "Knobs", na recombinação em milho.
- e) testar a presença de competição entre megasporos.
- f) em espécies com segregação preferencial, o estudo das relações entre a redução da recombinação no segmento intersticial, e a taxa de aborto dos gametas.

- g) testar as dimensões de deficiências viáveis, especialmente segmentos terminais translocados de diferentes tamanhos.
 - h) determinar como o pareamento cromossômico se inicia, e como ele se desenvolve.
 - i) estudo do pareamento cromossômico somático de dípteros.
- 3) As translocações são usadas para se determinar:
- a) o grupo de ligação de cada cromossomo.
 - b) o grupo de ligação ao qual pertencem os novos genes.
 - c) posição de genes em relação a marcadores citológicos.
- 4) As translocações são usadas para se testar a independência dos grupos de ligação.
- 5) Para se estudar o modo de herança de caracteres controlados por 1 ou poucos genes.
- 6) São empregadas, em combinação com genes marcadores, no reconhecimento de certos genótipos de plantas em estágios iniciais do desenvolvimento.

7) Translocações podem ser usadas para duplicar segmentos internos de cromossomos. Além de ser possível o uso para duplicar os locos de genes conhecidos, e desejáveis; um aumento na dosagem de genes que controlam caracteres quantitativos são de bastante valor.

8) São usadas para transferência de genes entre e dentro de variedades, ou espécies.

9) Translocações induzidas podem ser usadas para causar esterilidade de populações de insetos e desta forma controlar e erradicar pragas. Em *Neurospora*, PERKINS *et alii* (1969) e PERKINS (1972) usaram translocações para mapeamento gênico e de centrômero.

SHERMAN e HELMS (1978) estudaram uma translocação recíproca em levedura, à qual envolveu o braço esquerdo do cromossomo V e o direito do cromossomo XVI. O braço do cromossomo V foi quebrado adjacente ao gene C_yC_7 , o qual determina a estrutura primária do iso-2-citocromo-c. Este fragmento contendo o gene em questão é translocado para o cromossomo XVI. Com este processo há um aumento na produção do iso-2-citocromo-c.

2.4.2. Inversões

Inversão é definida como um rearranjo intracromossômico no qual um segmento de um cromossomo é removido, sofre 180° de rotação e é inserido. O pareamento de dois cromossomos homólogos, um possuindo uma inversão leva à formação de alças.

Citologicamente elas podem ser reconhecidas devido à formação de pontes na anáfase I e II. Estas são formadas devido a uma permutação no segmento invertido, resultando em fragmentos acêntricos. Quando essas pontes se rompem entre os dois centrômeros pode haver formação de deleções e duplicações parciais, sendo que no primeiro caso há formação de esporos inviáveis e, no segundo, são formados ascósporos viáveis com parte do material genético em duplicata (ESSER e KUENEN, 1967).

Em *Neurospora crassa*, as inversões cromossômicas descritas foram as do tipo pericêntrica (centrômero dentro da região invertida) com um ponto de quebra terminal. Do cruzamento entre uma linhagem normal com uma linhagem portadora de inversão pericêntrica, PERKINS (1974) encontrou os seguintes tipos de ascos:

- ascos com 8 ascósporos viáveis (4N:4Inv) na ausência de permuta.
- ascos com 6 ascósporos viáveis e 2 inviáveis (2N:2Def/Dup1:2Dup1/def:2Inv), na presença de um única permuta.
- ascos com 4 ascósporos viáveis e 4 inviáveis (4Dup1/Def:4Def/Dup), quando ocorre permuta dupla em 4 fios.

A frequência dos ascosporos abortivos depende do tamanho da inversão, do pareamento e da frequência de permuta (PERKINS e BARRY, 1977).

Em *Neurospora* não se encontrou até o momento inversões pa racêntricas. PERKINS (1974), PERKINS e BARRY (1977) sugerem que a não detecção desse tipo de inversão é devido ao fato de que uma permuta dentro da região invertida levaria à formação de ponte anafásica e framen to, que impediria a separação na anáfase I causando aborto de asco todo.

Em *Neurospora* três inversões foram identificadas (NEWMEYER, 1965; NEWMEYER e TAYLOR, 1967; TURNER *et alii*, 1969). Análises citolôgi cas de uma inversão foram feitas por BARRY (1967).

2.4.2.1. Importância das inversões

Segundo BURNHAM (1962) as inversões apresentam as seguin tes importâncias:

- a) pela análise citogenética das inversões, é possível se estudar filogeneticamente as espécies animais e vege tais.
- b) desempenham importante papel evolucionário.
- c) são úteis para a confecção de mapas citogenéticos de mi lho, naqueles cromossomos que não tem bons marcadores genéticos.
- d) servem para produzir duplicações em híbridos.

- e) podem ser usadas para obtenção de homozigose em determinados cromossomos de *Drosophila*.
- f) uma inversão paracêntrica introduzida em um isocromossomo pode originar cromossomos em anel.
- g) elas impedem ou dificultam a permuta genética, pois os gametas recombinantes geralmente são inviáveis na sua quase totalidade. Podem ainda funcionar como fixadores de heterose, quando ocorrem mutações letais no segmento invertido, sendo que os gametas recombinantes são inviáveis.

2.4.3. Deleções e duplicações

Deleções são definidas como perdas intersticiais ou terminais de segmentos cromossômicos, durante o ciclo nuclear. Perdas grandes representam um efeito letal, mesmo na condição de heteroziguidade. A ausência de ascas normais é uma indicação de deleção (ESSER e KUENEN, 1967). As deleções nunca reverterem (HAWTORNE, 1963).

A presença de um segmento cromossômico a mais no genoma é definido como duplicação (BURNHAM, 1962). PRITCHARD (1955) foi quem pela primeira vez isolou uma linhagem com duplicação em *A. nidulans*, durante uma seleção de revertentes para adenina, de uma linhagem portadora de

*adE*₂₀. Um revertente aparente possuía um segmento cromossômico extra do grupo de ligação I, o qual continha o gene *ade20*, ligado em posição terminal no cromossomo II. Outras duplicações foram obtidas em *A. nidulans* através de translocações não recíprocas.

BAINBRIDGE e ROPER (1966), estudaram uma linhagem com duplicação em *A. nidulans* obtida por meiose em um cruzamento heterozigoto para uma translocação não recíproca. Nesta linhagem, uma região do braço esquerdo do cromossomo III ligou-se ao final do braço direito do cromossomo VIII. O cromossomo III estava normalmente presente. Várias outras linhagens com duplicação tem sido obtidas via translocações não recíprocas (NGA e ROPER, 1966; NGA e ROPER, 1969; ROPER *et alii*, 1972; ALMEIDA e AZEVEDO, 1981; BIRKETT e ROPER, 1977).

Linhagens duplicadas apresentam morfologia "crinkled" e taxa de crescimento e conidiação reduzidas (NGA e ROPER, 1968), além de serem bastante instáveis na mitose (BAINBRIDGE e ROPER, 1966; BALL, 1967; NGA e ROPER, 1968). Essa instabilidade é refletida no aparecimento de setores. Os chamados setores melhorados resultam de deleções de todo ou quase todo do material em duplicata do cromossomo normal ou do translocado. NGA e ROPER (1968), propuseram a formação de permuta dentro das alças intracromossômicas para explicar as deleções. Os setores deteriorados originam-se de novas duplicações em tandem, e de transposição do segmento extra para novos sítios no mesmo ou em outro grupo de ligação (NGA e ROPER, 1968; AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971). A deleção do segmento em duplicata pode se estender além da duplicação, dando origem aos setores heterocarióticos, de frequência rara (ROPER e NGA, 1969). A esse ti

po de instabilidade foi dado o nome de "não conformidade mitótica" (NGA e ROPER, 1969; AZEVEDO e ROPER, 1970; ROPER *et alii*, 1972). Para explicar o fenômeno de não conformidade mitótica, NGA e ROPER (1969) propuseram a existência de um número limitado de sítios na membrana, onde a replicação do DNA de segmentos cromossômicos específicos pode iniciar. Nos segmentos em duplicata existe uma competição para estes sítios, a qual provocaria as lesões responsáveis pela não conformidade mitótica.

AZEVEDO e ROPER (1970) observaram uma alta frequência de não disjunção mitótica para o grupo de ligação III em um isolado V_8 de *A. nidulans*, originado de uma linhagem haplóide portadora de duplicação. A frequência de não disjunção não é alterada por alguns fatores como, temperatura e pH, mas aumenta com a idade do conídio (GABRIELLI e AZEVEDO, 1980).

A expressão de genes que conferem sensibilidade à luz ultravioleta em linhagens com duplicação (genomas não balanceados) aumentam a instabilidade (BURR *et alii*, 1971). MAJERFELD e ROPER (1978b) observaram que o alelo $uvrA^+$ localizado em um segmento em duplicata aumenta a resistência à luz ultra violeta tanto no haplóide como no diplóide desbalanceado. Provavelmente ocorre uma interação do produto de $uvrA^+$ com outros produtos gênicos do genoma.

VAN de VATE e JANSEN (1978), trabalhando com a linhagem duplicada (I-II) de *A. nidulans*, mostraram que os segregantes meióticos originam por crossing-over entre os segmentos em duplicata, seguidos de disjunção e distribuição dos cromossomos. Não encontraram nenhuma indica

ção de deleções frequentes durante a meiose. A duplicação afeta a frequência de crossing-over, frequência esta que é aumentada dentro da duplicação. Portanto segregantes meióticos surgem via recombinação e não por um processo semelhante à não conformidade mitótica.

ROSATO e AZEVEDO (1978) obtiveram variantes melhoradas em *A. nidulans*, através de eliminação de material genético extra de linhagens deterioradas pelo uso de acriflavina. BONATELLI e AZEVEDO (1977) trataram linhagens duplicadas de *A. nidulans* com brometo de etídio, e observaram que esta droga reduz o número de setores produzidos por tais linhagens. É possível que brometo de etídio, o qual atua no DNA mitocondrial, reduza o número de setores devido à falta de energia como consequência da inibição da respiração. Pode ser também que o brometo de etídio, afete a haploidização e ou crossing-over mitótico devido à sua ação sobre o DNA e mecanismos de reparo. ZUCCHI e AZEVEDO (1979), analisaram diversos deteriorados obtidos espontaneamente de uma linhagem portadora de duplicação, e estes mostraram que deterioração pode estar associada à deleção em segmentos duplicados. Observaram também uma alta taxa de crossing-over mitótico entre o segmento duplicado. Os autores sugeriram que isto possivelmente é devido à associação de crossing-over mitótico e a presença de deterioração.

Em *Neurospora*, NEWMEYER e TAYLOR (1967) descreveram uma inversão pericêntrica que gera duplicações viáveis às quais incluem o loco "mating type". TURNER *et alii* (1969) estudaram outras inversões que também produzem duplicações de uma porção do grupo de ligação I, porém não

incluiram o loco "mating type". Observaram que um grau de infertilidade é uma propriedade característica em linhagens com duplicação. O grau de infertilidade varia de parcial à completo dependendo da aberração, e peritécios são formados, os quais são relativamente Barren (peritécios com pouco ou nenhum ascósporos).

Em *A. nidulans* duplicações geram alterações na morfologia e taxa de crescimento, mas nenhum efeito na fertilidade, ao contrário do que ocorre em *Neurospora*, onde esses dois fatores não são alterados porém há formação de peritécios Barren. TURNER (1977) estudou uma linhagem duplicada com 2/3 do grupo de ligação I ligado ao final direito do VI; esta linhagem é um dos segregantes de um cruzamento heterozigoto para uma translocação desigual I - VI; é Barren e a deleção ou do segmento translocado ou do correspondente no cromossomo normal livra a linhagem desta condição Barren. Deleção de segmentos além do duplicado, resulta em inviabilidade.

NEWMEYER e TAYLOR (1967), mostraram que uma duplicação não tandem é produzida por recombinação em cruzamentos heterozigotos para uma inversão pericêntrica terminal. As duplicações tem seu crescimento inicial inibido, devido ao fato de serem heterozigotas para o loco "mating type". Tais culturas livram-se da inibição como resultado de eventos que eliminam a heterozigosidade. O produto pode ser Barren ou fértil.

NEWMEYER e GALEAZZI (1977) reportaram a instabilidade de uma duplicação em *Neurospora*. Muitos dos produtos Barren se livraram da inibição devido à crossing-over mitótico ou à grandes deleções envolvendo o loco "mating type" e outros marcadores distais.

Quanto ao aspecto citológico das duplicações, como já foi mencionado, em *Aspergillus nidulans* são dificultadas pelo tamanho reduzido dos núcleos e cromossomos (PONTECORVO *et alii*, 1953; ELLIOTT, 1960). As alterações provocadas pela presença de duplicações são observadas morfologicamente, pela redução do crescimento, pelo aumento no tamanho de conídios e alterações no diâmetro e volume de núcleos conidiais (PAES de BARROS, 1977; CASE e ROPER, 1978; NIFFINEGGER e SOUZA, 1979).

2.4.3.1. Aplicações das duplicações e deleções

Segundo BURNHAM (1962), são as seguintes as aplicações das duplicações e deleções.

- a) servem para se determinar os efeitos de desproporções gênicas e comparar esses efeitos com as mutações gênicas das mesmas regiões.
- b) fixação de heterose.
- c) duplicações e deleções podem fornecer informações interessantes para o estudo de problemas especiais relacionados com os cromossomos, como o pareamento e crossing-over.
- d) as duplicações são um importante fator evolutivo. Cons

tituem uma das formas de se adicionar material genético à uma espécie. Tendo importância para a evolução, as duplicações são potencialmente importantes para o melhoramento. Deleções não são tão importantes para a evolução.

- e) as deleções podem ser empregadas para a localização de genes recessivos e para a elaboração de mapas citogenéticos.
- f) são de importância para estudos de relação de dominância. Isto é de interesse especial com genes regulatórios (METZENBERG *et alii*, 1974), onde informação sobre a autonomia nuclear também pode ser obtida comparando duplicações heterozigotas com heterocarion de conteúdo gênico semelhante.
- g) genes que condicionam incompatibilidade vegetativa foram identificados e estudados usando duplicações (PERKINS, 1975; MYLYK, 1975).
- h) duplicações em apenas alguns segmentos cromossômicos são de interesse no estudo de recombinação mitótica (BARRY, 1978, citado em PERKINS, 1979).
- i) linhagens contendo dois organizadores de nucléolo podem ser produzidas pela duplicação de DNA ribossomal (PERKINS *et alii*, 1980).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas

Algumas linhagens usadas neste trabalho são originárias dos estoques do Departamento de Genética da Universidade de Glasgow, Escócia, mantidas no Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra. As linhagens e seus marcadores genéticos são mostradas na Tabela 1. A Figura 1 representa os grupos de ligação de *A. nidulans* com os marcadores genéticos utilizados de acordo com CLUTTERBUCK (1974).

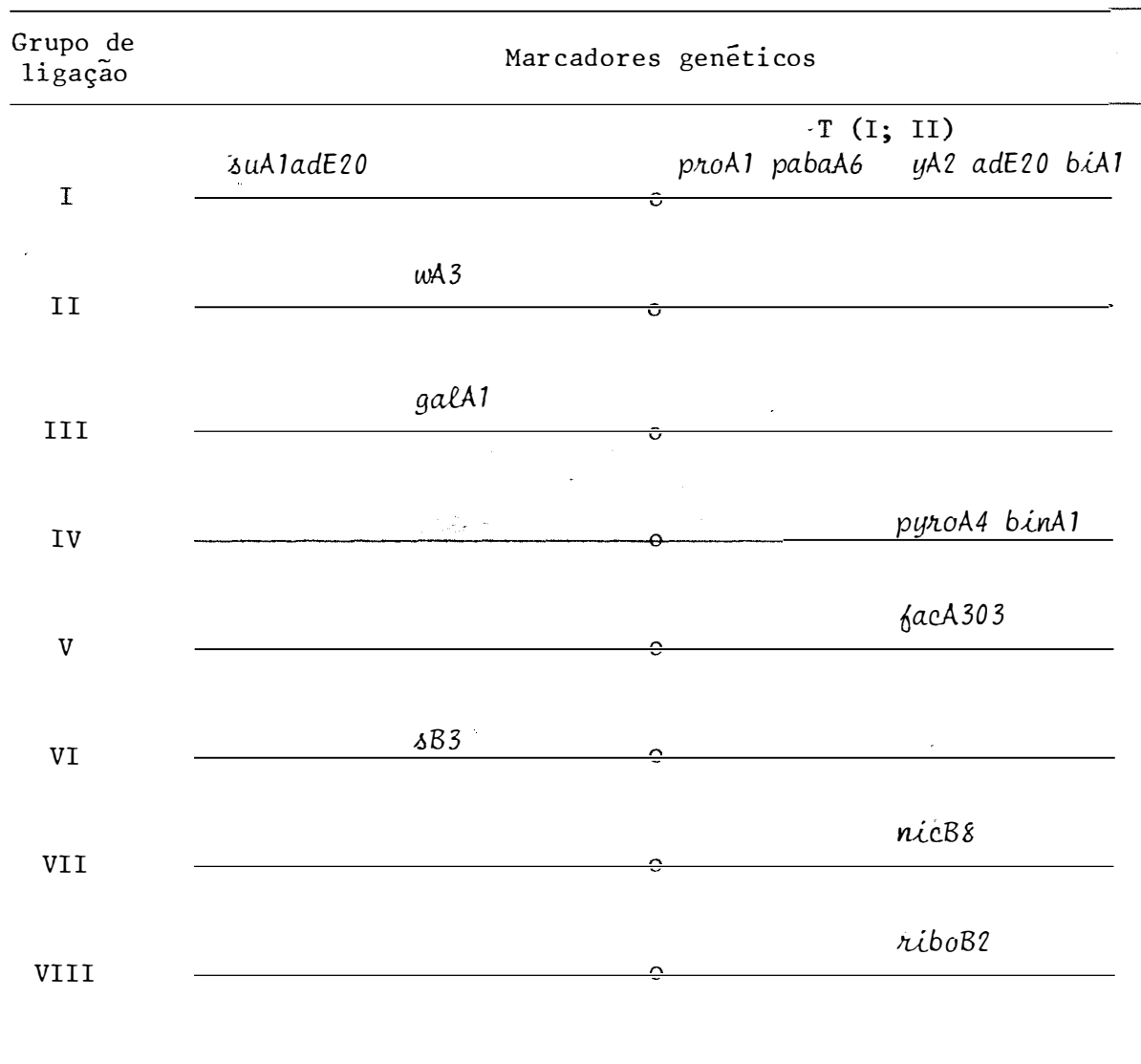


Figura 1 - Marcadores genéticos do *A. nidulans* utilizados. Os centrômeros estão representados por o. As distâncias no mapa não se encontram em escala.

Tabela 1 - Linhagens e variantes utilizadas nesse trabalho, com as suas respectivas marcas genéticas.

LINHAGEM	GENÓTIPO	REFERÊNCIAS
"Master Strain E" (MSE)	$yA_2 suA_1 adE_{20} adE_{20};$ $wA_3; galA_1; pyroA_4;$ $facA_{303}; sB_3; nicB_8;$ $riboB_2.$	McCULLY e FORBES, 1965
"Master Strain E" (MSE bin)	$yA_2 suA_1 adE_{20}; wA_3;$ $galA_1; pyroA_4 binA_1;$ $facA_{303}; sB_3; nicB_8;$ $riboB_2.$	PIZZIRANI-KLEINER, 1981
$proA_1 pabaA_6 yA_2$ (ppy)	$proA_1 pabaA_6 yA_2$	
A	$proA_1 pabaA_6 T(I \rightarrow II)$	NGA e ROPER, 1968
VARIANTES DETERIORADOS		
V_5	$proA_1 pabaA_6; v_5$	AZEVEDO e ROPER, 1970
$V_{5.2}$	$proA_1 pabaA_6; v_5; v_{5.2}$	AZEVEDO e ROPER, 1970
V_{25}	$proA_1 pabaA_6; v_{25}$	AZEVEDO, 1971
$V_{32} fac gal nic$	$facA_{303}; galA_1; nicB_8;$ v_{32}	- Segregante do cruzamento MSEbin X V_{32} .
$V_2 pyro$	$pyroA_4; v_2$	- Segregante do cruzamento MSE X V_2
V_3	$proA_1 pabaA_6; v_3$	AZEVEDO, 1971
V_9	$proA_1 pabaA_6; v_9$	AZEVEDO, 1971
$V_{5.1}$	$proA_1 pabaA_6; v_{5.1}$	AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971.

3.2. Marcadores genéticos e fenótipos das marcas utilizadas

MARCADORES	F E N Ó T I P O
<i>adE</i> ₂₀	Requisito para adenina.
<i>binA</i> ₁	Produção de conídios uni, bi e trinucleados.
<i>facA</i> ₃₀₃	Incapacidade de crescer em meio cuja única fonte de carbono é o acetato.
<i>galA</i> ₁	Incapacidade de crescer em meio cuja fonte de carbono é a galactose.
<i>nicB</i> ₈	Requisito para ác. nicotínico
<i>pabaA</i> ₆	Requisito para ác. <i>p</i> -aminobenzóico
<i>proA</i> ₁	Requisito para prolina
<i>pyroA</i> ₄	Requisito para piridoxina.
<i>riboB</i> ₂	Requisito para riboflavina.
<i>sB</i> ₃	Requisito para tiosulfato.
<i>suA1 adE</i> ₂₀	Supressor da mutação <i>adE</i> ₂₀ .
<i>yA</i> ₂	Conídios amarelos.
<i>wA</i> ₃	Conídios brancos.

3.3. Meios de cultura e soluções

3.3.1. Meio Mínimo (PONTECORVO *et alii*, 1953)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose.	10,0 g
Ágar	15,0 g
H ₂ O destilada.	1000,0 ml
pH = 6,8 ajustado com NaOH 10%.	

3.3.2. Meio completo (PONTECORVO *et alii*, 1953 com modificações)

Adicionou-se ao meio mínimo:

Peptona.	2,0 g
Caseína hidrolizada.	1,5 g
Extrato de levedura.	0,5 g
Solução de vitaminas	1,0 ml
pH = 6.8 ajustado com NaOH 10%	

3.3.3. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo

Ao meio mínimo líquido (meio mínimo sem ágar) como indicado no item 3.3.1. adicionou-se 2% de meio completo líquido (meio completo sem o ágar, item 3.3.2.) e distribuiu-se 2,5 ml em tubos de ensaio. Posteriormente autoclavou-se.

3.3.4. Meio mínimo de galactose

O preparo é idêntico ao meio mínimo (item 3.3.1.), apenas substituindo a glicose por galactose como fonte de carbono.

pH = 6.1 ajustado com NaOH 10%.

3.3.5. Meio de acetato de amônio (APIRION, 1962)

Acetato de amônio	12,0 g
KH_2PO_4	3,0 g
NaCl	2,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
FeSO_4	0,01 g
ZnSO_4	0,01 g
Ágar	15,0 g
H_2O destilada	1000,0 ml
pH = 6.1 ajustado com NaOH 10%	

3.3.6. Solução de vitaminas

Ácido nicotínico.	100,0 mg
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	10,0 mg
Biotina.	0,2 mg
Piridoxina.	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Tiamina.	50,0 mg
H ₂ O destilada	100,0 ml

A solução foi aquecida em banho maria durante 15 minutos, e em seguida guardada em frasco escuro sob clorofórmio à 4°C.

3.3.7. Suplementos adicionados ao meio mínimo

O estoque dos suplementos foi preparado adicionando-se cada um deles em água destilada esterilizada. As soluções foram aquecidas em banho-maria por 15 minutos e conservadas no refrigerador à 4°C.

S u b s t â n c i a	Sol. estoque 100ml de água	Concentração final no meio de cultura
Adenina	500,0 mg	25,00µg/ml
Ác. nicotínico	10,0 mg	0,50µg/ml
<i>p</i> -aminobenzóico	5,0 mg	0,25µg/ml
Biotina	4,0 mg	0,20µg/ml
Metionina	1,0 g	50,00µg/ml
Piridoxina	5,0 mg	0,25µg/ml
Prolina	1,0 g	50,00µg/ml
Riboflavina*	10,0 mg	0,50µg/ml
Tiosulfato de sódio	2,0 g	100,00µg/ml

*Conservado em frasco escuro.

3.3.8. Solução salina 0,85%

Foram dissolvidas 8,5 g de cloreto de sódio em 1000ml de água destilada. Distribuiu-se 9 ml da solução em frascos, autoclavou-se e os frascos foram conservados à temperatura ambiente.

3.3.9. Solução de tween "80" (0,1% - v/v)

Preparou-se uma solução de 0,1 ml de tween "80" em 100 ml de água destilada. A solução foi distribuída em tubos de ensaio (2,5 ml cada frasco), autoclavou-se e os frascos foram conservados à temperatura ambiente.

3.3.10. Solução de Cloroneb 2% (Du Pont, 65% de P.A.) (1,4-dicloro-2,5-dimetoxil benzeno)

Dissolveu-se 1 gr de cloroneb em 50 ml de água destilada. Posteriormente a solução foi aquecida durante 15 minutos em banho-maria e em seguida conservada à 4°C.

3.3.11. Solução de benlate

Metil-1 (Buticarbamoil) 2-Benzimidazol
Carbamato (Benlate), 100 mg

H₂O destilada esterilizada, 100 ml

O benlate foi dissolvido em 1 gota de acetona e posteriormente adicionou-se a água. Filtrou-se e aqueceu-se a solução em banho-maria durante 15 minutos. A solução foi conservada à 4°C.

3.3.12. Solução de p-fluoro fenilalanina (pFA)

p-fluorofenilalanina 100 mg

H₂O destilada esterilizada. 10 ml

Uma vez feita a solução, a mesma foi aquecida em banho-maria durante 15 min e posteriormente conservada à 4°C.

3.3.13. Solução de albumina 50%

Preparou-se uma solução com 5 ml de clara de ovo em 95 ml de água esterilizada. Filtrou-se a solução e conservou-se em frasco escuro à 4°C.

3.3.14. Solução tampão fosfato pH 6.9

SOLUÇÃO A

NaH_2PO_4	27,8 g
H_2O destilada	1000,0 ml

SOLUÇÃO B

Na_2HPO_4	53,65 g
H_2O destilada	1000,00 ml

Misturou-se 45 ml da solução A em 55 ml da solução B. A essa mistura foram adicionados 100 ml de água destilada. A mistura foi preparada no momento do uso e o restante das duas soluções foi mantida à 4°C.

3.3.15. Solução estoque de Giemsa

Dissolveu-se 1 g de Giemsa em 66 ml de glicerina à 60°C. Após resfriamento, foram acrescentados 66 ml de metanol. Filtrou-se e conservou-se a solução em frasco escuro.

3.3.16. Solução Helly

Bicromato de potássio.	3,00 g
Bicloreto de mercúrio.	5,00 g
H_2O destilada.	100,00 ml

Conservou-se a solução em frasco escuro, à temperatura ambiente.

3.3.17. Formol neutro

O formol neutro foi preparado pela adição de uma parte de carbonato de cálcio em três partes de formalina. A solução foi agitada esporadicamente durante 10 dias.

3.3.18. Fixador Carnoy

Álcool etílico 95% 3 partes
Ác. acético glacial. 1 parte

3.3.19. Meios de análise

Para a análise genética, foram utilizadas uma bateria de placas de Petri contendo meio completo (MC), meio mínimo (MM), meio mínimo suplementado com todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento (MM + T), meio mínimo de galactose com todos os requisitos (gal), meio de acetato com todos os requisitos (fac), meio mínimo suplementado com todos os requisitos, exceto aquele sob análise (por exemplo, MM+T-pyro). Para a transferência de colônias foi usado um replicador multifio de níquel cromo com 26 pontos (AZEVEDO *et alii*, 1976).

3.4. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e as soluções foram esterilizadas em autoclave durante 15 minutos à 1 atm de pressão, exceto nos casos assinalados. A temperatura de incubação foi de 37°C.

3.5. Equipamentos para microscopia e fotografias

Microscópios: Wild (Heerburgg)M 2034983

Spencer

Ocular micrométrica: Ernest Leitz Wetzlar (6x).

O filme utilizado para as fotografias foi o Panatomic X Kodak - 32 asas.

3.6. Obtenção espontânea e manutenção dos variantes deteriorados

Inoculou-se conídios provenientes da linhagem A com duplicação no centro de placas de Petri contendo meio completo. Essas placas foram incubadas à 37°C durante sete dias. A seguir contou-se os setores obtidos.

Os variantes deteriorados foram isolados em placas individuais através de inoculação de ponto. Após purificação, estes foram estocados em tubos contendo meio completo inclinado, e uma amostra de cada va

riante foi mantida em placa de meio completo, através de repiques periódicos.

Devido à grande instabilidade desse material, muitos dos variantes obtidos não puderam ser analisados.

3.7. Análise genética

3.7.1. Obtenção de heterocário

Utilizou-se o método descrito por PONTECORVO *et alii* (1953). Conídios de duas linhagens foram colocados juntos em igual proporção em tubos contendo meio mínimo mais 2% de meio completo (item 3.3.3.) o que permitiu a germinação inicial dos esporos.

Após 3 a 4 dias de incubação à 37°C formou-se uma película à qual foi transferida para meio mínimo sólido. Essa película foi dividida entre os quadrantes da placa, a fim de se formarem os setores heterocarióticos.

3.7.2. Análise genética através do ciclo parassexual

3.7.2.1. Isolamento de diplóides

Pela união de núcleos haplóides, com requisitos nutricional

nais diferentes, pode-se obter diplóides capazes de crescer em meio mínimo. Essa fusão é bastante rara, cerca de 1 diplóide em $10^6 - 10^7$ conídios.

O material crescido nesse meio foi analisado quanto à diploidia, através da cor da colônia e tamanho do conídio. Os diplóides isolados foram purificados em placas contendo meio mínimo e posteriormente estocados em tubos de meio mínimo inclinado.

3.7.2.2. Análise mitótica

Essa análise foi feita segundo o método de ROPER (1952), utilizando-se o ciclo parassexual. Essa análise possibilita a localização das mutações nos respectivos grupos de ligação.

Uma vez obtidos os diplóides, procedeu-se a haploidização dos mesmos através da adição, em meio completo, de *p*-FA, na concentração de 40 μ gr/ml (LHOAS, 1961 e MORPURGO, 1961) e cloroneb na concentração de 20 μ gr/ml (AZEVEDO e SANTANA, 1975). Quanto ao benlate, a concentração final no meio de cultura variou dependendo do diplóide (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentrações finais de benlate no meio de cultura.

D i p l ó i d e	µg/ml de meio
MSE//ppy	1
MSE//A	1
MSE//V _{5.2}	0,2
MSE//V ₂₅	0,3
MSE//V ₆₈	0,3
MSE//V ₆₇	0,3

A haploidização ocorre através de não disjunções sucessivas que resultam na recuperação do estado haplóide (KÄFER, 1961). Os diplóides foram inoculados em 4 pontos nas placas e incubados à 37°C, durante 10 dias. A seguir os setores originados foram isolados e purificados em meio completo pelo método de estrias. Os haplóides foram transferidos um a um em 26 pontos fixos em placas com meio completo. Após 72 horas de incubação, essas placas foram utilizadas como placas mestras, e posteriormente repicadas para os meios de análise, através do replicador multifio. As leituras foram feitas após 36, 48 e 72 horas de incubação.

3.7.3. Análise meiótica

Essa análise baseia-se no ciclo sexual do *A. nidulans* segundo o método descrito por PONTECORVO e col. (1953) através da análise

de ascósporos produzidos em cleistotécios híbridos.

Os cleistotécios foram obtidos através da transferência da película heterocariótica (item 3.7.1.) para placas de meio mínimo às quais foram vedadas com fita celulósica e incubadas durante 8 à 10 dias. Após esse período os cleistotécios de maior tamanho (BARACHO, AZEVEDO e VENCOVSKY, 1970) foram retirados sob lupa e "rolados" em ágar 3%, afim de se eliminar micélio, conídios e células de Hülle aderentes. Uma vez limpos, eles foram transferidos para tubos de ensaio contendo tween "80" e com o auxílio de alça de platina os mesmos foram esmagados contra a parede do tubo e em seguida suspensos em solução. De cada suspensão semeou-se 0,1 ml em placas com meio completo e o restante foi conservado em refrigerador. Através desse plaqueamento, foi possível fazer a análise apenas dos cleistotécios híbridos. Da solução contendo o cleistotécio escolhido, foram feitas diluições apropriadas, e a seguir plaqueadas em meio completo e incubadas à 37°C por 72 horas. Após esse período, observou-se a segregação de colônias normais e deterioradas e cada tipo foi repicado separadamente em placas de meio completo com 26 pontos cada uma. Estas foram incubadas durante 72 horas e a seguir transferidas para os meios de análise com o auxílio de um replicador multifio. As leituras foram feitas após 36, 48 e 72 horas de incubação.

3.7.4. Teste de alelismo

Os variantes deteriorados obtidos no presente trabalho fo-

ram analisados e a seguir procedeu-se o teste de alelismo, entre variantes deteriorados obtidos por outros autores cujo fator de deterioração se localizava no mesmo grupo de ligação do variante em questão.

3.8. Análises citológicas

3.8.1. Contagem de ascósporos no interior de cada asco

Após a formação das películas heterocarióticas (ítem 3.7.1.) as mesmas foram transferidas para placas de meio mínimo. Cada placa foi vedada com fita celulósica e incubadas durante 5 dias, a fim de se obter cleistotécios de idade apropriada para a observação dos ascos. Os cleistotécios escolhidos foram cuidadosamente "rolados" em ágar 3% para limpeza. Posteriormente os mesmos foram colocados em uma lâmina sobre uma gota de tampão fosfato. As paredes dos cleistotécios foram cuidadosamente rompidas e removidas com pinça de ponta fina e a seguir o material foi ressuspendido na gota de tampão. Cubriu-se com lâminula e pressionou-se o material entre duas folhas de papel de filtro, para retirar o excesso de tampão. Imediatamente após, os bordos das lamínulas foram vedados com esmalte incolor. Observou-se em microscópio WILD (HEERBURGE) M em objetiva de 100x.

Para as observações morfológicas e as contagens de ascósporos no interior dos ascos, utilizou-se apenas ascos maduros e intactos, pois na lâmina, além dos ascos observa-se hifas ascógenas, ascos imatu-

ros, resíduos de parede, ascósporos livres e ascos maduros que se romperam durante o processo de montagem.

3.8.2. Coloração de ascos

1.^a Técnica

3.8.2.1. Fixação

Cleistotécios com cinco dias de idade foram coletados, rolados em ágar 3% e posteriormente fixados em solução Carnoy (item 3.3.18) durante 4 horas à temperatura ambiente.

3.8.2.2. Albuminização

Após a fixação os cleistotécios foram gentilmente colocados sobre uma gota de albumina 5% (item 3.3.13.) em uma lâmina. As paredes foram cuidadosamente rompidas e retiradas com o auxílio de uma pinça de ponta fina. A seguir a suspensão foi bem espalhada pela lâmina. Deixou-se secar.

3.8.2.3. Hidrólise

A hidrólise foi feita em HCl 1N durante 10 à 15 minutos à 60°C.

3.8.2.4. Lavagem

Foram feitos dois banhos em água de torneira e um em tampão fosfato pH 6.9 (item 3.3.14.), durante 5 minutos cada banho.

3.8.2.5. Coloração

Após a lavagem, as lamínulas foram colocadas em vidro relógio contendo a solução corante (1 gota de solução estoque Giemsa para 1ml de solução tampão) durante 30 min.

3.8.2.6. Montagem

Após a coloração as lamínulas foram passadas rapidamente em tampão fosfato a fim de retirar o excesso de corante. As lamínulas foram colocadas sobre lâminas bem limpas, e pressionadas entre duas folhas de papel de filtro. Os bordos foram vedados com esmalte incolor, e as lâminas foram mantidas em câmaras úmidas à 4°C.

2ª Técnica - HCl Giemsa (PAES de BARROS, 1977, com algumas modificações)

A) Albuminização da lamínula

Uma gota de albumina 5% (item 3.3.13) foi colocada sobre

a lamínula. Os cleistotécios limpos foram colocados sobre essa gota e suas paredes gentilmente foram rompidas. Espalhou-se essa suspensão por toda a lamínula e deixou-se secar.

B) Fixação

A lamínula contendo os ascósporos foram colocadas em 5 ml de fixador Helly acrescido de 0,3 ml de formol neutro por 20 minutos.

C) Lavagem

O material foi rapidamente passado em álcool 70%.

D) Hidrólise

O material foi hidrolisado em HCl 1N por 20 minutos a 60°C.

E) Lavagem

Foram feitos dois banhos rápidos em água destilada em diferentes frascos.

F) Coloração

O material foi corado em solução corante (1 gota de solução estoque Giemsa para 1 ml de tampão fosfato), durante 20 minutos.

G) Montagem

As lamínulas foram depositadas sobre lâminas, após terem sido rapidamente passadas em solução tampão. A seguir seus bordos foram vedados com esmalte incolor.

3.8.3. Coloração de conídios

Conídios foram inoculados em meio completo, e após três dias de incubação à 37°C fez-se preparações citológicas dos conídios, seguindo-se o método descrito por ROBINOW e CATEN (1969), modificado por PAES de BARROS (1977).

Os conídios foram colocados em uma lamínula contendo uma gota de albumina 5%, homogeneizados e espalhados pela lamínula. O procedimento para a coloração foi o mesmo descrito no ítem 4.8.2. (2ª Técnica).

3.9. Análises estatísticas

A fim de se verificar se existe diferenças entre os diâme

tros dos conídios e núcleos fez-se a análise da variância segundo SNEDECOR e COCHRAN (1972). A seguir aplicou-se o teste de Tukey para comparar os contrastes entre duas médias de tratamentos através da seguinte fórmula:

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

onde:

q = valor da amplitude total estudentizada a nível de 5 ou 1% de probabilidade;

r = número de repetições.

s = estimativa do desvio padrão residual.

Todo contraste entre duas médias foi do tipo: $Y = \hat{m}_i - \hat{m}_u$.

Para análise de segregação meiótica dos segregantes resultantes de cruzamentos entre os variantes deteriorados e as linhagens controles com a linhagem MSE utilizou-se o teste do χ^2 .

O valor de recombinação entre os segregantes, na análise meiótica foi calculado pela seguinte fórmula:

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

onde:

C = valor de recombinação.

R = número de colônias recombinantes.

T = número total de colônias analisadas.

Uma vez obtidos os valores de recombinação calculou-se os respectivos desvios padrões, segundo a fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{p(1-p)}{N}} \times 100$$

onde:

p = frequência de recombinantes.

N = número total de colônias analisadas.

Para se verificar a existência de relação entre o diâmetro médio de ascos e o número de ascósporos foi feita uma análise de regressão linear segundo a metodologia de SOKAL e ROHLF (1969), onde o número de observações dentro de cada grupo não eram constantes.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção de variantes deteriorados

Para a obtenção de novos variantes deteriorados, inoculou-se conídios da linhagem A em meio completo à 37°C durante 10 dias. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Número de setores obtidos espontaneamente à partir da linhagem A.

Total de colônias	Amarelos	Setores verdes	Deteriorados	Heterocarióticos
171	101 (66,01%)	33 (21,57%)	18 (11,76%)	01 (0,65%)

Dos setores deteriorados muitos foram instáveis, e apenas dois foram escolhidos para análises genéticas. Os variantes foram numerados de acordo com a nomenclatura seguida por AZEVEDO E ROPER (1970), portanto receberam o número V_{67} e V_{68} .

O variante V₆₇ apresentou micélio amarelo claro, sem conídios, colônias pouco enrugadas e bordos irregulares, grande quantidade de células de Hülle, pouco instável (Figura 2).

O variante V₆₈ apresentou micélio castanho, poucos conídios, estável, com bordos irregulares, produção de muitos cleistotécios de tamanhos reduzidos em cruzamentos, porém não produziu ascósporos viáveis, o que impossibilitou análise meiótica, assim como análise citológica de ascos (Figura 2).

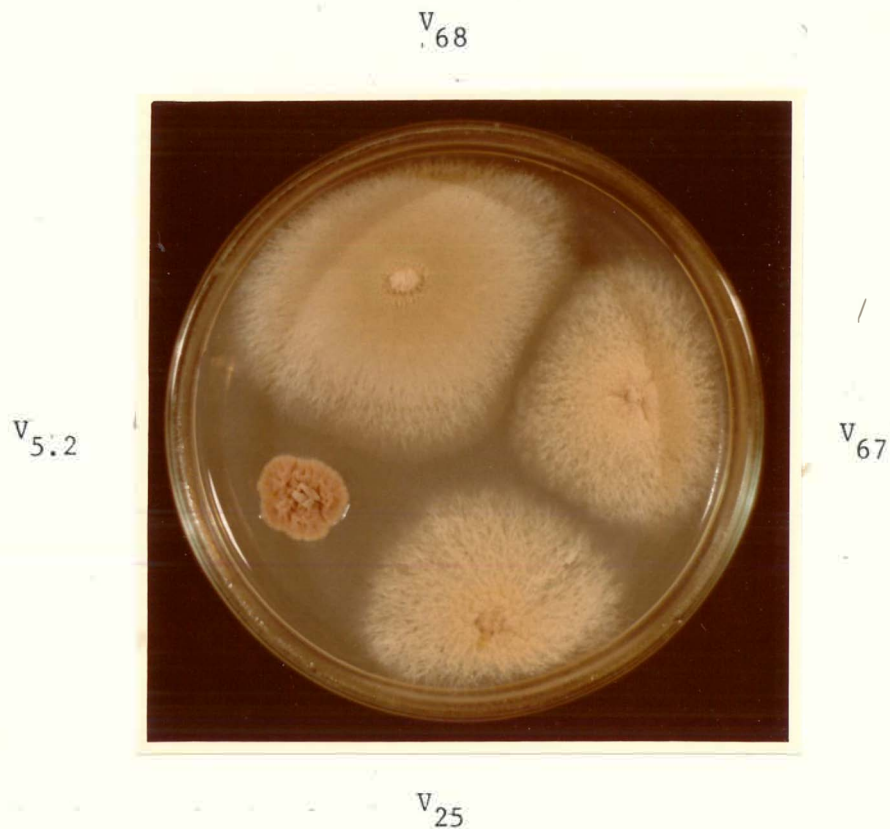


Figura 2 - Variantes deteriorados utilizados para estudos genéticos e citológicos.

4.2. Análises genéticas dos variantes deteriorados

4.2.1. Cruzamentos controles

Variantes deterioradas originadas da linhagem A, portadora de duplicação, foram analisadas meioticamente e mitoticamente para se localizar o determinante de deterioração em cada caso.

Duas dessas variantes foram estudadas por AZEVEDO (1971), e os resultados obtidos aqui foram comparados com aqueles obtidos pelo autor citado acima.

Cruzamentos foram feitos entre cada variante deteriorado com a linhagem "Master" (MSE). As linhagens A e ppy foram também cruzadas com a linhagem MSE como controle para todos os demais cruzamentos. Segregantes haplóides de A//MSE e ppy//MSE estão representados na Tabela 4, resultantes da haploidização com benlate.

Os resultados da análise meiótica dos mesmos cruzamentos são mostrados na Tabela 5. A segregação para marcas nutricionais e para cor ocorreu de acordo com o esperado (Tabela 6).

Tabela 4 - Segregantes haplóides de A//MSE e ppy//MSE.

Grupo de ligação	Marcas nutricionais	A//MSE	ppy//MSE
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	14	10
	<i>pro</i> <i>paba</i>	12	11
II	<i>w</i> ⁺	03	11
	<i>w</i>	23	10
III	<i>gal</i> ⁺	15	13
	<i>gal</i>	11	08
IV	<i>pyro</i> ⁺	11	08
	<i>pyro</i>	15	11
V	<i>fac</i> ⁺	16	11
	<i>fac</i>	10	10
VI	<i>s</i> ⁺	11	12
	<i>s</i>	15	09
VII	<i>nic</i> ⁺	15	11
	<i>nic</i>	11	10
VIII	<i>ribo</i> ⁺	14	14
	<i>ribo</i>	12	07

Tabela 5 - Análise meiótica dos cruzamentos A//MSE e *pro paba*//MSE.

	A X MSE	x^2_{Δ}	ppy X MSE	x^2_{Δ}
<i>pro</i> ⁺	23	0,69	25	0,02
<i>pro</i>	29		26	
<i>paba</i> ⁺	25	0,08	23	1,96
<i>paba</i>	27		28	
<i>w</i> ⁺	26	0,01	26	0,02
<i>w</i>	26		25	
<i>ad</i> ⁺	42	19,69**	45	29,82**
<i>ad</i>	10		06	
<i>bi</i> ⁺	51	48,08**	51	51,00**
<i>bi</i>	01		00	
<i>gal</i> ⁺	29	0,69	24	0,18
<i>gal</i>	23		26	
<i>pyro</i> ⁺	24	0,31	28	0,49
<i>pyro</i>	28		23	
<i>fac</i> ⁺	26	0,01	29	0,96
<i>fac</i>	26		22	
<i>s</i> ⁺	27	0,08	29	0,96
<i>s</i>	25		22	
<i>nic</i> ⁺	30	1,23	26	0,02
<i>nic</i>	22		25	
<i>ribo</i> ⁺	30	1,23	29	0,96
<i>ribo</i>	22		22	

**Significativo à nível de 1% de probabilidade.

Δ Baseado na proporção 1:1.

Tabela 6 - Segregação meiótica das marcas para cor nos cruzamentos controles.

	A X MSE	ppy X MSE
Branca	89	28
Amarela	66	26
Verde	43	-
TOTAL	198	54
χ^2_{Δ}	7,36	$\chi^2_{*} = 0,074$

Δ = Baseado na proporção 2:1:1 (brancos:amarelos:verde).

* = Baseado na proporção 1:1 (branco:amarelo).

4.2.2. Variantes deteriorados

Para efeito de comparação, todas as análises mitóticas foram realizadas através de haploidização com cloroneb, benlate e p-fluorofenilalanina.

4.2.2.1. V_{25}

A Tabela 7 fornece os resultados da análise de haplóides do cruzamento entre V_{25} X MSE. Através da análise meiótica obteve-se os valores de recombinação entre o determinante de deterioração e os marcadores genéticos (Tabela 8). Por essa análise constatou-se que o determi

nante de deterioração se encontra localizado à 12,1 unidades de recombinação da marca *pyroA₄*, no grupo de ligação IV. Além desse fator de deterioração está envolvido também um complexo rearranjo estrutural entre os grupos de ligação VII e VIII e entre os grupos de ligação I e VI. Com exceção de 1 setor originado à partir da haploidização com Benlate e três com pFA, todos os setores *nic⁺* foram também *ribo⁺* e os *ribo⁻* foram também *nic⁻*.

Com relação aos grupos de ligação I e VI, verificou-se que pela haploidização com pFA, apenas 1 setor foi *s⁺ pro⁻ paba⁻*, os demais foram *s⁺ pro⁺ paba⁺*; o mesmo ocorreu com o Benlate, onde 11 setores foram *pro⁺ paba⁺ s⁺*, e 6 *pro⁻ paba⁻ s⁻* dos 23 analisados.

A Tabela 9 mostra a segregação meiótica do fenótipo deteriorado.

Tabela 7 - Análise mitótica do variante V₂₅.

	Cloroneb		Benlate		pFA	
	N	D	N	D	N	D
<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	33	00	17	00	15	00
<i>pro paba</i>	00	00	06	00	04	00
<i>w</i> ⁺	04	00	13	00	04	00
<i>w</i>	29	00	10*	00	15	00
<i>gal</i> ⁺	00	00	13	00	07	00
<i>gal</i>	33	00	10	00	12	00
<i>pyro</i> ⁺	13	00	00	00	00	00
<i>pyro</i>	19	00	23	00	19	00
<i>fac</i> ⁺	20	00	13	00	17	00
<i>fac</i>	13	00	10	00	02	00
<i>s</i> ⁺	14	00	11	00	16	00
<i>s</i>	19	00	12	00	03	00
<i>nic</i> ⁺	24	00	04	00	12	00
<i>nic</i>	09	00	19	00	07	00
<i>ribo</i> ⁺	14	00	03	00	09	00
<i>ribo</i>	14	00	20	00	10	00

Tabela 8 - Análise meiótica do variante V₂₅.

	Normais	Deterio- rados	χ^2	Valor de ligação	s
<i>pro</i> ⁺	26	11	0,00		
<i>pro</i>	26	11			
<i>paba</i> ⁺	31	10	0,08		
<i>paba</i>	21	12			
<i>pyro</i> ⁺	07	20	5,40	12,1	0,40
<i>pyro</i>	45	02			
<i>s</i> ⁺	37	21	23,8**		
<i>s</i>	15	01			
<i>nic</i> ⁺	33	12	3,44		
<i>nic</i>	19	10			
<i>ribo</i> ⁺	38	10	6,54*		
<i>ribo</i>	14	12			

**Significativo à nível de 1% de probabilidade, baseado na proporção de 1:1.

*Significativo à nível de 5% de probabilidade baseado na proporção de 1:1.

Tabela 9 - Segregação meiótica do fenótipo deteriorado: V_{25} X MSE.

F e n ó t í p o		Nº de colônias
Normais (317)	branca	154
	amarela	80
	verde	83
Deteriorados (54)		54

X^2 = Baseado na proporção de 1 Normal : 1 deteriorado = 186,4 (significativo à nível de 1% de probabilidade).

Baseado na proporção de 6 Normais : 1 deteriorado = 0,021 (não significativo).

4.2.2.2. Variante $V_{5.2}$

O $V_{5.2}$ é um setor deteriorado originado de V_5 . Segundo AZEVEDO (1971), o determinante de deterioração de V_5 está localizado no grupo de ligação VIII. Segregantes haplóides de $V_{5.2}$ //MSE revelaram que um novo determinante de deterioração localizou-se no grupo de ligação V.

A Tabela 10 mostra a análise dos setores obtidos através de haploidização, porém devido ao número escasso de setores deteriorados não foi possível determinar com segurança a localização do determinante de deterioração $v_{5.2}$, apenas o v_5 pode ser localizado, confirmando os dados anteriormente obtidos.

Nenhum rearranjo cromossômico foi encontrado.

Pela segregação meiótica do fenótipo deteriorado, pode-se separar esta classe em dois tipos, segregantes compactos de crescimento bastante reduzido e segregantes deteriorados "crinckled", porém não compactos. (Tabela 12). (Figura 3).

A análise meiótica é mostrada na Tabela 11.

Tabela 10 - Análise mitótica do variante V_{5.2}.

	Cloroneb		Benlate		pFA			
	N	D	N	D	N	Comp.	Det. V ₅	Det. V _{5.2}
<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	31	0	15	0	44	1	1	0
<i>pro paba</i>	09	1	00	0	02	0	0	1
<i>w</i> ⁺	24	1	02	0	10	0	1	1
<i>w</i>	16	0	13	0	36	1	0	0
<i>gal</i> ⁺	00	1	09	0	19	0	1	1
<i>gal</i>	40	0	06	0	27	1	0	0
<i>pyro</i> ⁺	17	0	10	0	31	0	0	1
<i>pyro</i>	23	1	05	0	15	1	1	0
<i>fac</i> ⁺	28	0	10	0	31	1	0	1
<i>fac</i>	12	1	05	0	15	0	1	0
<i>s</i> ⁺	13	1	09	0	25	0	1	1
<i>s</i>	27	0	06	0	21	1	0	0
<i>nic</i> ⁺	21	0	10	0	27	0	0	1
<i>nic</i>	19	1	05	0	19	1	1	0
<i>ribo</i> ⁺	21	0	00	0	00	1	1	1
<i>ribo</i>	19	1	15	0	46	0	0	0

Tabela 11 - Análise meiótica de V_{5.2}.

	Normais	Deteriorados		χ^2
		Compactos	Não compactos	
<i>fac</i> ⁺	23	11	14	0,09
<i>fac</i>	29	12	10	
<i>ribo</i> ⁺	05	05	15	24,24**
<i>ribo</i>	47	18	09	

**Significativo à 1% de probabilidade, para a proporção de 1:1.

Tabela 12 - Análise da segregação meiótica do fenótipo deteriorado de $V_{5.2}$

		Cleisto técio 1	Cleisto técio 2	Cleisto técio 3	
Normais	Não Crinkled.	brancos	58	46	45
		amarelos	34	53	17
		Verdes	12	25	05
	Crinkled	brancos	06	10	04
		Amarelos	03	02	01
		Verdes	01	02	04
Deterio- rados	Compactos	100	177	75	
	Não Compactos	26	33	23	
χ^2	1D:1N	0,6 ns	14,8**	2,78 ns	
	2D:1N	21,65**	6,25*	8,30**	
	3D:1N		39,85**		

ns = Não significativo.

* = Significativo à 5% de probabilidade.

** = Significativo à 1% de probabilidade.

4.2.2.3. Variante V_{67}

Este variante foi obtido espontaneamente da linhagem A, e pela análise dos setores haplóides do diplóide V_{67} //MSE (Tabela 13) constatou-se que existe uma translocação VI-V e provavelmente o fator de deterioração deva estar envolvido neste rearranjo.

Tabelas 14 e 15 mostram as análises meióticas e segregacional, respectivamente.



Figura 3 - Segregantes normais e deteriorados (compactos e não compactos) do cruzamento $V_{5.2}$ X MSE.

Tabela 13 - Análise mitótica do variante V₆₇.

	Cloroneb		Benlate		pFA	
	N	D	N	D	N	D
<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	20	0	22	0	26	0
<i>pro paba</i>	06	0	03	1	20	1
<i>w</i> ⁺	03	0	17	1	05**	1
<i>w</i>	23	0	08	0	41	0
<i>gal</i> ⁺	17	0	18	0	26	0
<i>gal</i>	09	0	07	1	20	1
<i>pyro</i> ⁺	17	0	13	0	20	0
<i>pyro</i>	09	0	12	1	26	1
<i>fac</i> ⁺	14	0	11	1	30	1*
<i>fac</i>	12	0	14	0	16	0
<i>δ</i> ⁺	13	0	13	1	32	1*
<i>δ</i>	13	0	12	0	14	0
<i>nic</i> ⁺	13	0	20	0	26	1
<i>nic</i>	13	0	05	1	20	0
<i>ribo</i> ⁺	09	0	10	0	19	0
<i>ribo</i>	17	0	15	1	27	1

** = Três deles mantiveram a duplicação I → II.

* = A maioria dos setores *δ*⁺ foram também *fac*⁺ e vice-versa.

Tabela 14 - Análise meiótica do variante V₆₇, considerando apenas as marcas envolvidas no rearranjo.

	Normais	Deteriorados	χ^2
fac^+	44	15	2,5
fac	34	09	
δ^+	35	19	0,34
δ	43	05	

Tabela 15 - Segregação do fenótipo deteriorado V_{67} .

	Fenótipo	Nº de colônias
Normais (168)	Branças	87
	Amarelas	46
	Verdes	35
Deteriorados (63)		63

X^2 para a proporção 1:1 (normal:deteriorado) = 47,6 significativo.

X^2 para a proporção 3:1 (normais:deteriorado) = 0,62 não significativo.

4.2.2.4. Variante V₆₈

Através da análise mitótica deste variante (Tabela 16), foi possível localizar uma translocação III - VI. Este variante é um setor deteriorado da linhagem A, e que provavelmente perdeu parte do segmento do I em duplicata, pois ela é auxotrófica para as marcas *ad* e *bi* (Figura 4).

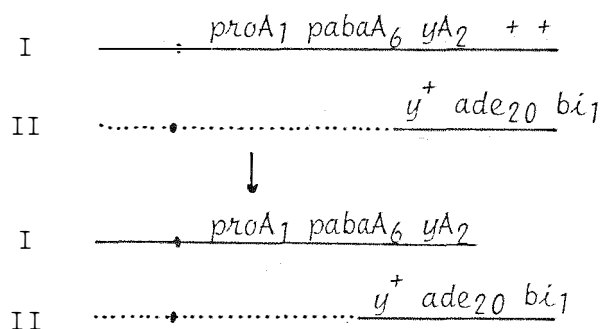


Figura 4 - Possível constituição do variante V₆₈, com relação aos grupos de ligação I e II.

Não foi possível analisar meioticamente este variante, pois, embora houvesse produção de uma grande quantidade de cleistotécios, não houve produção de ascósporos viáveis nos muitos cleistotécios em que se tentou fazer a análise. Este fato deve-se provavelmente ao rearranjo envolvido neste variante.

Tabela 16 - Análise mitótica do variante V₆₈.

	Cloroneb		Benlate		pFA	
	N	D	N	D	N	D
<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	20	1	26	0	26	0
<i>pro</i> <i>paba</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Bio</i> ⁺	17	1	21	0	25	0
<i>Bio</i>	03	0	04	0	01	0
<i>ad</i> ⁺	20	1	26	0	26	0
<i>ad</i>	0	0	0	0	0	0
<i>w</i> ⁺	05	1	13	0	11	0
<i>w</i>	15	0	13	0	15	0
<i>gal</i> ⁺	08	1	05	0	11	0
<i>gal</i>	12	0	21	0	14	0
<i>pyro</i> ⁺	13	1	15	0	17	0
<i>pyro</i>	07	0	09	0	08	0
<i>fac</i> ⁺	10	0	05	0	21	0
<i>fac</i>	09	1	21	0	05	0
<i>s</i> ⁺	10	1	05	0	14	0
<i>s</i>	09	0	21	0	11	0
<i>nic</i> ⁺	12	1	21	0	19	0
<i>nic</i>	07	0	05	0	03	0
<i>ribo</i> ⁺	13	1	10	0	21	0
<i>ribo</i>	07	0	16	0	05	0

4.3. Análises citológicas

4.3.1. Análise de ascos

Através das análises genéticas pode-se observar que alguns variantes apresentaram uma proporção segregacional diferente de 1:1 (normal:deteriorado). Esta proporção alterada é devido, em alguns casos, à produção de ascósporos defectivos no interior do asco, ou a produção de um número menor que oito ascósporos.

A Tabela 17 mostra os diâmetros médios e os respectivos desvios padrões dos ascos medidos, assim como o número de ascósporos no interior de cada asco.

A Tabela 18 apresenta a análise de variância considerando o diâmetro médio dos ascos em grupos com 8-7-6-5-4 ascósporos no interior dos mesmos.

Na Figura 5 está representada a reta obtida pela equação de regressão para número de ascósporos e diâmetro de asco.

Para este tipo de análise considerou-se apenas ascos maturos, e aqueles que com certeza não apresentaram rompimento de parede como consequência da técnica.

Como controle foram usadas as linhagens A, ppy e o variante deteriorado livre de translocação, V_5 , o qual apresentou uma segregação de 1:1 (AZEVEDO e ROPER, 1970).

Tabela 17 - Diâmetros médios (\hat{m}) e respectivos desvios padrões (s) de ascos com diferentes números de ascósporos.

Linhasgens	Nº de Ascósporos	Segre- gão nº de ascos \hat{m} s	7 \hat{m} s	6 \hat{m} s	5 \hat{m} s	4 \hat{m} s	Total	
							m/defect.	7 + 1 defect.
A		31 12,23 0,64						
ptaA1 papa y2		31 12,72 0,76						
V ₅	1N:1D	61 9,55 1,73						
V _{5.2}	1N:1D	93 12,89 1,72						
V ₆₇	3N:1D	63 12,64 1,57 39 10,89 1,24 24 10,38 0,92 15 9,72 0,75 1 8,11 13 9,21 0,035 -						
*V ₂₅	6N:1D	29 13,82 0,83 5 13,34 0,79 3 13,10 2,01 - - - 6 9,17 0,57 2 13,98 0						

*Apresentou muitos ascos defectivos que não puderam ser medidos.

As Figuras 6A-6B; 7A-7B, mostram ascos contendo ascósporos defectivos e ascos com ascósporos contendo um número inferior à 8, quando comparados com as linhagens controles (Figuras 9A-9B).

O número de núcleos em ascósporos maduros é igual à 2 (ELLIOTT, 1960). Quando os ascósporos se encontram no interior dos ascos, o número de núcleos é igual à 1, (Figura 10), mesmo quando a linhagem é portadora de conídios binucleados como é o caso da linhagem MSE_{bin}.

Tabela 18 - Análise da variância considerando o diâmetro médio dos ascos em grupos com 8-7-6-5-4 ascósporos.

	G.L.	Q.M.
Entre grupos	4	4,6069 ^{n.s.}
R.L.	1	17,0044**
D.R.	3	0,4744 ^{n.s.}
Dentro de Grupos	11	2,2511

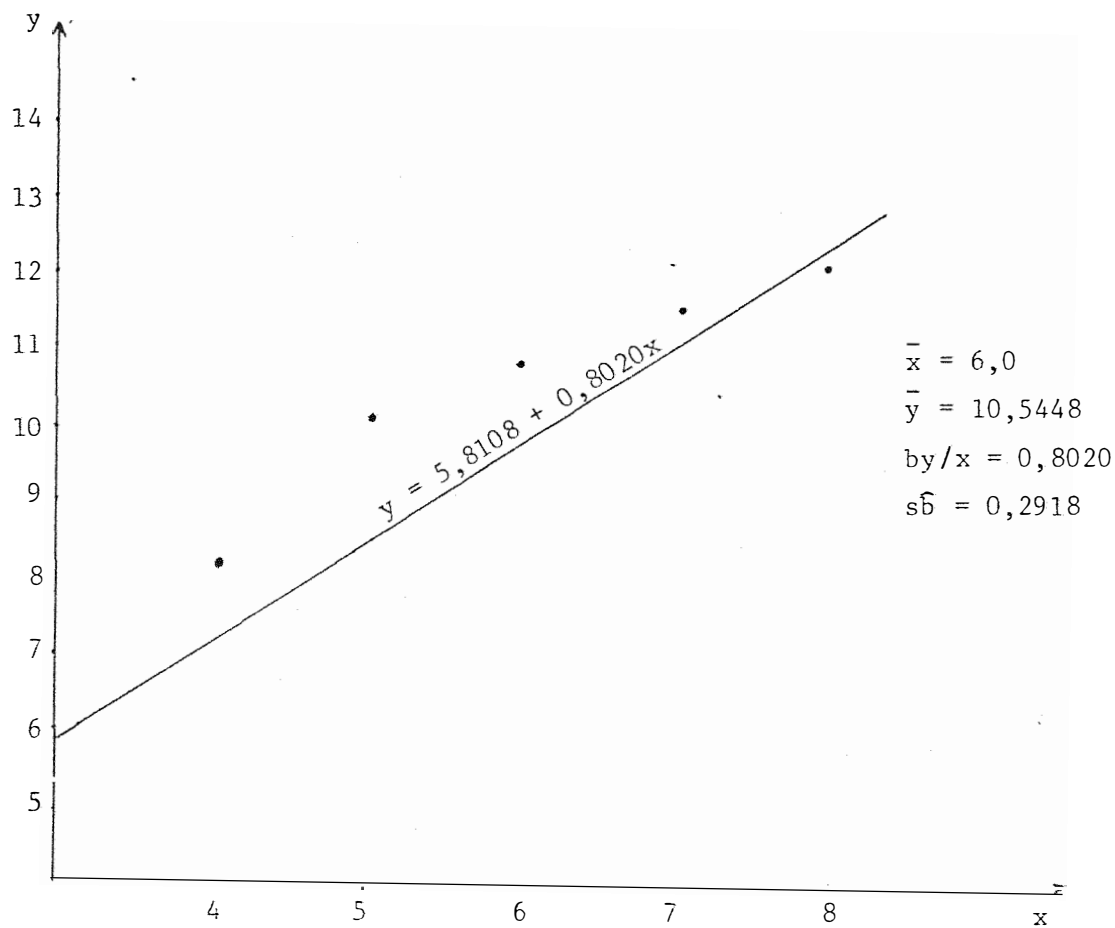
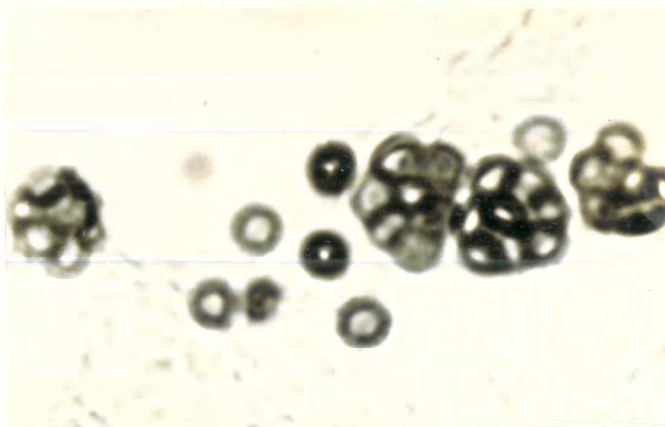
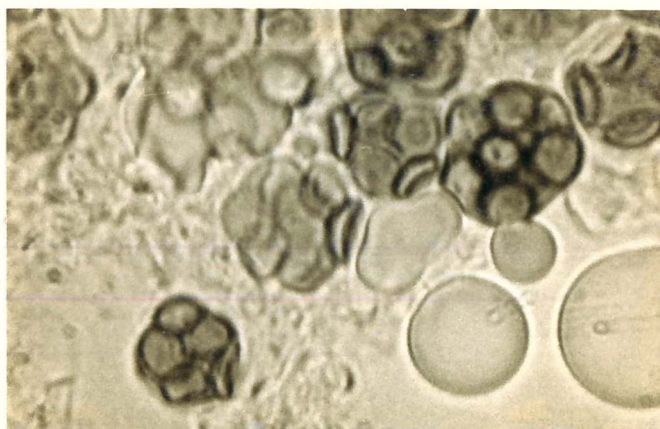


Figura 5 - Reta obtida através da equação de regressão; x representa o nº de ascósporos, e y o diâmetro do asco.

Figura 6 - Ascospores contendo ascósporos abortivos.

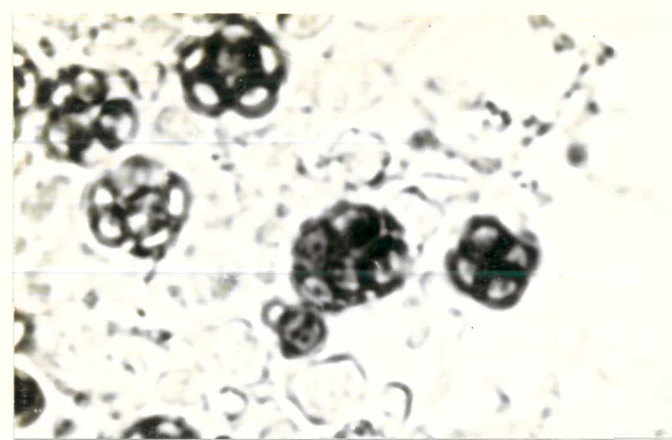


A) Asco do cruzamento V_{67} X MSE (aumento de 2.600x).

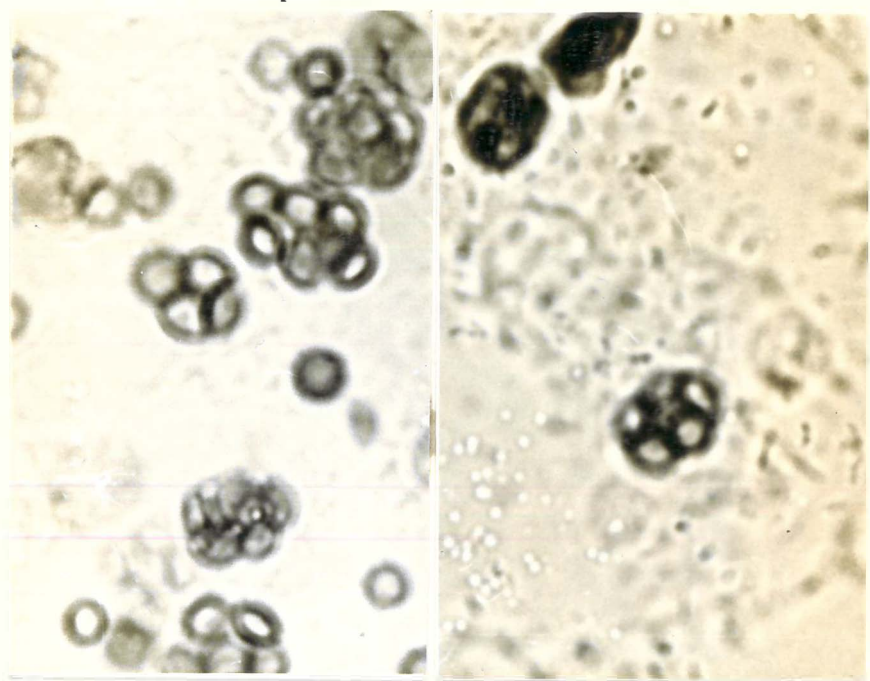


B) Asco do cruzamento V_{25} X MSE (aumento de 2.600x).

Figura 7 - Ascospores contendo um número de ascósporos inferior a 8.



A) Asco do cruzamento V₂₅ X MSE, contendo apenas 4 ascósporos. (Aumento de 2.500x).



B) Ascospores do cruzamento V₆₇ X MSE, contendo 4 e 6 ascósporos. (Aumento de 2.600x).

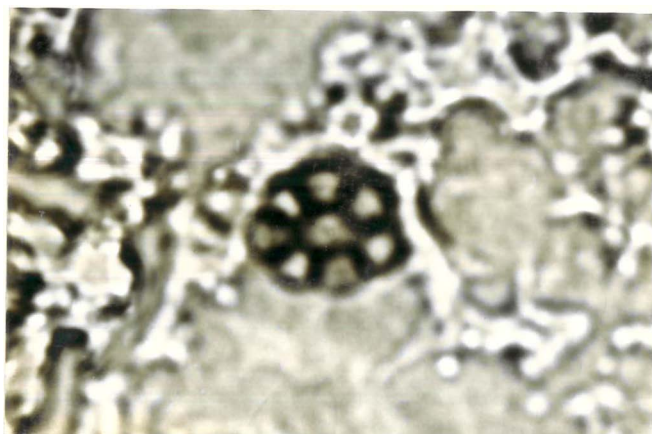
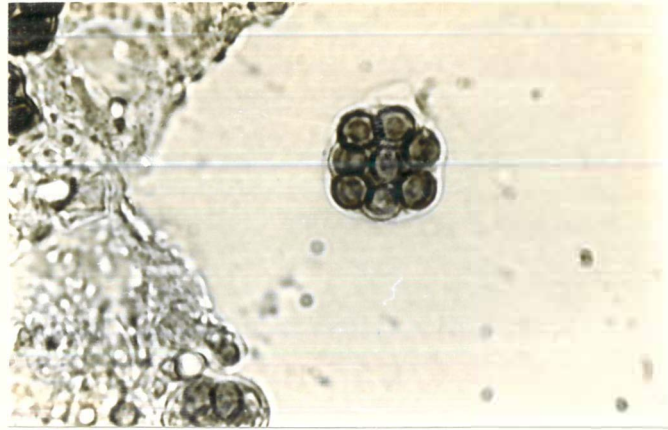


Figura 8 - Asco proveniente do cruzamento
V_{5.2} X MSE. (Aumento de 2.500x).



A) Ascospores do cruzamento A X MSE. (Aumento de 2.600x).



B) Ascospores do cruzamento ppy X MSE. (Aumento de 2.500x).

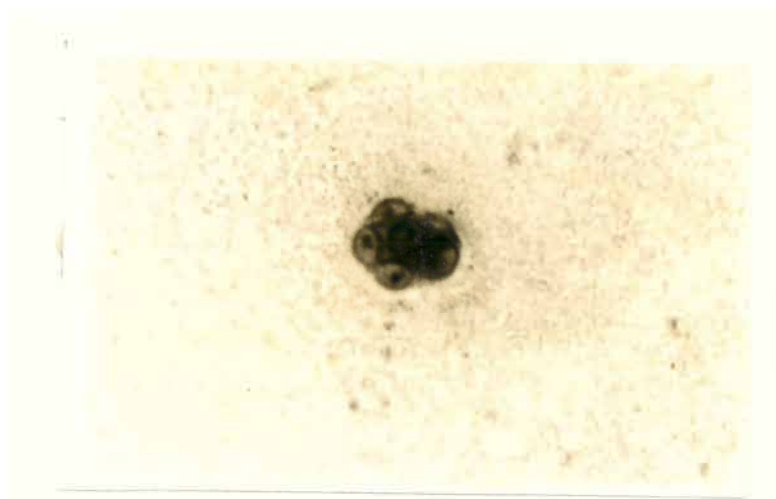


Figura 10 - Asco proveniente do cruzamento V_{25} X MSE, corado pela Técnica HCl-Giemsa para evidenciar os núcleos dos ascósporos. (Aumento de 2.500x).

4.3.2. Diâmetro de conídios e seus núcleos; número de núcleos

A Tabela 19 mostra os valores médios (\bar{m}) e os respectivos desvios padrões (s) dos diâmetros de 30 conídios haplóides e de seus núcleos para os variantes deteriorados e linhagens A, MSE, ppy. Os resultados da análise da variância dos dados apresentados na Tabela 19 estão colocados na Tabela 20. Para a comparação entre os diâmetros de conídios e núcleos de variantes deteriorados e linhagens normais utilizou-se o teste de Tukey (Tabela 21).

O variante V_{32} gal nic fac, apresentou conídios uni, bi e trinucleados (Figura 11). A frequência destes estão representados na Tabela 22.



Figura 11 - Conídios uni, bi e trinucleados do variante V_{32} gal nic fac.

Tabela 19 - Valores médios (\hat{m}) e os desvios padrões (s) de 30 conídios e núcleos haplóides em alguns variantes deteriorados e nas linhagens A, MSE e ppy.

Variantes deteriorados	Diâmetro em micra (μ)			
	Conídio		Núcleo	
	\hat{m}	s	\hat{m}	s
V _{5.2}	1,71	0,25	0,93	0,13
V ₅	3,50	0,40	1,28	0,13
V _{32 gal nic ac}	4,99	0,43	2,05	0,20
V ₂	2,13	0,28	0,97	0,17
V ₉	2,18	0,28	1,29	0,19
V _{5.1}	2,29	0,30	1,60	0,29
V ₃	2,83	0,52	1,67	0,33
A	4,30	0,23	2,05	0,19
MSE	3,50	0,55	1,72	0,19
ppy	4,00	0,24	1,476	0,17

Tabela 20 - Análise da variância da medida de diâmetro de conídios e núcleos haplóides de variantes deteriorados e das linhagens A, MSE e ppy.

	F.V.	G.L.	Q.M.	C.V.
	Tratamento	9	34,80**	10,66%
a) Diâmetro do conídio	Resíduo	290	0,11273	
	Total	299		
	Tratamento	9	4,614**	18,67%
b) Diâmetro do núcleo	Resíduo	290	0,0785	
	Total	299		

**Significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 21 - Comparação das médias dos diâmetros de núcleos e conídios através do teste de Tukey, de variantes deteriorados e das linhagens A, MSE e ppy.

	Ø Conídios			Ø Núcleos		
	A	MSE	ppy	A	MSE	ppy
A		**	*		**	**
MSE			**			n.s.
PPY						
V ₂	**	**	**	**	**	**
V ₃	**	**	**	**	n.s.	n.s.
V ₅	**	n.s.	**	**	**	n.s.
V _{5.1}	**	**	**	**	n.s.	n.s.
V _{5.2}	**	**	**	**	**	**
V ₉	**	**	**	**	**	n.s.
V _{32 gal nic ac}	**	**	**	n.s.	**	**
		$\Delta = 0,27$	(5%)		$\Delta = 0,23$	(5%)
		$\Delta = 0,31$	(1%)		$\Delta = 0,26$	(1%)

*Significativo à 5% de probabilidade.

**Significativo à 1% de probabilidade.

n.s. = não significativo.

Tabela 22 - Frequência de conídios haplóides uni, bi e tri nucleados no variante V_{32} gal nic fac.

	Frequência de núcleos			Nº de conídios observados
	1	2	3	
V_{32} gal nic fac.	38,06%	53,4%	8,52%	176

5. DISCUSSÃO

5.1. Características dos variantes deteriorados

Todos os variantes estudados apresentaram características morfológicas semelhantes já descritas anteriormente por outros autores (AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971; MENEZES, 1974; ROSATO e AZEVEDO, 1978; NIFFINEGGER e SOUZA, 1979).

Além da morfologia "crinkled", das alterações na taxa de crescimento e conidiação, outras anormalidades foram observadas como, formação de cleistotécios sem ascosporos viáveis (variante V_{68} , ítem 4.2.2.4), abundante quantidade de células de Hülle na fase vegetativa (variante V_{68} ítem 4.1.), não produção de cleistotécios (variante V_{32} gal nic fac) e outras, sugerem que os efeitos causados por aberrações cromossômicas são muito mais amplos do que simples anomalias morfológicas das colônias (Figura 2).

O variante V_{67} apresenta-se como um bom material para se mapear a translocação nele existente, assim como, estudar detalhadamente os padrões de aborto de ascosporos, decorrente dessa aberração.

5.2. Análises genéticas

5.2.1. Cruzamentos controles

As segregações meióticas e mitóticas dos cruzamentos controles, ocorreram de acordo com o esperado.

Para o caso do cruzamento A X MSE, as marcas adE_{20} e biA_1 (Tabelas 5), segregaram, nos dois casos em proporções diferentes de 1:1 o que é explicado pela presença do segmento em duplicata ($adE_{20} biA_1$) do grupo de ligação I, translocado para o grupo de ligação II na linhagem A e também, no caso de adE_{20} , pela presença de supressor na linhagem MSE.

No segundo cruzamento controle (ppy X MSE) (Tabela 5), como ppy e MSE são linhagens prototróficas para biotina e adenina, a proporção de 1:1 não foi observada, muito embora surgiram alguns segregantes adE_{20} , o que é explicado pela presença do gene supressor da adenina ($suA adE_{20}$) na linhagem MSE, esperando-se portanto uma proporção de 3 ad^+ para 1 ad^- o que foi verificado ($\chi^2 = 4,76$).

5.2.2. Variantes deteriorados

A análise genética dos variantes deteriorados, todos originados espontaneamente a partir da linhagem A, com duplicação cromossômica revelou além da existência de translocações (variantes V_{25} , V_{67} , V_{68} , Tabelas 7, 13 e 16, respectivamente), também a presença de um único determinante de deterioração (variante V_{25} , Tabela 7) ou de dois determinantes de deterioração ($V_{5,2}$, Tabela 10).

Em todos os casos, com excessão do variante V_{68} , o qual não foi possível analisar meioticamente, a segregação de 1 normal: 1 deteriorado não foi verificada. Isso pode ser explicado pelos padrões de aborto de ascósporos e pela presença de duplos determinantes de deterioração. AZEVEDO e ROPER (1970); AZEVEDO (1971); NIFFENEGGER e SOUZA (1979), explicaram esse desvio na segregação, como sendo causado por seleção contra colônias originárias de ascósporos possuindo o determinante de deterioração.

Em *Aspergillus nidulans* aneuplóides podem se originar de conídios haplóides, diplóides ou de ascósporos. KÄFER (1961), mostrou que conídios aneuplóides resultantes de não disjunção mitótica ocorrem com uma freqüência relativamente alta de 1 à 2%. Os aneuplóides mais estudados são os dissômicos ($n + 1$) com uma freqüência de 0.1 à 0.3% (UPSHALL, 1966). Aberrações cromossômicas aumentam a freqüência de não disjunção meiótica, principalmente para os cromossomos envolvidos na aberração (KÄFER, 1965), produzindo um maior número de dissômicos para esses cromossomos (POLLARD *et alii*, 1968; UPSHALL, 1974; UPSHALL e KÄFER, 1974). Uma alta freqüência de não disjunção mitótica do grupo de ligação II foi observada por AZEVEDO e ROPER (1970) e estudada com mais detalhe por GABRIELLI e AZEVEDO (1980) em um isolado denominado V_8 , o qual se originou como um setor espontaneo da linhagem A.

Em *A. nidulans*, colônias aneuplóides tem um crescimento reduzido, são instáveis, apresentam pouca conidiação, morfologia alterada e produzem setores haplóides por perda de um dos cromossomos (UPSHALL, 1971, KÄFER e UPSHALL, 1973).

Pela morfologia, ausência de conidiação e pela segregação do variante V_{25} (Tabelas 7 e 8), parece ser ele dissômico para o grupo de ligação VI. KÄFER e UPSHALL (1973), caracterizaram os fenótipos dos dissômicos para os oito grupos de ligação de *A. nidulans*. As características do variante V_{25} ($n+VI$) são condizentes com aquelas descritas pelos autores acima mencionados. Uma grande região de um dos cromossomos envolvidos nessa aberração numérica, foi provavelmente translocada para o grupo de ligação I, no braço oposto ao braço onde estão localizadas as marcas $proA_1$, $pabaA_6$, yA_2 , pois estas se segregaram normalmente quando este variante foi cruzado com a linhagem MSE (Tabela 8). A Figura 12 mostra a possível constituição da linhagem V_{25} e do diplóide $V_{25} // MSE$, com relação aos grupos de ligação envolvidos na aberração.

Devido ao rearranjo envolvendo os grupos de ligação I e VI poderia existir uma tendência de não disjunção entre esses dois grupos de ligação, de forma que eles se segregariam preferencialmente juntos durante as divisões mitóticas, quando cruzado com a linhagem MSE. A Figura 13 mostra os possíveis passos dessa segregação.

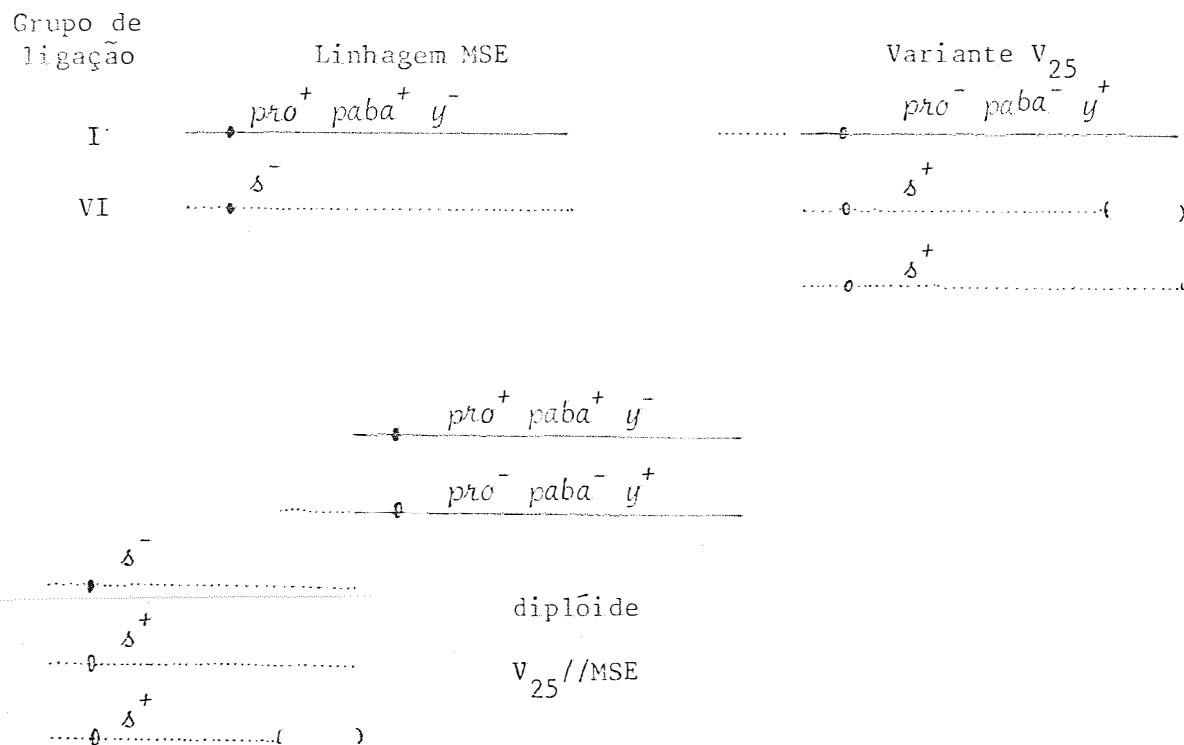


Figura 12 - Possível constituição da linhagem V_{25} , dissômica para o grupo de ligação VI, e do diplóide V_{25}/MSE . Os centrômeros estão representados por círculos escuros (linhagem normal) e círculos claros (linhagem dissômica). As linhas contínuas representam o grupo de ligação I e as interrompidas o grupo de ligação VI; os parênteses simbolizam o segmento que sofreu elisão e foi translocado para o grupo de ligação I.

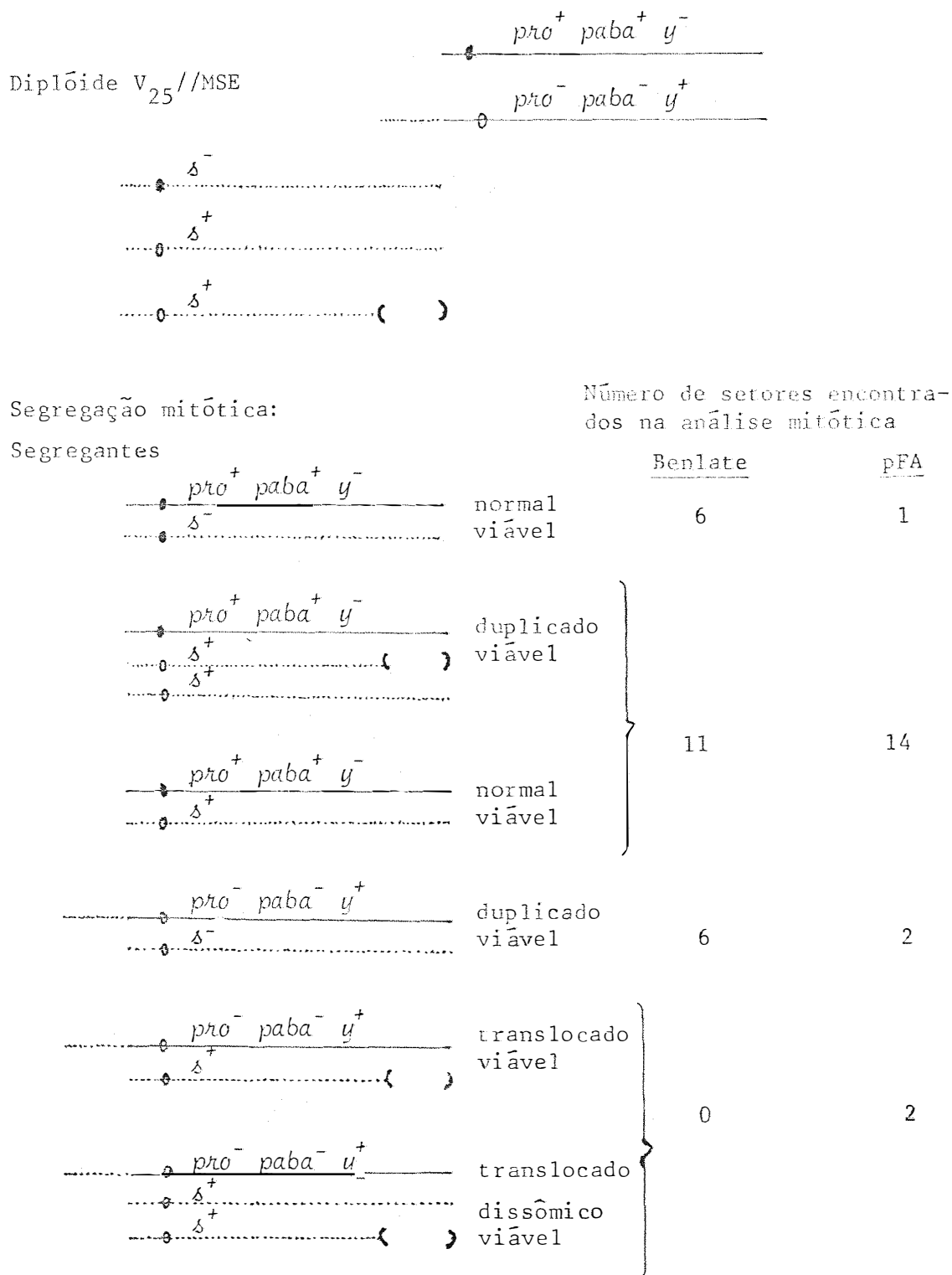
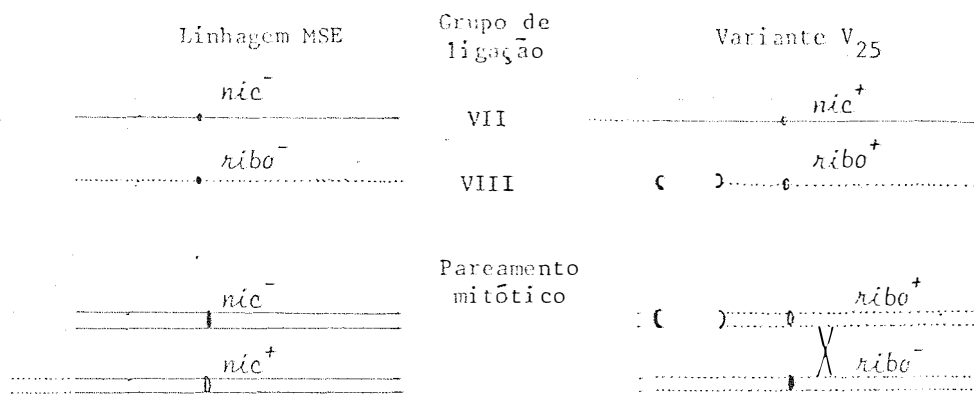


Figura 13 - Modelo proposto para explicar a segregação mitótica dos cromossomos I e VI de diplóides V_{25} //MSE.



Estágio de 4 fios. Permuta mitótica entre centrômero e a marca *ribo*.

Segregantes possíveis:

Número de setores observados na análise mitótica.

		<u>Benlate</u>	<u>pFA</u>
()	 translocado viável (parental)	2	8
()	 duplicação viável (recombinante)		
()	 duplicação viável (parental)	2	3
()	 translocação viável (recombinante)		
()	 normal (parental)	18	7
()	 deleção inviável (recombinante)		
()	 deleção inviável (parental)		
()	 normal (recombinante)	1	-

Figura 14 - Permuta mitótica e segregação no diplóide $V_{25} // MSE$, considerando uma translocação VIII - VII. Os centrômeros estão representados por círculos claros (linhagem portadora de translocação) e círculos escuros (linhagem normal).

Além dessa provável dissomia encontrada no variante V_{25} , outra aberração foi observada, uma translocação envolvendo os grupos de ligação VII e VIII (Tabela 7). O determinante de deterioração foi localizado no grupo de ligação IV a uma distância de 12.1 unidades mapa ($s=0.40$) da marca *pyroA*₄ (Tabela 7 e 8). Essa translocação (VII - VIII) pode ter ocorrido intersticialmente ou de maneira insercional no braço oposto à marca *riboB*₂ no grupo de ligação VIII, ou oposta à marca *nicB*₈ no grupo de ligação VII. Através de uma permuta mitótica no diplóide $V_{25} // MSE$, originaram-se os setores *nic*⁺ *ribo*⁻ ou *nic*⁻ *ribo*⁺. A Figura 14 representa a segregação mitótica desses grupos de ligação, explicando a origem das classes recombinantes (Tabela 7).

Pode-se supor o mesmo mecanismo apresentado na Figura 14, caso a translocação tenha ocorrido no sentido VII → VIII. Para um correto mapeamento entre marcas e o ponto de quebra da translocação seria necessário um maior número de marcadores genéticos e conseqüentemente novas análises genéticas.

A segregação meiótica do fenótipo deteriorado (Tabela 9) desvia bastante da segregação usual 1:1 (normal: deteriorado). Pelas análises citológicas pode-se observar uma grande quantidade de ascósporos deficientes (Tabela 17, Figura 6B), e de ascos com um número de ascósporos inferior à oito (Figura 7A, Tabela 17). Isso é esperado pela presença de dois rearranjos cromossômicos. A origem meiótica desses tipos de ascos é discutida no item 6.3.

Este variante V_{25} foi isolado e caracterizado há alguns anos atrás por AZEVEDO (1971). Pelos dados obtidos por esse autor, o determinan

te de deterioração deste variante estava envolvido no rearranjo cromossômico VII - VIII. Pelos dados aqui obtidos, o determinante de deterioração localizou-se no grupo de ligação IV (Tabelas 7 e 8), e este variante sofreu rearranjos no genoma, além da translocação VII - VIII. Essas alterações são evidentes e podem ser explicadas pela alta instabilidade de sistema e pela presença de elementos transponíveis, os quais não sendo fixos podem mudar de posição no genoma, levando consigo, parte do DNA do local onde ele estava inserido anteriormente.

Os primeiros estudos associados a genes mutadores foram feitos por EMERSON (1914; 1917). DEMEREC (1941) evidenciou a autonomia de diversos genes mutadores em *Drosophila viridis*, conduzindo a um comportamento genético instável. Outros casos de instabilidade foram descritos por McCLINTOCK (1951) em milho, surgindo o conceito de elementos controladores. PETERSON (1953, 1960) detectou instabilidade em milho, no locus *pg* (pale green seedling) devido ao elemento $\bar{E}n$ (Enhancer), em milho. Posteriormente no seu estoque *pg*, ele isolou um novo locus mutante a_1 (não produção de antocianina na aleurona e na planta), e mais tarde isolou um novo alelo a_2 (não produção de antocianina na aleurona e na planta), a partir de uma planta carregando o alelo a_1 (PETERSON, 1968). A nova instabilidade foi atribuída ao mesmo elemento controlador ($\bar{E}n$). Em uma planta carregando um elemento transponível, qualquer gene desta planta pode tornar-se "infectado" pelo elemento (FINCHAM e SASTRY, 1974).

Em microorganismos diversos casos de instabilidade já foram descritos. Em *Neurospora*, NEWMEYER (1965) e NEWMEYER e TAYLOR (1967), relacionaram instabilidade à inversão pericêntrica, que através de permu-

ta dá origem à produtos duplicados e deficientes letais. Em *A. nidulans*, linhagens com duplicação cromossômica são instáveis na mitose (BAINBRIDGE e ROPER, 1966; NGA e ROPER, 1968). Variantes deteriorados surgem através de novas duplicações em tandem, ou de transposições do segmento extra para novos sítios de inserção. Variantes melhorados surgem via deleção de um ou outro segmento em duplicata (AZEVEDO e ROPER, 1970).

Uma outra possível explicação para os resultados adicionais aqui encontrados com relação ao variante V_{25} , quando comparados com os dados anteriores (AZEVEDO, 1971) é baseado no esquema da Figura 16. Este tipo de pareamento pode ter ocorrido ocasionalmente na mitose e o fragmento de DNA acêntrico, ou parte dele poderia ter-se inserido em algum lugar no genoma (em específico no grupo de ligação IV). A formação de pontes pode ter tido como consequência uma não disjunção do cromossomo VI, tornando o variante V_{25} dissômico para este grupo de ligação. Deve ser considerado também, que este variante, durante cerca de doze anos, foi estocado e submetido à várias repicagens sucessivas, o que aumenta a probabilidade de transposições desses segmentos de DNA para novas posições no genoma. Essas transposições poderiam alterar não só a expressão gênica, como também provocar novas alterações estruturais no genoma (McCLINTOCK, 1951, 1955, 1956, 1965; PETERSON, 1968, 1970a, 1970b, 1976; AZEVEDO e ROPER, 1970; FINCHAM e SASTRY, 1974; COHEN e KOPECKO, 1976).

AZEVEDO e ROPER (1970) e AZEVEDO (1971), isolaram e caracterizaram geneticamente o variante $V_{5.2}$ (Figura 2). Observaram dois determinantes de deterioração, o v_5 localizado no grupo de ligação VIII e $v_{5.2}$ no grupo de ligação V. O determinante de $v_{5.2}$ só se expressa fenotipicamente na presença de v_5 . Na ausência de v_5 , o fenótipo de $v_{5.2}$ é próximo

ao normal.

Devido à escassez de setores deteriorados aqui obtidos, não foi possível determinar com segurança a localização do determinante $v_{5.2}$, muito embora as análises dos 3 setores deteriorados obtidos (Tabela 11) fossem condizentes com os dados obtidos nos trabalhos anteriores (AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971), sugerindo que o determinante de deterioração $v_{5.2}$ localiza-se no grupo de ligação V.

Dois tipos de segregantes morfológicos, foram observados quando se cruzou este variante com a linhagem MSE, os quais foram classificados como deteriorados compactos e deteriorados não compactos (Figura 3) (Tabela 12). Esses dados sugerem realmente a existência de dois determinantes de deterioração, e a existência de epistasia entre eles. O determinante $v_{5.2}$ só tem efeito fenotípico na presença de v_5 (AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971).

A segregação do fenótipo deteriorado poderia ser explicado da seguinte forma:

MSE (+ +) X $v_5 v_{5.2}$ ($v_{5.2}$)

++// $v_5 v_{5.2}$

SEGREGANTES:

+ +	}	fenótipo normal
+ $v_{5.2}$		
+ v_5		fenótipo deteriorado
$v_5 v_{5.2}$		fenótipo deteriorado compacto

Para se comprovar a existência desses dois determinantes de deterioração torna-se necessário novos cruzamentos entre os deteriorados compactos e os normais, e entre a classe (+ $v_{5.2}$) com a classe (v_5+).

A análise mitótica dos variantes deteriorados V_{67} e V_{68} (Tabelas 13 e 15) obtidos a partir da linhagem A, parece indicar que os determinantes de deterioração desses dois variantes estão associados em um rearranjo cromossômico (translocação), envolvendo os grupos de ligação V - VI e III - VI, respectivamente. Esses dados reforçam a hipótese de que o fenótipo deteriorado se origina por novas transposições do segmento em duplicata, e que outras possíveis transposições também possa ocorrer, como é o caso desses dois variantes.

O variante V_{68} provavelmente perdeu parte do segmento em duplicata localizado no grupo de ligação I, uma vez que esse variante é auxo

trófico para adE_{20} e biA_1 .

A Figura 15 (observada para o variante V_{25}) poderia ser usada para explicar a segregação meiótica do variante V_{67} .

Quanto ao variante V_{68} , não foi possível analisá-lo meioticamente. Apesar de haver formação de cleistotécios de tamanho reduzido, não se detectou ascósporos no interior dos corpos de frutificação. Essa não produção de ascósporos, pode ser explicada pelo pareamento meiótico esquematizado na Figura 16 (proposto para V_{25}). O rompimento das pontes anafásicas levaria à formação de produtos com deficiência, os quais seriam inviáveis. Além da translocação III - VI, este variante manteve a translocação $I \rightarrow II$, o que aumenta o padrão de inviabilidade.

5.3. Análise de ascos e ascósporos

Alguns variantes aqui estudados apresentaram segregações meióticas que desviaram da usual de 1 normal: 1 deteriorado.

Em fungos, vários fatores são conhecidos que levam à distorções na segregação. Podem ser citados os mutantes meióticos em *Neurospora*, que afetam o pareamento e a disjunção cromossômica (SMITH, 1975; DE LANGE e GRIFFITHS, 1980), tendo como consequência aborto de ascósporos; os esporos Killer, também em *Neurospora*, primeiramente reconhecidos pelo padrão de aborto de ascósporos (PERKINS e BARRY, 1977); genes citoplasmáticos também produzem desvios na segregação. Os primeiros mutantes citoplasmáticos

cos de *Neurospora* foram analisados por MITCHELL e MITCHELL (1952). Outro fator responsável pelo desvio na segregação, são os rearranjos cromossômicos. Em *Neurospora* as aberrações cromossômicas foram inicialmente detectadas através de observações de ascósporos defectivos produzidos em um cruzamento heterozigoto para um rearranjo cromossômico, situação comparável ao aborto de pólen em plantas (BELLING, 1914, citado em PERKINS e BARRY, 1977), cerca de 90 a 95% de ascósporos resultantes de cruzamentos homozigotos normais são viáveis, enquanto que em cruzamentos heterozigoto para translocações recíprocas, 50% dos ascósporos são defectivos e inviáveis. Translocações insercionais e outros tipos de aberrações, produzem cerca de 25% de ascósporos inviáveis.

Em *Neurospora*, o estudo das aberrações cromossômicas é facilitado através da análise de tétrades ordenadas ou não, e mesmo através de observação visual dos ascósporos inviáveis, pois estes permanecem não pigmentados. Cada tipo de rearranjo pode ser reconhecido através do pareamento meiótico em heterozigotos estruturais, ou pela formação de pontes na anáfase e também pela presença de fragmentos acêntricos. Essa identificação citológica é muito semelhante àquela feita em milho.

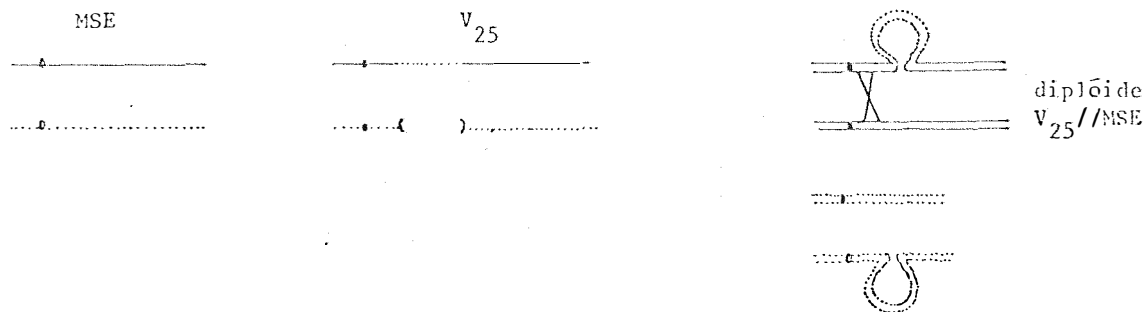
Já em *A. nidulans*, as análises citológicas de aberrações cromossômicas são dificultadas pelo pequeno tamanho dos cromossomos (ELLIOTT, 1960) muito embora, BOOTHROYD (1978) tenha usado técnicas citológicas básicas em microscópio de luz, a fim de se estudar algumas aberrações cromossômicas e correlacionar cromossomos com grupos de ligação, entretanto a espécie não é um bom material para análises citológicas deta-

lhadas, pelo menos pela técnica empregada.

ELLIOTT (1960) encontrou muitos ascósporos abortivos e ascos com número de ascósporos menor que 8 em linhagem que provavelmente era portadora de aberração cromossômica.

Esporos abortivos foram observados nos variantes portadores de translocação (V_{67} e V_{25}), como mostra a Tabela 17 e as Figuras 6A e 6B.

A segregação meiótica do fenótipo deteriorado do variante V_{25} está em torno de 6:1 (Tabela 9), e pelas análises citológicas observa-se um certo número de ascósporos abortivos e ascos com número de ascósporo inferior à oito. Isso pode ser explicado pela presença das aberrações cromossômicas numéricas e estruturais (PERKINS, 1975; PERKINS e BARRY, 1977). As origens meióticas desses tipos de ascos estão representadas nas Figuras 15 e 16, supondo ser uma translocação insercional ou insercional invertida respectivamente. Como este variante apresenta dois rearranjos (translocação e dissomia), as várias combinações entre eles, teriam como consequência, a produção de um número bem maior de ascosporos abortivos.



Produtos meióticos

a) s/permuta

b) c/permuta

translocado
viável

deficiente
(inviável)

duplicado
viável

normal

deficiente
(inviável)

translocado
(viável)

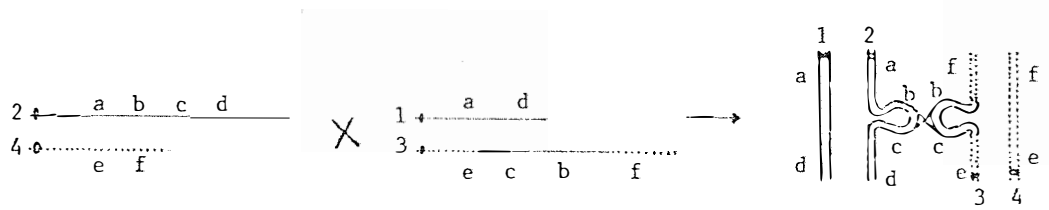
normal

duplicado
(viável)

Proporção: 6 viáveis:2 inviáveis

Proporção: 6 viáveis:2 inviáveis

Figura 15 - Origem e constituição de ascas contendo esporos deficientes, provenientes de cruzamento entre linhagem portadora de translocação insercional (centrômeros escuros) com linhagem normal (centrômeros claros), tendo ocorrido (b) ou não (a) permuta única.



Produtos meióticos:

Centrômeros 1 e 3 para um polo.
Centrômeros 2 e 4 para outro polo.

Centrômeros 1 e 4 para um polo.
Centrômeros 2 e 3 para outro polo.

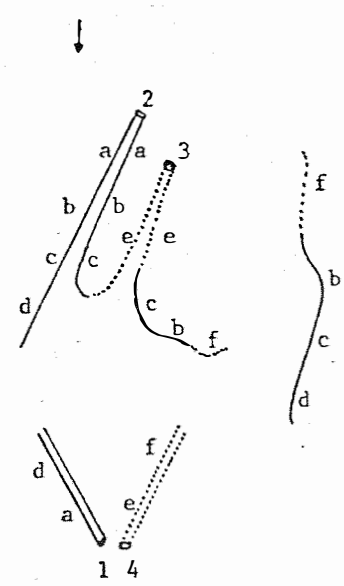
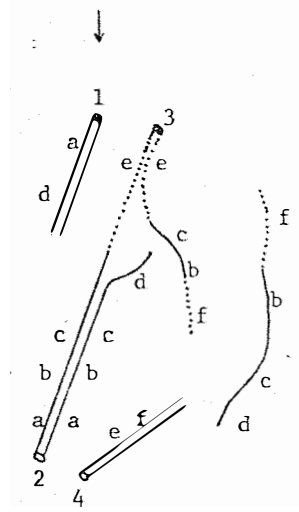
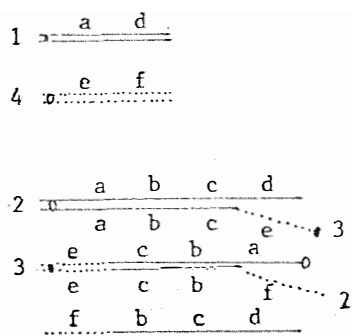
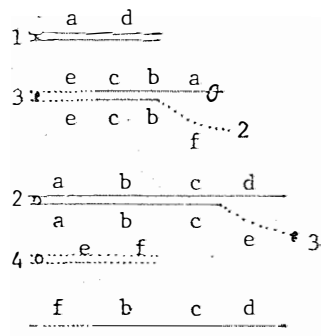


Figura 16 - Pareamento meiótico de uma translocação insercional invertida com seu cromossomo homólogo normal, ocorrendo permuta nas alças e posterior segregação. Há formação de pontes anafásicas e produção de segmentos acêntricos. Essas pontes se rompem, levando à produção de muitos esporos inviáveis ou abortivos.

O variante V_{67} apresentou uma segregação fenotípica de 3:1 (normais: deteriorados) (Tabela 15). A Figura 15 (definida para o variante V_{25}) poderia também ser usada para explicar o padrão de aborto de esporos.

Nenhum ascósporo abortivo ou asco com um número menor que oito foi observado no variante $V_{5.2}$ (Figura 8).

As linhagens A, ppy e o variante deteriorado V_5 (AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971) foram usadas como controle e em nenhum caso foram observados esporos abortivos (Tabela 17) (Figuras 9A e 9B) indicando que os esporos abortivos são resultantes de cruzamentos heterozigotos para translocação (PERKINS, 1974 e PERKINS e BARRY, 1977) e não devido à presença de determinantes de deterioração. Os esporos abortivos são então os responsáveis pelo desvio na segregação.

Quanto ao diâmetro dos ascos, a análise de variância (Tabela 18) mostrou que não há diferença significativa entre os grupos considerados. O estudo de regressão apresentou uma tendência linear significativa à 1% de probabilidade (Tabela 18) representada pela equação de regressão esquematizada na Figura 5.

5.4. Núcleos e conídios

As médias obtidas para os conídios dos variantes deteriorados (Tabela 19) foram em geral inferiores à linhagem com duplicação A, com exceção do variante V_{32} *gal nic fac* que apresentou diâmetro maior. Valo-

res para diâmetros de núcleos para variantes deteriorados foram menores que os da linhagem A, ou iguais para o caso do variante $V_{32 gal nic fa}$. A análise estatística mostrou que as médias dos conídios de variantes deteriorados foram significativamente diferentes daquelas da linhagem A, da linhagem ppy e da linhagem MSE, com exceção do variante V_5 . Quanto ao diâmetro de núcleos, as médias dos variantes deteriorados foram significativamente diferentes da linhagem A, com exceção do variante $V_{32 gal nic fa}$. Com relação às linhagens MSE e ppy, alguns variantes deteriorados, tiveram diferenças não significativas com relação às essas duas linhagens (Tabela 21).

Dados obtidos por outros autores confirmam esses dados (PAES de BARROS, 1977; GABRIELLI, 1978; NIFFENEGGER e SOUZA, 1979). Apesar do tamanho reduzido dos cromossomos desta espécie (ELLIOTT, 1960), as alterações cromossômicas como duplicações podem ser detectadas citologicamente, através do tamanho do núcleo.

Em dissômicos de *A. nidulans* os núcleos são maiores que aqueles da linhagem haplóide e aqueles de linhagem com duplicação cromossômica (PIZZIRANI, 1977; GABRIELLI, 1978). No que diz respeito ao número de núcleos nos conídios, apenas o variante $V_{32 gal nic fa}$, apresentou conídios uni-bi e trinucleados (Figura 11). PAES de BARROS (1977) atribuiu a ocorrência de conídios binucleados ao desequilíbrio cromossômico ou à existência de um outro fator além da duplicação. PIZZIRANI (1981) relacionou a presença de binucleados à gene simples, na linhagem MSE. NIFFENEGGER e SOUZA (1979) correlacionou a presença de conídios binucleados à anomalias estruturais na conidiação, quando estudava uma série de variantes deteriorados. A presença de duplicação agiria de forma indireta no número de nú-

cleos.

Quanto ao variante V_{32} gal níc fac, o número de núcleos conídios encontrados poderia ser explicado pela presença de genes com segregação mendeliana simples, que condicionam a formação de mais de um núcleo no conídio, pois este variante é um segregante meiótico do cruzamento entre o variante V_{32} (AZEVEDO, 1971) com a linhagem MSE_{bin} , descrita por PIZZIRANI-KLEINER (1981). Provavelmente este segregante herdou o gene $binA_1$ da linhagem parental. Duplicação associada ao gene $binA_1$, aumenta a porcentagem de conídios com mais de um núcleo (PIZZIRANI-KLEINER, 1981); uma proporção ainda maior pode ser observado no variante V_{32} gal níc fac.

ELLIOTT (1960), observou que os ascósporos de *A. nidulans* eram binucleados. Com base nos dados aqui obtidos, poder-se-ia dizer que ascósporos no interior dos ascos são uninucleados (Figura 10) e binucleados em estágios mais adiantados de maturação, ou seja, pós-liberação do asco.

Mesmo quando a linhagem é binucleada, os ascósporos no interior do asco são uninucleados, como é o caso da MSE_{bin} .

5.5. Efeito de diferentes agentes na haploidização

Os estudos genéticos com *Aspergillus nidulans* tiveram desenvolvimento maior quando ROPER (1952) e PONTECORVO *et alii* (1953; 1954) descobriram a recombinação mitótica nesta espécie. PONTECORVO *et alii* (1954), deram o nome de ciclo parassexual ao conjunto de processos que envolvia a

heterocariose, a diploidia, a recombinação mitótica e a haploidização. A haploidização ocorre por não disjunções cromossômicas sucessivas (KÄFER, 1961) e vários agentes são conhecidos, os quais induzem haploidização (MORPURGO, 1961; HASTIE, 1970; KAPPAS *et alii*, 1973; 1974; KAPPAS e GEORGOPOULOS, 1974; 1975; AZEVEDO e PACHECO SANTANA, 1975; AZEVEDO *et alii*, 1977).

O fungicida Benlate (HASTIE, 1970) aumenta a frequência de segregantes haplóides, apresentando um comportamento semelhante à *p*-fluorofenilalanina (MORPURGO, 1961). Benzimidazole e tiofanato (KAPPAS *et alii*, 1973; 1974) aumentam a instabilidade em diplóides de *A. nidulans*, assim como Botran, PCNB, SOPP (KAPPAS e GEORGOPOULOS, 1975) e Cloroneb (KAPPAS e GEORGOPOULOS, 1975; AZEVEDO e PACHECO SANTANA, 1975; AZEVEDO *et alii*, 1977), através de não disjunções mitóticas.

Pelos resultados das haploidizações, aqui obtidas com Cloroneb, Benlate e *p*FA, observa-se que o Cloroneb não é um bom agente haploidizante em linhagens portadoras de rearranjos cromossômicos. Além deste fungicida selecionar algumas marcas como *galA₁* e *ribB₂*, ele também provoca um aumento na proporção de permuta mitótica, e que dificulta a localização dos rearranjos e também de genes nos diferentes grupos de ligação (Tabelas 7 e 10). Pelos dados apresentados na Tabela 2, observa-se que diplóides originados do cruzamento entre a linhagem MSE e variantes deteriorados são mais sensíveis a este fungicida, quando comparados com os diplóides livres de deterioração. Provavelmente exista alguma relação entre sensibilidade ao Benlate e presença do determinante de deterioração. Por outro lado o *p*FA embora produzindo excelentes resultados é de difícil obtenção no País e de custo alto. O Benlate, na impossibilidade do uso de *p*FA deve ser então recomendado para estudos genéticos em *A. nidulans* envolvendo haploidização.

6. CONCLUSÕES

Pelos resultados aqui obtidos pode-se concluir que:

- a) Os núcleos de conídios provenientes da linhagem A e de variantes deteriorados apresentam alterações nos seus diâmetros devido à presença da duplicação e perda do segmento em duplicata respectivamente, quando comparados com os núcleos de linhagens haplóides normais.
- b) Os determinantes de deterioração localizaram-se em grupos de ligação outros que os grupos I e II, onde originalmente estava envolvida a duplicação, e em apenas um caso observou-se a presença de dois determinantes de deterioração. Transposições originando aberrações cromosômicas estruturais e numéricas foram observadas geneticamente.
- c) Pela comparação com dados obtidos anteriormente, obser

va-se que a estocagem e repicagem das linhagens por um período relativamente longo, leva a alterações estruturais no genoma. atribuídas à alta instabilidade do sistema e provavelmente à presença de elementos genéticos transponíveis.

- d) Ascósporos no interior dos ascos são uninucleados, e em estágios posteriores apresentam-se binucleados, indicando que a última divisão nuclear ocorre pós-estágio de asco, mesmo quando a linhagem é portadora de conídios binucleados.
- e) A presença de aberrações cromossômicas em cruzamentos heterozigotos, tem como consequência a produção de ascos com um número de ascósporos inferior à 8 ou ascos contendo vários ou todos os ascósporos defectivos.
- f) O cloroneb não é um bom agente haploidizante em diplóides heterozigotos para aberrações cromossômicas. Este fungicida além de aumentar a frequência de permuta mitótica, possui a capacidade de selecionar algumas marcas, dificultando dessa forma as análises mitóticas. Benlate e pFA são recomendados para esses casos.

7. BIBLIOGRAFIA

- APIRION, D., 1962. A general system for automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice versa in microorganisms. *Nature*, 195:959-961.
- ALMEIDA-OKINO, L.M. e J.L. AZEVEDO, 1981. Obtenção de linhagens com duplicação cromossômica em *A. nidulans* e sua instabilidade. *Energia Nuclear e Agricultura*, III:3-18.
- AVERSWALD, E.A., G. LUDWIG e H. SCHALLER, 1980. Structural analysis of Tn5. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, XLV, 107:113.
- AZEVEDO, J.L., 1971. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. England, University of Sheffield. 240p. (Ph.D. Thesis).
- AZEVEDO, J.L., 1975. Altered instability due to genetic changes in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 26:55-61.

- AZEVEDO, J.L. e E.P. SANTANA, 1975. The use of cloroneb to obtain haploid segregants from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 13:6.
- 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., A. OLIVEIRA e A.J. ROCHA CAMPOS, 1976. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. *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.
- BAINBRIDGE, B.W., 1970. Genetic analysis of an unequal chromosomal translocation in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 15:317-326.
- 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., 1967. Chromosome instability related to gene suppression in *A. nidulans*. *General Research*, 10:173-183.
- BALL, C. e J.L. AZEVEDO, 1976. Genetic instability in parasexual fungi. In: 2nd *International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms*. New York, Academic Press, 243-251.

- BALL, C. e J.A. ROPER, 1966. Studies on the inhibition and mutation of *Aspergillus nidulans* by acridines. *Genetical Research*, 7:207-221.
- BARACHO, I.R., J.L. AZEVEDO e R. VENCOVSKY, 1970. Correlation between size and hybrid and selfed state of cleistothecia in *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, 54:109-116.
- BARNETT, W.E. e F.J. DE SERRES, 1963. Fixed genetic instability in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 48:717-723.
- BARRY, E.G., 1967. Chromosome aberrations in *Neurospora* and the correlation of chromosomes and linkage groups. *Genetics*, 55:21-22.
- BARRY, E.G. e D.D. PERKINS, 1969. Position of linkage group V markers in chromosome 2 of *Neurospora crassa*. *Journal of Heredity*, 60:120-125.
- BECKWITH, J. e E. SIGNER, 1966. Transposition of the *lac* region of *E. coli*. I- Inversion of the *lac* operon and transduction of *lac* by ϕ 80. *Journal of Molecular Biology*, 19:254-265.
- BECKWITH, J., E. SIGNER e W. EPSTEIN, 1966. Transposition of the *lac* region of *E. coli*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, XXI:393-401.
- BERG, D.E., C. EGNER, B.J. HIRSCHL, J. HOWARD, L. JOHNSRUD, R.A. JORGENSEN e T.D. TLSTY, 1980. Insertion, excision and inversion of Tn5. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, XLV, 115:123.

- 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, R. JR., e J.L. AZEVEDO, 1977. Effects of ethidium bromide in diploid and duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Experientia*, 33:311-312.
- BOND, D.J., 1979. The genetics of a probable insertional translocation in *Sordaria brevicollis*. *Genetics*, 92:75-82.
- BOOTHROYD, E.R., 1978. A light-microscopic study of some translocations in *Aspergillus nidulans*. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*, XX:325-328.
- BURNHAM, C.R., 1932. An interchange in maize giving low sterility and chain configuration. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 18:434-440.
- BURNHAM, C.R., 1962. *Discussions in Cytogenetics*. Burges Publishing Company. 375p.
- BURR, K.W., H.M. PALMER e J.A. ROPER, 1971. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the effect of reduced DNA repair. *Heredity*, 27:487.

- CAMERON, J., E. LOH e R. DAVIS, 1979. Evidence of transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell*, 16:739-741.
- CAMPBELL, A.M., 1962. Episomes. *Advances in Genetics*, 11:101-145.
- CASE, B.L. e J.A. ROPER, 1975. Genetic imbalance and mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 13:8-11.
- CASE, B.L. e J.A. ROPER, 1978. Conidiospore size in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 14:20-24.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1970. A variegated position effect in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 16:306-316.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1974. *Aspergillus nidulans*. In: King, R.C. (ed.). *Handbook of Genetics*. I. New York, Plenum Press, p.446-510.
- COHEN, S.N., 1976. Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature*, 263:731-738.
- COHEN, S.N. e D.J. KOPECKO, 1976. Structural evolution of bacterial plasmids role of translocating genetic elements and DNA sequence insertions. *Federation Proceedings*, 35:2031-2036.
- COOKE, P., J.A. ROPER e W. WATMOUGH, 1970. Trypan blue induced deletions in duplications strain of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 266:276-277.

- CORNELIS, G. e H. SAEDLER, 1980. Deletions and an inversion induced by a resident IS_1 of the lactose transposon Tn 951. *Molecular General Genetics*, 178:367-374.
- DAWSON, G.W.P. e P.F. SMITH-KEARY, 1963. Episomic control of mutation in *Salmonella typhimurium*. *Heredity*, 18:1-20.
- DECARIS, B., F. FRANCOU, A. KOUASSI, C. LEFORT e G. RIZET, 1980. Genetic instability in *Ascobolus immersus* modalities of back-mutations, intragenic mapping of unstable sites, and unstable insertion. Preliminary Biochemical Data. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, XLV:509-517.
- De LANGE, A.M. e A.J.F. GRIFFITHS, 1980. Meiosis in *Neurospora crassa*. I- The isolation of recessive mutants defective in the production of viable ascospores. *Genetics*, 96:367-378.
- DEMEREK, M., 1941. Unstable genes in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 9:145-167.
- 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.

- EMERSON, R.A., 1917. Genetical studies of variegated pericarp in maize. *Genetics*, 2:1-3.
- ESSER, K. e R. KUENEN, 1967. *Genetics of Fungi*. Springer-Verlag. New York. Inc. 500p.
- FINCHAM, J.R.S. e G.R.K. SASTRY, 1974. Controlling elements in maize. *Annual Review of Genetics*, 8:15-20.
- FINK, G., P. FARABAUGH, G. ROEDER e D. CHALEFF, 1980. Transposable elements (*Ty*) in yeast. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, XLV:575-580.
- GABRIELLI, A.C., 1978. Estudos citogenéticos em uma linhagem deteriorada (V_8) de *Aspergillus nidulans* e seus derivados. Piracicaba, ESALQ/USP, 101p. (Dissertação de Mestrado).
- GABRIELLI, A.C. e J.L. AZEVEDO, 1980. A strain of *Aspergillus nidulans* producing a high frequency of disomics. *Transactions of the British Mycobiology Society*, 75:15-20.
- GREEL, R.F., 1959. Non-random assortment of non-homologous chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 44:421-435.
- GREEN, M.M., 1967. The genetics of a mutable gene at the white locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 56:467-482.

- GREEN, M.M., 1969. Controlling elements mediated transposition of the white gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 61:429-441.
- GREEN, M.M., 1973. Some observations and comments on mutable and mutator genes in *Drosophila*. *Genetics*, 73(s):187-194.
- GREER, H. e G. FINK, 1979. Unstable transpositions of *his 4* in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 76:4006-4010.
- GRINDLEY, N.D.F. e C.M. JOYCE, 1980. Analysis of the structure and function of the Kanamycin-resistance Transposon *Tn 903*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, XLV:125-133.
- HASTIE, A.C., 1970. Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, 226:771.
- HAWTHORNE, D.C., 1963. A deletion in yeast and its bearing on the structure of the mating locus. *Genetics*, 48:1727-1729.
- HESLOT, H., 1958. Contribution à l'étude cytogènétique et gènétique des sordariacées. *Rev. Cytol. Biol. Vegetales*, 19 (supp), 2:1-209.
- HOUGHTON, J.A. e J. O'DOWD, 1979. The effect of ultrasound on genetic instability in diploids of *A. nidulans*. *Folia Microbiologica*, 24:385-388.

- HOZUMI, N.S. e S. TONEGAWA, 1976. Evidence for somatic rearrangement of immuno-globulin genes coding for variable and constant regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 73:3628-3632.
- IIDA, S. e W. ARBER, 1980. On the role of IS₁ in the formation of hybrids between the bacteriophage P₁ and the R plasmid NR₁. *Molecular General Genetics*, 177:261-270.
- IIDA, S., J. MEYER, e W. ARBER, 1980. Genesis and natural history of IS mediated transposons. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, XLV:27-43.
- IPPEN, K., J. SHAPIRO e J. BECKWITH, 1971. Transposition of *lac* region to the *gal* region of the *E. coli* chromosome: isolation of λ *lac* transducing bacteriophages. *Journal of Bacteriology*, 108:5-9.
- ISING, G. e K. BLACK, 1980. Derivation-dependent distribution of insertion sites for a *Drosophila* transposon. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, XLV:527-544.
- KÄFER, E., 1958. An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 9:105-145.
- KÄFER, E., 1961. The process of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46:1581-1609.

- KÄFER, E., 1965. Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*.
Genetics, 52:217-232.
- KÄFER, E. e A. UPSHALL, 1973. The eight disomic and trisomic phenotypes
of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Heredity*, 64:35-38.
- KAPPAS, A. e S.G. GEORGOPOULOS, 1974. Interference of griseofulvin with
the segregation of chromosome at mitosis in diploid *Aspergillus
nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 119:334-335.
- KAPPAS, A. e S.G. GEORGOPOULOS, 1975. Fungicides causing mitotic
segregation in *Aspergillus* diploids. *Mutation Research*, 29:236.
- KAPPAS, A., S.G. GEORGOPOULOS e A.C. HASTIE, 1973. Genetic instability
of *Aspergillus nidulans* diploids induced by benzimidazole and
thiophanate fungicides. *Mutation Research*, 21:190-191.
- KAPPAS, A., S.G. GEORGOPOULOS e A.C. HASTIE, 1974. On the genetic
activity of benzimidazole and thiophanate fungicides on diploids of
Aspergillus nidulans. *Mutation Research*, 26:17-27.
- KLAR, A.J.S., J.B. HICKS e J.N. STRATHERN, 1980. Irregular transposition
of mating-type genes in yeast. *Cold Spring Harbor Symposia
Quantitative Biology*, XLV:983-990.

- KLECKNER, N., K. REICHARDT e D. BODSTEIN, 1979. Inversions and deletions of the *Salmonella* chromosome generated by the translocable tetracycline-resistance element Tn_{10} . *Journal of Molecular Biology*, 127:89-115.
- LATEN, H.M., J. GORMAN, E. WEBB e R.M. BOCK, 1976. Genetic analysis of a transposable supressor genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73:4623-4627.
- LEE, Y.T. e B.H. NGA, 1973. Meiotic segregation behavior of translocation haploids in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 74(s):153-154.
- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with *p*-fluorophenylalanine. *Nature*, 190:744.
- LIEBER, M.M., 1976. The effects of temperature on genetic instability in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 34:93-122.
- LIM, J.K., 1980. Site specific intrachromosomal rearrangements in *Drosophila melanogaster*: Cytogenetic evidence for transposable elements. *Cold Spring Harbor Symposia of the Quantitative Biology*, XLV:553-560.
- MAJERFELD, I.H. e J.A. ROPER, 1978a. The effect of coumarin on the frequency of deletions in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 159:203-206.

- MAJERFELD, I.H. e J.A. ROPER, 1978b. Dose effects of the *uvs*⁺ gene product in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 49:19-26.
- McCLINTOCK, B., 1945. *Neurospora*. I- Preliminary observations of the chromosomes of *Neurospora crassa*. *American Journal of Botany*, 32:671-678.
- McCLINTOCK, B., 1951. Chromosome organization and genic 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*, 8:58-72.
- McCLINTOCK, B., 1956. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, XXI:197-216.
- McCLINTOCK, B., 1965. The control of gene action in maize. In: Genetic control of differentiation. *Brookhaven Symposia Biology*, 18:162-184.
- McCULLY, K.S. e E. FORBES, 1965. The use of *p*-fluorphenilalanine 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. 114p. (Dissertação de Mestrado).
- METZENBERG, R.L., M.K. GLEASON e B.S. LITTLEWOOD, 1974. Genetic control of alkaline phosphatase in *Neurospora*: The use of partial diploids in dominance studies. *Genetics*, 77:25-43.
- MITCHELL, M.B. e H.K. MITCHELL, 1952. A case of "maternal" inheritance in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 38:442-449.
- MORPURGO, H.J., 1961. Somatic segregation induced by *p*-fluorophenylalanine. *Aspergillus News Letter*, 2:10.
- MYLYK, O.M., 1975. Heterocaryon incompatibility genes in *Neurospora crassa* detected using duplication-producing chromosome rearrangements. *Genetics*, 80:107-124.
- NEVERS, P. e H. SAEDLER, 1977. Transposable genetic elements as agents of gene instability and chromosomal rearrangements. *Nature*, 268:109-115.
- NEWMAYER, D., 1965. Somatic instability in *Neurospora* resulting from a pericentric inversion. *Genetics*, 52(s):462-463.

- NEWMEYER, D. e C.W. TAYLOR, 1967. A pericentric inversion in *Neurospora* with unstable duplication progeny. *Genetics*, 26:771-791.
- NEWMEYER, D. e D.R. GALEAZZI, 1977. The instability of *Neurospora* duplication Dp (IL - IR) H4250, and its genetic control. *Genetics*, 85:461-488.
- NEWMEYER, D. e D.R. GALEAZZI, 1978. A meiotic U.V. - sensitive mutant with causes deletion of duplications in *Neurospora*. *Genetics*, 89:245-269.
- NGA, B.H., 1968. Production and analysis of new translocation in *A. nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 9:16-17.
- 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*, 53:103-209.
- 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. 244p. (Dissertação de Mestrado).

- PAES DE BARROS, J., 1977. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP. 81p. (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 eukariotic microorganisms. *Molecular General Genetics*, 140:275-287.
- PERKINS, D.D., 1972. An insertional translocation in *Neurospora* that generates duplications heterozigous for mating type. *Genetics*, 71:25-51.
- PERKINS, D.D., 1974. The manifestation of chromosome rearrangements in unordered asci of *Neurospora*. *Genetics*, 77:459-489.
- PERKINS, D.D., 1975. The use of duplication generating rearrangements for studying heterocaryon incompatibility genes in *Neurospora*. *Genetics*, 80:87-105.
- PERKINS, D.D., 1979. *Neurospora* as an object for cytogenetic research. *Stadler Symposia*, 11:145-164.
- PERKINS, D.D. e G.E. BARRY, 1977. The cytogenetics of *Neurospora*. *Advances in Genetics*, 19:133-285.

- PERKINS, D.D., N.B. RAJU e E.G. BARRY, 1980. A chromosome rearrangement in *Neurospora* that produces viable progeny containing two nucleolus organizers. *Chromosoma*, 76:255-275.
- PERKINS, D.D., D. NEWMAYER, C.W. TAYLOR e D.C. BENETT, 1969. New markers and map sequences in *Neurospora crassa*, with a description of mapping by duplication coverage, and of multiple translocation stocks for testing linkage. *Genética*, 40:247-278.
- PETERSON, P.A., 1953. A mutable *pale green* locus in maize. *Genetics*, 38:682-683.
- PETERSON, P.A., 1960. A *pale green* mutable system in maize. *Genetics*, 45:115-133.
- PETERSON, P.A., 1968. The origin of an unstable locus in *maize*. *Genetics*, 59:391-398.
- PETERSON, P.A., 1970a. Controlling elements and mutable loci in *maize*. Their relationship to bacterial episomes. *Genetics*, 41:33-56.
- PETERSON, P.A., 1970b. The *En* mutable system in *maize*. III. Transpositions associated with mutational events. *Theoretical and Applied Genetics*, 40:367-377.
- PETERSON, P.A., 1976. Change in state following transposition of a regulatory element of the enhancer system in *maize*. *Genetics*, 81:469-483.

- PIZZIRANI, A.A., 1977. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP. 111p. (Dissertação de Mestrado).
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A., 1981. Efeito do gene *binA1* na formação de conídios de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP. 141p. (Tese de Doutorado).
- POLLARD, D.R., E. KÄFER e M.T. JOHNSTON, 1968. Influence of chromosomal aberrations on meiotic and mitotic non-disjunction in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 60:743-757.
- PONTECORVO, G. e J.A. ROPER, 1953. Diploids and mitotic recombination. *Advances in Genetics*, 5:218-233.
- PONTECORVO, G. e E. KÄFER, 1958. Genetic analysis based on mitotic recombination. *Advances in Genetics*, 9:71-104.
- PONTECORVO, G., E. TARR-GLOOR e E. FORBES, 1954. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Genetics*, 52:226-237.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, D.W. HERMMONS, K.D. McDONALD e A.W. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.

- PRITCHARD, R.H., 1955. The linear arrangement of a series of alleles of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 9:343-371.
- REIF, H.J. e H. SAEDLER, 1975. IS₁ is involved in deletion formation in the *gal* region of *E. coli* K 12. *Molecular General Genetics*, 137:17-28.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8:14-15.
- ROPER, J.A., 1966. The parasexual cycle. In: Ainsworth, G.C. e Sussman, A.S., ed. *The fungi*, II. New York, Academic Press, p.589-617.
- ROBINOW, C.F. e C.E. CATEN, 1969. Mitosis in *A. nidulans*. *Journal of Cell Science*, 5:403-431.
- 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.
- ROPER, J.A., H.M. PALMER e W.A. WATMOUGH, 1972. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the effects of caffeine. *Molecular General Genetics*, 118:125-133.
- ROSATO, Y.B. e J.L. AZEVEDO, 1978. Acriflavine and ethyl methanosulfonate induced mutants of *Aspergillus nidulans* strain with chromosoma duplication. *Revista Brasileira de Genética*, 1(4):247-262.

- ROTHSTEIN, S.J., R.A. JORGENSEN, J.C.P. YIN, Z. YONG-DI, R.C. JOHNSON e W.S. REZNIKOFF, 1980. *Cold Spring Harbor Symposia of the Quantitative Biology*, XLV:99-105.
- SAEDLER, H. e P. STARLINGER, 1967. O^c mutations in the galactose operon of *E. coli*. I- Genetic characterization. *Molecular General Genetics*, 100:178-189.
- SAEDLER, H., G. CORNELIS, J. CULLUM, B. SCHUMACHER e H. SOMMER, 1980. IS₁ - mediated DNA rearrangements. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, XLV:93-98.
- SASTRY, G.R.K., K.M. ASLAM e V. JEFFRIES, 1980. The role of controlling elements in the instability of flower color in *Antirrhinum majus* and *Impatiens balsamina*. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, XLV:477-486.
- SHERMAN, F. e C. HELMS, 1978. A chromosomal translocation causing overproduction of *iso-2-citocromo-c* in yeast. *Genetics*, 88:689-707.
- SMITH, D.A., 1975. A mutant affecting meiosis in *Neurospora*. *Genetics*, 80:125-133.
- SNEDECOR, G.W. e W.G. COCHRAN, 1972. *Statistical Methods*, 6a. ed., Ames. The Iowa State University Press. 593p.

- SO, M. F. HEFRON e B.J. McCARTHY, 1979. The *E. coli* gene encoding heat stable toxin is a bacterial transposon flanked by inverted repeats of IS₁. *Nature*, 277:453-456.
- SOKAL, R.R. e R.J. ROHLF, 1969. Biometry. *The principles and practice of statistics in biological research*. W.H. Freeman and Company. San Francisco. 776p.
- STRICKLAND, W.N., 1958. Abnormal tetrads in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the Royal Society*. London, 148:533-542.
- SWANSON, C.P.; T. MERZ; W.J. YOUNG, 1969. *Citogenética*. ed. Polígono S/A. EDUSP. 255p.
- TURNER, B.C., 1975. Duplications in *Neurospora* produced meiotically by a translocation T (I - VI) NM 103, and their breakdown to produce euploid derivatives. *Genetics*, 80, s81 (abstr.).
- TURNER, B.C., 1977. Euploid derivatives of duplications from a translocation in *Neurospora*. *Genetics*, 85:439-460.
- TURNER, B.C., C.W. TAYLOR, D.D. PERKINS e D. NEWMAYER, 1969. New duplication-generating inversions in *Neurospora*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 11:622-638.

- UPSHALL, A., 1966. Somatically unstable mutants of *Aspergillus nidulans*.
Nature, 209:1113-1115.
- UPSHALL, A., 1971. Phenotypic specificity of aneuploid states in
Aspergillus nidulans. *Genetical Research*, 18:167-171.
- UPSHALL, A., 1974. Genetic factors affecting non disjunction in *Aspergillus*
nidulans. *Heredity*, 33:445.
- UPSHALL, A. e E. KÄFER, 1974. Detection and identification of
translocations by increased specific non disjunction in *Aspergillus*.
Genetics, 76:19-31.
- VAN de VATE, C. e G.J.O. JANSEN, 1978. Meiotic recombination in a
duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*,
31:29-52.
- 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.
- ZUCCHI, T.M.A.D., 1975. Instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*
(Eidam) Winter. Ribeirão Preto, S.P. Faculdade de Medicina. 96p.
(Tese de Doutorado).