

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DADOS CITOLÓGICOS EM
Aspergillus niger van Tieghem E *Aspergillus awamori* Nakazawa

MARIA HELENA PELEGRINELLI FUNGARO

Orientadora: Profa. Dra. ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1984

.i.

Ao irmão e amigo,

Luiz Antonio P. Fungaro

com carinho

Aos meus pais,

Tereza e Durval

e a minha irmã,

Maria Angélica

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Externamos nossa admiração e agradecimento às seguintes pessoas e instituições:

- Prof.^a *Aline A. Pizzirani-Kleiner.*
- Prof. *João Lúcio de Azevedo, Prof. Flávio C.A. Tavares, Prof. Natal Antonio Vello.*
- Prof. *Cyro Grossi, Prof. Moacyr Medri.*
- Aos Professores, *Leda M.K. Sodré de Lima, Olívia N. Arantes, Eleonora Marchesi, Tadeu Elisbão.*
- *Maria José Valarini, Isaias Olívio Geraldi.*
- *Luzia D. Paccola, Genovefa Peisino, Dayse Figueiredo, Itamar S. Mello, Sérgio E. Laguna.*
- *Lygia Vitória Galli, Ana Paula Ayres Bordin.*
- *Antonio da Rocha Campos, Luiz Próspero, Paulo Ortolan Filho, Cleusval Bissi.*
- Aos Professores do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo.
- Colegas do Curso de Pós-Graduação de Genética e Melhoramento de Plantas.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA).

Í N D I C E

	<u>Página</u>
RESUMO.	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO.	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Considerações gerais sobre <i>Aspergillus niger</i> van Tieghem e <i>Aspergillus awamori</i> Nakazawa..	3
2.2. Isolamento de mutantes auxotróficos.	4
2.3. Ciclo parassexual e sua importância.	9
2.4. Aspectos sobre produção de enzimas amilolíf- ticas por fungos.	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.	24
3.1. Linhagens utilizadas.	24
3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas	24
3.2.1. Meio Mínimo (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953).	24
3.2.2. Meio Completo (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953, modificado).	25
3.2.3. Meio Mínimo Líquido (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953).	25
3.2.4. Meio Completo Líquido (PONTECORVO <i>et</i> <i>alii</i> , 1953, modificado).	25
3.2.5. MM KCl para reversão e obtenção de pro- dutos de fusão.	25
3.2.6. MC KCl para obtenção de crescimento de hifas, protoplastos e conídios	26

	<u>Página</u>
3.2.7. Meio Mínimo mais 2% de Meio Completo	26
3.2.8. Meio Mínimo Líquido para crescimento de micélio.	26
3.2.9. Meio Mínimo de amido.	26
3.2.10. Solução de vitaminas.	27
3.2.11. Solução de ácido nucléico de levedu- ras.	27
3.2.12. Solução de caseína hidrolizada. . . .	27
3.2.13. Suplementos adicionados ao Meio Míni- mo.	28
3.2.14. Solução salina.	28
3.2.15. Solução de Tween-80 (0,1%).	28
3.2.16. Solução de albumina 5%.	29
3.2.17. Solução Helly.	29
3.2.18. Solução Giemsa.	29
3.2.19. Formol neutro	29
3.2.20. Solução tampão fosfato pH 6,9	30
3.2.21. Tampão Tris-Citrato pH 8,6.	30
3.2.22. Tampão Borato pH 8,1.	30
3.2.23. Tampão Fosfato 0,2 M pH 5,8	31
3.2.24. Solução de KCl 1,2 M pH 5,8	31
3.2.25. Solução KCl 0,6 M pH 5,8.	31
3.2.26. Solução PEG 30%.	32
3.2.27. Solução de enzimas para produção de protoplastos (HAMLYN <i>et alii</i> , 1981)..	32
3.2.28. Solução de Benlate.	32
3.2.29. Gel de Acrilamida.	33
3.2.30. Solução de Persulfato de Amônia (AP) . .	33

	<u>Página</u>
3.2.31. Solução para revelação de Esterases..	33
3.2.32. Solução de Lugol.	33
3.3. Sistema de Filtro para Técnica de Enriqueci <u>me</u> mento.	33
3.4. Uso de Palitos para Transferência de Colônias	34
3.5. Esterilização e Incubação.	34
3.6. Coloração de Conídios.	34
3.6.1. Determinação do número de Núcleos por Conídio.	35
3.6.2. Medida do tamanho dos Conídios	35
3.6.3. Medida do tamanho de Núcleos.	35
3.7. Determinação dos Padrões Eletroforéticos em Linhagens de <i>A. awamori</i> e <i>A. niger</i> por Ele <u>tro</u> forese em Gel de Acrilamida.	36
3.7.1. Preparação das Amostras.	36
3.7.2. Placa de Gel de Acrilamida.	36
3.7.3. Aplicação das Amostras e Corrida da Eletroforese.	37
3.7.4. Revelação das Esterases.	37
3.8. Sobrevivência à Mutagênicos.	37
3.8.1. Sobrevivência à Luz Ultravioleta.	37
3.8.2. Sobrevivência à Radiação Gama	38
3.9. Determinação da Heterocariose na Linhagem de <i>A. awamori</i> ATCC 22342 e <i>A. niger</i> ATCC 22343.	39

3.9.1. Detecção da Auxotrofia nas Linhagens <i>A. awamori</i> ATCC 22342 e <i>A. niger</i> ATCC 22343.	39
3.9.2. Isolamento de colônias de <i>A. niger</i> ATCC 22343 e <i>A. awamori</i> 22342 (pro/arg) ⁻ ..	40
3.9.3. Evidenciação do Bloqueio Metabólico da Via Biossintética dos Aminoácidos <u>Pro</u> lina e Arginina nos Isolados (pro/arg) ⁻ das Linhagens ATCC 22342 e ATCC 22343.	
3.10. Obtenção de Mutantes Auxotróficos e Morfológicos.	41
3.10.1. Mutantes Auxotróficos e Morfológicos obtidos com Irradiação Gama.	41
3.10.2. Mutantes Auxotróficos e Morfológicos obtidos com Irradiação Ultravioleta..	42
3.10.3. Enriquecimento de Mutantes Auxotróficos da Linhagem de <i>A. awamori</i> Linhagem ATCC 22342 Selecionado (pro/arg) ⁻	43
3.11. Teste da Produção de Enzimas Amilolíticas em Placa.	44
3.12. Testes de Repressão Catabólica de Enzimas Amilolíticas pela Glicose.	44
3.13. Curva Dose/Resposta ao Benlate	45
3.14. Teste de Reversão.	45
3.15. Análise Genética	46
3.15.1. Obtenção de Heterocários	46

	<u>Página</u>
3.15.2. Obtenção de Diplóides.	46
3.15.3. Metodologia utilizada para Comprova- ção da Diploidia.	47
3.15.3.1. Número de Colônias origi- nadas em MC e MM	47
3.15.3.2. Número de Setores origina- dos em MC e MC + pFA	47
3.15.3.3. Número de Núcleos por Coní- dios dos Diplóides obtidos.	47
3.16. Produção de Protoplastos.	48
3.17. Fusão de Protoplastos (PEBERDY, 1979).	49
3.18. Verificação da presença de Hifas, Esferoplas- tos e Conídios na suspensão de Protoplastos.	49
3.19. Teste de Reversão dos Protoplastos.	50
3.20. Análise estatística.	50
4. RESULTADOS.	52
4.1. Diâmetros de conídios, núcleos e porcenta- gens de conídios uni, bi, tri e tetranucleados	52
4.2. Sobrevivência a mutagênicos físicos.	53
4.2.1. Sobrevivência à radiação gama	53
4.2.2. Sobrevivência à luz ultravioleta.	58
4.3. Relação da média do número de núcleos por co- nídio e percentagem de sobrevivência.	61
4.4. Heterocariose na linhagem de <i>A. awamori</i> ATCC 22342 e <i>A. niger</i> ATCC 22343.	62

	<u>Página</u>
4.4.1. Auxotrofia nas linhagens de <i>A. awamori</i> ATCC 22342 e <i>A. niger</i> ATCC 22343..	62
4.4.2. Evidenciação do bloqueio metabólico da via biossintética dos aminoácidos pro <u>l</u> ina e arginina nos isolados (pro/arg) ⁻ das linhagens ATCC 22342 a ATCC 22343..	63
4.5. Obtenção de mutantes.	67
4.5.1. Obtenção de mutantes de <i>A. awamori</i> , li <u>n</u> hagem ATCC 22342.	67
4.5.2. Obtenção de mutantes auxotróficos e mor <u>f</u> olôicos da linhagem de <i>A. niger</i> ATCC 10864.	68
4.5.3. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos de <i>A. niger</i> linhagem ATCC 22343.	73
4.6. Teste de reversão.	73
4.7. Produção de enzimas amilolíticas em placas..	77
4.8. Teste de repressão catabólica das enzimas amilolíticas pela glicose.	78
4.9. Curva dose resposta ao Benlate.	82
4.10. Padrão eletroforético de esterases das lin <u>h</u> agens ATCC 22342, ATCC 10864, ATCC 11382 e ATCC 22343.	84
4.11. Cruzamentos genéticos pela metodologia clá <u>s</u> sica.	85
4.11.1. Obtenção de heterocários.	85

	<u>Página</u>
4.11.2. Isolamento dos possíveis diplóides.	86
4.12. Fusão de protoplastos.	89
4.13. Teste da produção de enzimas amilolíticas em placas para os diplóides obtidos	93
5. DISCUSSÃO.	94
5.1. Aspectos citológicos e indução de mutação.	94
5.2. Heterocariose nas linhagens de <i>A. awamori</i> ATCC 22342 e <i>A. niger</i> ATCC 22343.	98
5.3. Obtenção de mutantes.	103
5.4. Produção de enzimas amilolíticas e outras ca racterísticas das linhagens.	105
5.5. Obtenção de diplóides.	109
5.6. Fusão de protoplastos.	114
6. CONCLUSÕES.	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	120

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DADOS CITOLÓGICOS EM *Aspergillus niger* van Tieghem E *Aspergillus awamori* Nakazawa

Autor: *Maria Helena Pelegrinelli Fungaro*

Orientadora: Prof.^a Dra. *Aline A. Pizzirani-Kleiner*

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com a finalidade de estudar linhagens amilolíticas de *A. awamori* (ATCC 22342 e ATCC 11382) e de *A. niger* (ATCC 22343 e ATCC 10864) considerando a caracterização genética e aspectos citológicos.

Na análise citológica dos conídios foi verificado que as linhagens ATCC 22342 e ATCC 22343 produzem conídios uni, bi, tri e tetranucleados e, as linhagens ATCC 10864 e ATCC 11382, conídios uni e binucleados. Entre as linhagens ocorreu variação nas frequências dos diferentes tipos de conídios formados. Nos diplóides isolados, houve redução nas frequências de conídios com mais de um núcleo em relação às linhagens que lhe originaram.

Foi observado que as linhagens ATCC 22342 e ATCC 22343 estavam em condições heterocariótica, para prolina ou arginina; também foi identificado o local do bloqueio metabólico da síntese desses aminoácidos, através do cresci-

mento das colônias em meios diferenciais. Das linhagens originalmente heterocarióticas, foi possível isolar colônias prototróficas, auxotróficas e colônias proto/auxotróficas para prolina ou arginina.

As quatro linhagens foram avaliadas quanto à produção de enzimas amilolíticas através do índice do halo de degradação do amido. As linhagens apresentaram variação de produção, destacando-se a linhagem ATCC 22342 como a mais promissora. Os diplóides se mostraram superiores em relação aos mutantes que lhes originaram, principalmente o diplóide interespecífico. Os testes em meios contendo quantidades crescentes de glicose indicaram que, possivelmente, as enzimas não são reprimidas catabolicamente pela glicose. Em relação a análise eletroforética para esterases, ficou evidenciado que as linhagens apresentam diferenças quanto ao padrão de bandas, fato também comprovado para sensibilidade ao benlate.

Mutantes auxotróficos e morfológicos foram obtidos pelo método de isolamento total, e em *A. awamori* pelo método de enriquecimento por filtração, conseguindo-se um aumento de 41 vezes em relação ao método anterior.

Pelas técnicas clássicas foram obtidos diplóides entre mutantes da mesma linhagem e de espécies diferentes. A diploidia foi confirmada pelo crescimento idêntico em meio mínimo e meio completo (MC), pela produção de setores

em MC e MC + pfa e, pelo número de núcleos presentes nos conídios. Na fusão de protoplastos de *A. awamori* e *A. niger* foi possível isolar produtos de fusão porém em baixa frequência.

GENETIC CHARACTERIZATION AND CITOLOGIC DATA IN *Aspergillus niger* van TIEGHEM AND *Aspergillus awamori* Nakazawa

Author: *Maria Helena Pelegrinelli Fungaro*

Adviser: Prof.^a *Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner*

SUMMARY

The present research was carried out with the aim of studying amylolytic strains of *A. awamori* (ATCC 22342 and ATCC 11382) and of *A. niger* (ATCC 22343 and ATCC 10864) considering the genetic characterization and cytological aspects.

In cytological analysis of the conidia was verified that the ATCC 22342 and ATCC 22343 strains produced conidia with one, two, three and four nuclei, and the ATCC 10864 and ATCC 11382 strains produced conidia with one and two nuclei. Among the strains occurred variation in the frequencies of different types of conidia.

It was observed that the ATCC 22342 and ATCC 22343 strains were in heterokaryotic condition, for proline or arginine, and it was also identified the site of metabolic

blockade of the synthesis of these aminoacids through the growth of the colonies in differentiated media. It was possible to isolate prototrophic colonies, auxotrophic colonies for proline or arginina and, proto/auxotrophic colonies from the heterokaryotic strains.

The four strains were evaluated for production of amylolytic enzymes through the halo index of the starch degradation. These strains presented variation in production; the ATCC 22342 stood out as the most promising. The diploids, mainly the interespecific one, were superior to the original mutants. The trials in media containing crescent amounts of glucose indicated that, the enzymes, possibly, are not repressed by glucose. In relation to eletrophoretic analysis for esterases, it was showed that strains presented differences for the bands standard; this event was confirmed by the sensitivity to benlate.

Auxotrophic and morfologic were obtained by the method of total isolation and, by the technique of filtration enrichment in *A. awamori* was obtained an increase of 41 times of auxotrophic mutants. By using classic techniques were obtained diploids among mutants of the same strain, and among strains of different species. The diploidy was confirmed by identical, growth in minimal and complete média (CM), by production sectors in the conidia. In protoplasts fusion of *A. awamori* with *A. niger*, was possible to isolate fusion products, but in low frequency.

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento genético de fungos de interesse industrial conta com a existência de variabilidade natural ou com a possibilidade de aumentar esta variabilidade pela indução de mutações ou através de métodos recombinacionais. Dentro deste contexto, o estudo da mutação e dos mutagênicos, representam uma grande contribuição fornecida pela genética de microrganismos, haja visto o grande emprego da técnica mutação-seleção no melhoramento de fungos economicamente importantes.

Sendo a maioria das espécies de fungos industriais desprovidas de ciclo sexual, a possibilidade de aumentar a variabilidade visando o seu melhoramento via métodos recombinacionais, fica restringida ao ciclo parassexual. Em *A. niger* este ciclo foi descrito por PONTECORVO *et alii* (1953a), entretanto em *A. awamori* tal fenômeno ainda não foi constatado. Estas duas espécies são de reconhecido valor industrial na produção de enzimas amilolíticas, especialmente na pro-

dução de amiloglicosidase, e a ocorrência de parassexualidade em *A. awamori*, seria interessante na obtenção de recombinantes com qualidades desejáveis, além de estudos de ordem genética nesta espécie.

O fenômeno parassexual entre os fungos tem recentemente recebido nova dimensão com o desenvolvimento do isolamento, cultura e fusão de protoplastos (PEBERDY, 1979). Primeiramente porque esta nova metodologia permite a formação relativamente fácil de heterocários, se mostrando portanto muito valiosa em fungos onde a anastomose de hifas é dificultada. Em segundo lugar porque através da fusão interespecífica de protoplastos, a interação de genomas de espécies diferentes, abriu uma nova área dentro da genética de fungos e da biologia molecular.

Considerando estes fatos, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar linhagens de *A. awamori* e *A. niger* no que diz respeito a obtenção de mutantes, estudar alguns aspectos citológicos e obtenção de diplóides intra e interlinhagens e também interespecíficos, quando possível pela metodologia parassexual e quando não, através da fusão de protoplastos. Por último, a avaliação da produção de enzimas amilolíticas nos diplóides e haplóides que os constituíram.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Considerações gerais sobre *Aspergillus niger* van Tieghem e *Aspergillus awamori* Nakazawa

Os fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus awamori* enquadram-se no grupo niger (RAPER e FENNELL, 1965). As espécies de *Aspergillus* deste grupo são provavelmente mais comuns do que qualquer outro grupo dentro do gênero. Elas apresentam uma ampla distribuição geográfica e ocorrem numa grande variedade de substratos, sendo abundantes nos solos principalmente em solos de regiões tropicais e subtropicais. São fungos que se destacam pelo valor econômico, sendo largamente usados em indústrias.

Tanto o *Aspergillus awamori* Nakazawa como o *Aspergillus niger* van Tieghem apresentam esterígmias biseriados, mas o *Aspergillus niger* apresenta colônias com conídios globosos com aspecto rugoso com equinulações e coloração negra a olho nu, medindo em torno de 4 a 5 μ de diâmetro, enquan-

to que o *Aspergillus awamori* apresenta colônias com conídios marrons avermelhados, conidióforos medindo de 1 a 1,5 mm de comprimento e conídios variando de 4,0 a 4,5 μ em diâmetro.

Devido à não existência ou evidenciação do ciclo sexual o *Aspergillus niger* e, também o *Aspergillus awamori* são classificados como Deuteromíctos, sendo a análise genética em *A. niger* efetuada através do ciclo parassexual. (PONTECORVO *et alii*, 1953a); entretanto para o *Aspergillus awamori* ainda não foi evidenciado o ciclo parassexual.

2.2. Isolamento de mutantes auxotróficos

Apesar da mutação ser o principal fator que fornece explicações para a enorme variabilidade e diversidade existentes entre os fungos, esta ocorre espontaneamente com baixa frequência. Desta forma, na maioria dos programas para isolamento de mutantes que então serão usados para estudos genéticos ou mesmo para outros fins, incluem-se processos para aumentar a frequência de mutação, fazendo-se uso do tratamento de células com agentes mutagênicos, físicos ou químicos.

Grande parte do desenvolvimento da genética de fungos tem sido baseada no uso de mutantes bioquímicos, primeiramente estudados em *Neurospora* por BEADLE e TATUM (1945). O tipo de mutante bioquímico que tem sido mais estudado é o

auxotrófico, que é incapaz de crescer em meio mínimo; contudo é capaz de crescer se uma ou mais substâncias específicas são adicionadas ao meio.

Mutantes podem ser conseguidos com maior ou menor facilidade dependendo das características do fungo a ser usado. Fungos com abundante produção de esporos preferivelmente uninucleados, com ciclo vital relativamente rápido, crescendo em meios de cultura de composição definida, são favoráveis para estudos genéticos. Também em fungos que não possuem estas características favoráveis podem-se obter mutantes, embora com maior dificuldade.

O procedimento tradicional porém menos eficiente para isolamento de mutantes auxotróficos é tomar uma grande amostra de células de uma população tratada com um mutagênico e avaliá-las individualmente para sua habilidade de crescimento em meio mínimo.

Em fungos com conídios predominantemente multinucleados, muitos núcleos mutantes não serão detectados devido a presença de um ou mais núcleos não mutantes no mesmo conídio, permitindo crescimento normal e dificultando dessa maneira o isolamento de colônias mutantes. Entretanto, em *Neurospora* alguns autores têm adotado o uso de linhagens que produzem somente microconídios uninucleados (LINDEGREN e LINDEGREN, 1941; TATUM *et alii*, 1950).

Após isolados os mutantes auxotróficos o seu requerimento para crescimento pode facilmente ser identificado pela técnica de auxonografia (PONTECORVO, 1949).

REAUME e TATUM (1949), utilizaram pela primeira vez o método "*Rescue*" com finalidade de obter mutantes auxotróficos de leveduras. O método consiste em semear células haplóides em diluições apropriadas em meio mínimo e incubá-las por vários dias. Assim que sobreviventes prototróficos crescerem e formarem colônias, a posição destas deverão ser marcadas. A seguir, meio completo é colocado sobre o meio mínimo e, após solidificado, as placas são incubadas novamente. As colônias que crescerem posteriormente à adição de meio completo são prováveis mutantes auxotróficos. Uma segunda alternativa, utilizada com sucesso por LEIN *et alii* (1948) em *Neurospora* e por BOONE *et alii* (1956) em *Venturia inaequalis* é a identificação de não crescimento ou esporos retardados por examinação microscópica e transferência para meio enriquecido, esperando-se que parte deles cresçam agora normalmente.

O método de enriquecimento por filtração foi primeiramente utilizado em *Ophiostoma multiannulatum* por FRIES (1947), que consiste em inocular conídios submetidos a tratamento mutagênico em meio mínimo líquido e, remover as células prototróficas crescidas por repetidas filtrações através de algum tipo de filtro estéril no qual as hifas dos espo

ros germinados, são retidas. Após filtração, grande parte dos conídios capazes de crescerem em meio mínimo são removidos e os restantes são semeados em placas contendo meio completo.

A eficiência do método de enriquecimento por filtração depende de vários fatores sendo o principal o tempo de incubação no meio mínimo líquido antes da filtração. Este é importante porque os conídios auxotróficos podem iniciar a germinação pela liberação de substâncias das células prototróficas em crescimento e serem portanto retidos no filtro ou mesmo formarem heterocários prototróficos. O método de enriquecimento por filtração foi utilizado com sucesso em *Neurospora* (WOODWARD *et alii*, 1954; CATCHESIDE, 1954), *Coprinus lagopus* (DAY e ANDERSON, 1961), *Schizophyllum commune* (ANDERSON e DEPPE, 1977), *Metarhizium anisopliae* (SILVEIRA, 1983).

MOAT *et alii* (1959), demonstraram em *Saccharomyces* que é possível utilizar substâncias que matam somente células em crescimento, sendo que anfoterecina B, endomicina e nistatina foram as mais eficientes. Quando populações de células de leveduras contendo pequena proporção de mutantes auxotróficos foram inoculados em meio mínimo mais antibiótico e, após um período de incubação o antibiótico foi removido por centrifugação e células foram semeadas em meio suplementado livre de antibiótico, a proporção de auxotróficos entre as células sobreviventes foi cerca de cinquenta vezes maior que a

população original. Encontram-se ainda na literatura outros relatos que fazem uso de antibiótico e outros antimetabólitos com eficiência para obtenção de mutantes auxotróficos em leveduras (COOK, 1974; MEGNET, 1965; SNOW, 1966; YOUNG *et alii*, 1976; MELO CRUZ, 1977).

Posteriormente, foi demonstrado em *Aspergillus nidulans* que os antibióticos polieno e N-glicosil polifungin matam células em germinação, mas não matam conídios que não estejam germinando (BAL *et alii*, 1975). Este método pode também ser usado para seleção de mutantes auxotróficos.

Ainda um outro método para isolamento de mutantes auxotróficos que foi utilizado para *Saccharomyces* (LITTLEWOOD e DAVIS, 1973), *Neurospora* (RUSSELL e COHEN, 1976) e *A. flavus* (DONKERSLOOT e MATELES, 1968) depende da incorporação pela célula, do tipo selvagem em meio mínimo, de ácido ribonucleico ou precursores de proteína marcados com trítium (^3H). Durante subsequente incubação a célula do tipo selvagem tende a ser morta pela radioatividade que ela incorpora, enquanto que os mutantes auxotróficos que não forem ativos na síntese macromolecular durante o período de exposição ao precursor tritiado, tendem a sobreviver. Este método também tem sido eficiente no enriquecimento de mutantes auxotróficos.

SPICZKIC e FERENCZY (1978), demonstraram a técnica

ca enzimática de enriquecimento de mutantes auxotróficos e termos sensíveis de *Schizosaccharomyces pombe*. O método é baseado na observação de que a parede celular jovem é mais sensível a enzima lítica que a parede celular velha. A enzima produzida por *Trichoderma viride* pode lisar a parede celular, e é mais ativa para células em crescimento do que para culturas estacionárias. No experimento acima a taxa de enriquecimento de mutantes auxotróficos encontrada foi de 79,7 vezes. O princípio do método e resultados preliminares são apresentados por FERENCZY *et alii* (1975).

2.3. Ciclo parassexual e sua importância

Encontram-se na literatura vários relatos sobre variabilidade em fungos e, nestes, salientam-se que além da mutação como fonte de variabilidade, também a heterocariose, a recombinação sexual, a parassexualidade e determinantes citoplasmáticos fornecem amplas explicações para a grande variabilidade e diversidade existentes entre os fungos (AZEVEDO, 1972, BRADLEY, 1962, TINLINE e MCNEILL, 1969, AZEVEDO, 1976).

Em fungos, além do processo sexual que é uma característica observada em Ficomictos, Ascomictos e Basidiomictos, existe uma alternativa de sexo, ou seja o ciclo parassexual, descrito pela primeira vez em *Aspergillus nidu-*

lans (PONTECORVO e ROPER, 1952). Este ciclo parassexual, consiste na alternativa de recombinação nos fungos classificados como Deuteromicetos, também conhecidos como fungos imperfeitos, que assim são denominados pelo fato de não possuírem ou não terem ainda descrito o seu ciclo sexual. Desta forma, percebe-se a grande importância do ciclo parassexual como fonte de recombinação em fungos imperfeitos.

A descoberta do ciclo parassexual em *Aspergillus nidulans* teve como suporte o trabalho de ROPER (1952) que utilizando mutantes morfológicos e nutricionais obteve combinação desses marcadores em uma linhagem diplóide de *Aspergillus nidulans*. Tais colônias diplóides originaram-se da fusão de núcleos haplóides nos heterocários, estes decorrentes da anastomose de hifas. Estes núcleos diplóides multiplicam-se por divisões mitóticas sendo eventualmente incluído nos conídios. Neste mesmo fungo, *Aspergillus nidulans*, foi verificado que os diplóides poderiam permanecer neste estado permanentemente ou produzir diplóides homozigotos para um ou vários marcadores, diplóides estes, que teriam sido originados por permuta mitótica, similar ao crossing-over meiótico, mas não seguido de redução (PONTECORVO e ROPER, 1952).

Para a demonstração do ciclo parassexual em fungos, as seguintes etapas devem ser consideradas: (a) produção de linhagens com marcas nutricionais e/ou morfológicas a par

tir do isolado selvagem, (b) formação de heterocários balanceados pela fusão de hifas contendo núcleos diferentes, (c) detecção, isolamento e purificação do diplóide heterozigoto e, por último (d) recuperação de segregantes recombinantes haplóides e diplóides para análise de acordo com sua morfologia e seus requerimentos nutricionais.

Após obtenção e caracterização dos mutantes auxotróficos e morfológicos deve-se proceder a formação de heterocários entre mutantes complementares para requisitos nutricionais; sendo a heteriocariose resultado de anastomose de hifas adjacentes e migração de um núcleo de uma hifa para outra (ROPER, 1952). Entretanto, a mais freqüente fonte de heteriocariose é aquela derivada por mutação em um ou mais núcleo dentro do micélio homocariótico (ISHITANI e SAKAGUCHI, 1956, TINLINE, 1962, CUNHA, 1970).

A fusão de hifas e a habilidade de formar heterocário são determinadas pela constituição genética das linhagens parentais e também influenciadas por condições ambientais. Sendo a anastomose de hifas e heterocariose processos que antecedem a formação de diplóides, encontram-se na literatura trabalhos que tratam de suas particularidades (CLUTTERBUCK e ROPER, 1966; CATEN e JINKS, 1966; TINLINE e MCNEILL, 1969).

A partir do heterocário pode-se obter a fusão

de núcleos que então darão origem ao diplóide heterozigoto (ROPER, 1952). Estes, por divisões mitóticas produzirão novos núcleos diplóides, que por sua vez podem sofrer permuta mitótica resultando recombinantes que se diferenciam do diplóide original. Assim como certos agentes apresentam a propriedade de aumentar a frequência de formação de diplóides (PONTECORVO *et alii*, 1953b; DAY e JONES, 1968; IKEDA *et alii*, 1957, SHCHERBAKOVA e RESVAYA, 1978) a frequência de permuta mitótica também pode ser alterada com certos agentes químicos ou físicos (SHANFIELD e KAFER, 1971).

A identificação do fenótipo tipo selvagem é o primeiro indício para o reconhecimento de conídios diplóides obtidos do heterocário resultante do cruzamento de parentais haplóides com marcas auxotróficas e/ou morfológicas. Entretanto, devem-se eliminar as possibilidades de que este seja um revertente ou mesmo um aneuplóide, assim sendo, outros critérios, tais como: diâmetro de conídios, diâmetro de núcleos, morfologia e desenvolvimento de colônias, sensibilidade a mutagênicos, segregação de marcas parentais, e comparação do número de núcleos por conídios do diplóide com os haplóides, serão de grande valor para a confirmação do possível diplóide.

Através de não disjunção mitótica, o diplóide pode passar por várias fases de aneuploidia e originar haplóides que também se diferenciam dos haplóides que originaram o diplóide. A haploidização de diplóides de *Aspergillus niger*,

como uma consequência da adição do análogo de aminoácido, para-fluorfenilalanina, ocorre por sucessivas perdas cromossômicas, (LHOAS, 1961; MORPURGO, 1961; LHOAS, 1968) como encontrado por KAFER (1961) para *Aspergillus nidulans* no caso de haploidização espontânea. A partir desta descoberta o pFA (para-fluorfenilalanina) vem sendo utilizado para haploidização de diplóides de outros fungos tais como, *Penicillium chrysogenum* (BALL, 1971), *Humicola* sp (BERTOLDI e CATEN, 1975), *Ustilago violacea* (DAY e JONES, 1968) e outros. Além desta, outras substâncias foram avaliadas quanto à ação haploidizante e, resultado satisfatório foi encontrado para N-glicosil polifungina (BAL *et alii*, 1975), Griseofulvina (KAPPAS e GEORGOPOULOS, 1974), Benomyl (HASTIE, 1970), Chloroneb (KAPPAS e GEORGOPOULOS, 1975; PACHECO-SANTANA, 1974; AZEVEDO *et alii*, 1977), fungicidas benzimidazólicos e thiophanato (KAPPAS *et alii*, 1973), Botran, PCNB e SOPP (KAPPAS e GEORGOPOULOS, 1975).

Está bem evidenciada a importância do ciclo parassexual referente a estudos de ordem genética, bem como seu grande valor como fonte de recombinação em fungos de aplicação industrial que na maioria são deuteromicetos.

Este mecanismo alternativo de sexo permite o mapeamento de genes e centrômeros nos diferentes grupos de ligação. Deste modo, FORBES (1959), baseado na segregação mitô

tica localizou novas mutações de *Aspergillus nidulans* em seus devidos grupos de ligação. GROSSI (1980) através de análise mitótica confirmou resultados previamente obtidos por outros autores que, o locus para resistência ao cloroneb em *Aspergillus nidulans* está no grupo de ligação III. Através da análise mitótica, pode-se também estabelecer o número de grupos de ligação de uma espécie; desta forma estabeleceram-se seis grupos de ligação para *Aspergillus niger* (LHOAS, 1967), sete para *Aspergillus flavus* (PAPA, 1976) e quatro para *Humicola* (BERTOLDI e CATEN, 1975).

Como descrito por AZEVEDO (1972), o uso de diplóides ou heterocários obtidos pelo ciclo parassexual permite o estudo de dominância e recessividade de genes em um mesmo núcleo ou em núcleos diferentes, mas em um citoplasma comum, respectivamente. Estudos mais detalhados a respeito de permuta mitótica e haploidização podem ser feitos através do ciclo parassexual.

Os estudos relativos a 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 degenerações em linhagens industriais (BALL e AZEVEDO, 1976). No caso de fungos, o ciclo parassexual facilita os estudos do processo de instabilidade mitótica visto que, certos processos de instabilidade

de em *Aspergillus nidulans* são desencadeados pela presença de um segmento cromossômico em duplicata (BAINBRIDGE e ROPER 1966). Estes processos de instabilidade em linhagens com segmentos em duplicata podem ser devido a permutas mitóticas desiguais, produzindo deleções o que faria com que as colônias apresentassem setores mais vigorosos pela perda de segmento duplicado ou deteriorado por duplicações em tandem.

A ocorrência do ciclo parassexual foi verificada em vários gêneros de fungos. Além das trinta e seis espécies de fungos que tiveram seu ciclo parassexual descrito como relata a revisão de AZEVEDO (1976), outras espécies tais como, *Humicola* sp (BERTOLDI e CATEN, 1975), *Aspergillus* sp 321 (PEREIRA, 1978), *Acremonium chrysogenum* (BALL e HAMLIN, 1978), *Metarhizium anisopliae* (MESSIAS, 1979), tiveram o fenômeno parassexual descrito.

Sendo a anastomose de hifas requisito obrigatório para ocorrência do ciclo parassexual, este evento ocorre com facilidade entre variantes genéticos de uma linhagem. Entretanto, devido a fenômenos de incompatibilidade na parede celular dos fungos dificilmente ocorre anastomose de hifas de diferentes origens dentro da mesma espécie e mais dificilmente ainda entre espécies diferentes. As descobertas nos últimos anos envolvendo o isolamento, regeneração e a fusão de pro

toplastos em fungos têm apresentado nova dimensão ao fenômeno parassexual nos organismos que possuem ou não o ciclo sexual bem estabelecido, ou que apresentem barreira impedindo a troca gênica, recombinação e conseqüente variabilidade genética entre e dentre linhagens. Através das fusões interespecíficas e intergenéricas, a interação de genomas de duas espécies ou gêneros diferentes tem aberto um novo campo dentro da genética de fungos e da biologia molecular.

2.4. Aspectos sobre produção de enzimas amilolíticas por fungos

Recentemente novas enzimas degradadoras de amido têm sido detectadas em microorganismos, entretanto, as únicas enzimas amilolíticas derivadas de fungos filamentosos que têm significado industrial são a α -amilase e a amiloglicosidase.

Segundo FOGARTY e KELLY (1980) as enzimas amilolíticas de origem microbiana comercialmente importantes podem ser divididas em várias classes:

1) *Amilases de ação exo*

a) Amiloglicosidase. A amiloglicosidase é uma enzima de ação exo (age nas extremidades da cadeia) que produz β D-glicose pela hidrólise de ligação α 1,4 consecutivamente de finais de cadeias

não redutores de amilose, amilopectina, e glicogênio. Esta enzima também hidrolisa ligações α 1,6 e α 1,3.

b) β -amilase. Esta enzima degrada amilose, amilopectina e glicogênio de maneira "exo" de fins de cadeia não reduzidos, por hidrólise de ligações glicosídicas alternadas. Desta forma ela produz maltose como resultado da hidrólise de amilose e, maltose e uma dextrina limite como resultado da hidrólise de amilopectina e glicogênio.

c) Outras enzimas de ação "exo". Estas enzimas hidrolisam ligações α 1,4 mas não ligações α 1,6 e produzem como produto final outros que não a maltose quando atuam sob o substrato amido.

2) *Amilases de ação endo*

a) α Amilase. Esta enzima hidrolisa ligações α 1,4 na amilose, amilopectina e glicogênio, de maneira "endo" (age no interior da cadeia), mas as ligações glicosídicas α 1,6 em polímeros ramificados não são hidrolisadas.

3) *Enzimas desramificadoras*

Estas enzimas hidrolisam somente ligações α 1,6.

4) *Enzimas que produzem ciclodextrinas*

Estas enzimas hidrolisam amido resultando uma

série de polímeros D-glicosil cíclicos não reduzidos, chamados ciclo dextrinas.

A amiloglicosidase ocorre quase que exclusivamente em fungos, enquanto que a α amilase ocorre tanto em fungos como em bactérias. Os fungos não apresentam produção industrial relevante de β -amilase e enzimas desramificadoras, portanto estas não serão aqui consideradas.

A seleção de um organismo para produção de uma determinada enzima requer a consideração dos seguintes critérios: (1) extensiva seleção deve ser procedida para selecionar o organismo mais apto; (2) o organismo deve produzir a enzima com boa produtividade em tempo relativamente curto; (3) o organismo deve crescer e produzir a enzima em nutrientes não caros; (4) o organismo deve ser facilmente removido do líquido de fermentação; (5) a enzima deve preferencialmente ser produzida extracelularmente e facilmente removida do líquido de fermentação; (6) o organismo deve ser não patogênico e não relacionado filogeneticamente a um patógeno; (7) idealmente não deve produzir toxinas ou outros materiais biologicamente ativos; (8) o organismo deve ser geneticamente estável e não susceptível a bacteriófago.

Tanto em cultura submersa como em cultura de superfície o fungo *Aspergillus niger* produz consideravelmente

mais amiloglicosidase do que α -amilase, e o inverso é verdadeiro para *Aspergillus oryzae*. Consequentemente, *A. niger* é um dos organismos utilizados para produção comercial de amiloglicosidase e, a α -amilase fúngica é produzida comercialmente pelo *Aspergillus oryzae* (POOL e UNDERKOFER, 1953, Apud FOGARTY e KELLY, 1980). Entretanto, SMILEY *et alii*, 1964, demonstraram que o fungo filamentoso *Aspergillus awamori* NRRL 3112 produz três vezes mais amiloglicosidade que o *Aspergillus niger* NRRL 337, que até então vinha sendo utilizado industrialmente. Além disso, os autores também observaram que o *A. awamori* NRRL 3112 produz quantidades consideravelmente menores de transglicosidase, enzima esta indesejável por catalisar ligações sacarídicas α 1,6, isto é, a síntese de isomaltose e panose a partir de glicose e maltose, respectivamente. Desta forma, a presença de transglicosidade na preparação de amiloglicosidase limita o poder de sacarificação desta enzima.

Espécies do gênero *Rhizopus* não produzem transglicosidase, mas esta enzima é produzida por espécies do gênero *Aspergillus*. Sendo assim, esta deve ser removida ou inativada antes de tais preparações serem usadas na produção comercial de dextrose. Esta característica, produção de transglicosidase por espécies do gênero *Aspergillus* produtores industriais de amiloglicosidase constitui uma desvantagem deste gênero em comparação ao gênero *Rhizopus*. Entretanto, o gênero *Rhizopus* não pro-

duz satisfatoriamente amiloglicosidase em cultura submersa.

Vinte linhagens de fungos obtidas de vários laboratórios e dez linhagens de fungos isolados de amostras do solo, sendo que estas constituíam espécies e linhagens do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus*, foram examinadas para habilidade de produção de amiloglicosidase. Através deste estudo verificou-se que o *Aspergillus awamori* NRRL 3112 produz a maior quantidade da enzima referida (PARK e LIMA, 1972).

A genética de microrganismos, com seu grande progresso na elucidação de campos, tais como mutação-seleção e de processos de recombinação, forneceu e tem fornecido subsídios que puderam e podem ser positivamente explorados no melhoramento de microrganismos de interesse industrial. As espécies modelo da genética de fungos não possuem importância direta para a indústria de fermentação, mas seu estudo tem possibilitado oportunidades de aplicação com sucesso dos princípios e descobertas até agora encontrados. Neste sentido, o estudo da mutação e dos mutagênicos representam uma grande contribuição fornecida pela genética de microrganismos haja visto o grande emprego da técnica da mutação - seleção no melhoramento de fungos industrialmente importantes.

Mutação artificial de um organismo envolve tratamento de células ou suspensão de esporos com o agente mutagênico escolhido até que 95 a 99% de mortalidade seja encontra-

do. As células sobreviventes são cultivadas em meio apropriado para originar colônias. Isolados são subsequentemente selecionados para produção da enzima desejada. Aquelas que aumentaram a produção quando comparado com as células não tratadas são então reexaminadas para avaliar sua estabilidade.

Irradiação com luz ultravioleta foi utilizada com sucesso para obtenção de mutantes de *A. phoenicis* com produção de amiloglicosidase aumentada (BARIBO, 1967, *Apud* FOGARTY e KELLY, 1980). Resultado semelhante foi obtido em *A. foetidus*, sendo que neste último caso o nível de transglicosidase foi substancialmente menor (BODE, 1966, *Apud* FOGARTY e KELLY, 1980).

Linhagens mutantes de *A. niger* produtores de amiloglicosidase e livres de transglicosidase foram obtidas após tratamento com radiação ultravioleta e/ou tratamento com NTG (AUNSTRUP, 1977). Ainda com tratamento à luz ultravioleta e NTG, mutantes de *Rhizopus formascienses* produziram até 15 vezes mais amiloglicosidase que a linhagem parental (LIN, 1972, *Apud* FOGARTY e KELLY, 1980). Um mutante da linhagem *A. awamori* NRRL 3112 que produz 100% mais amiloglicosidase que a linhagem original foi obtido pelo tratamento com N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina. Posteriormente este mesmo mutante foi tratado com luz ultravioleta, sendo os sobreviventes avaliados quanto à produtividade enzimática e mudanças morfológicas. Um mutante (MNNG-UV mutante) que

teve diferentes características de crescimento em "Malte leve dura agar" da linhagem parental produziu igual quantidade de amiloglicosidase àquela produzida pelo mutante MNNG (PARK e SANTI, 1977). Mutantes com propriedades aumentadas de produção de amiloglicosidase foram isolados de *A. awamori* NRRL-3112 após tratamento mutagênico com NTG, dietil sulfato, NaNO_3 e irradiação gama. O melhoramento encontrado em três passos sequenciais de tratamento mutagênico e seleção foi de 2,5 vezes, sendo que nestes mutantes a produção de α -amilase também foi aumentada (NEVALAINEN e PALVA, 1979).

Embora com menor expressão a recombinação genética tem auxiliado o desenvolvimento de linhagens superiores. Lembrando-se que a maioria dos fungos industrialmente importantes são classificados como deuteromicetos, a combinação de caracteres vantajosos já existentes ou obtidos via mutação somente é permitido através do ciclo parassexual.

A aplicação da parassexualidade em linhagens industriais consiste não somente a possibilidade de melhoramento para aumentar a produção *per se* mas, também para outras características desejáveis que podem indiretamente ter efeitos favoráveis na produção da substância.

O melhoramento na produção de amiloglicosidase em linhagens de *A. niger* foi conseguido através do cruzamento parassexual de uma linhagem altamente produtora com uma outra

pouco produtora de amiloglicosidase. Desta forma, conseguiu-se recombinantes com eficientes caldo de filtração, característica esta da linhagem pouco produtora. Um dos recombinantes foi superior para a produção de amiloglicosidase do que a melhor linhagem parental previamente utilizada para este propósito (BALL *et alii*, 1978). Ainda em *A. niger*, diplóides foram obtidos pela técnica de ROPER (1952) e avaliados para a produção de amiloglicosidase; estes mostraram aumento significativo de até 42% na produção, o que possivelmente indica efeito da dosagem gênica na produção (VALENTE e BONATELLI JR., 1982).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens Utilizadas

As linhagens utilizadas foram obtidas na American Type Culture Collection, USA. As linhagens de *Aspergillus niger* foram ATCC 10864 (NRRL 330) e ATCC 22343 (NRRL 3122) e as linhagens de *Aspergillus awamori* foram ATCC 11382 (IFO 4398) e ATCC 22342 (NRRL 3112), catalogadas como produtoras de enzimas amilolíticas (Catalogue of Strains I, 1980).

3.2. Meios de Cultura e Soluções Utilizadas

3.2.1. Meio Mínimo (PONTECORVO *et alii*, 1953b)

NaNO ₃	6,00 g
KH ₂ PO ₄	1,50 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Glicose	10,00 g
Ágar.	15,00 g
Água destilada.	1.000 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

3.2.2. Meio Completo (PONTECORVO *et alii*, 1953b, modificado)

Adicionou-se ao meio mínimo:

Peptona	2,00 g
Caseína hidrolizada	1,5 g
Extrato de levedura	0,5 g
Solução de vitaminas	1,0 ml

pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%

3.2.3. Meio Mínimo Líquido (PONTECORVO *et alii*, 1953b)

Preparado segundo o ítem 3.2.1., não sendo adicionado o ágar.

3.2.4. Meio Completo Líquido (PONTECORVO *et alii*, 1953b, modificado)

Preparado segundo o ítem 3.2.2., não sendo adicionado o ágar.

3.2.5. MM KCl para reversão e obtenção de produtos de fusão

O meio foi preparado segundo o ítem 3.2.1., onde de cada componente foi colocado em quantidade dobrada, com exceção da água. No momento do uso, este foi diluído com KCl 1,2 M

em tampão fosfato pH 5,8, na proporção 1:1.

3.2.6. MC KCl para obtenção de crescimento de hifas, protoplastos e conídios

Preparado segundo o item 3.2.2., onde cada componente foi colocado em quantidade dobrada, exceto água. No momento do uso, este foi diluído com KCl 1,2 M em tampão fosfato pH 5,8, na proporção 1:1. ,

3.2.7. Meio Mínimo mais 2% de Meio Completo

Em tubos de ensaio, foram adicionados 3 ml de meio mínimo líquido mais 2% de meio completo líquido. Estes tubos foram autoclavados e conservados em refrigerador.

3.2.8. Meio Mínimo Líquido para crescimento de micélio

Ao meio mínimo preparado segundo o item 3.2.1. foi adicionado o aminoácido prolina na concentração de 50µg/ml.

3.2.9. Meio Mínimo de amido

O meio mínimo de amido foi preparado segundo o

item 3.2.1., substituindo-se a glicose por amido na mesma concentração usada no meio de PONTECORVO *et alii*, 1953b.

3.2.10. Solução de Vitaminas

Biotina, 0,2 mg; Ácido *p*-aminobenzóico, 10,0 mg; Tiamina, 50,0 mg; Piridoxina, 50,0 mg; Ácido nicotínico, 100,0 mg; Riboflavina, 100,0 mg; Água destilada esterilizada, 100 ml. A solução foi posteriormente esterilizada em banho-maria por 15 minutos e guardada no refrigerador a 4°C em frasco escuro, sob clorofórmio.

3.2.11. Solução de Ácido Nucléico de Leveduras

Ácido nucléico de leveduras, 2 g em 15 ml de solução 1 N de HCl. Ácido nucléico de leveduras, 2 g em 15 ml de solução 1N de NaOH. Ambas as soluções são aquecidas a 100°C por 20 minutos, misturadas e o pH é ajustado para 6,0 com NaOH 4%. Filtra-se e completa-se o volume para 40 ml sendo a seguir conservada no refrigerador à 4°C, sob clorofórmio.

3.2.12. Solução de Caseína Hidrolizada

Preparou-se a solução, dissolvendo-se 100 mg de caseína hidrolizada em 10 ml de H₂O destilada esteriliza-

da. Esta foi aquecida em banho-maria por 15 minutos e a seguir conservada em refrigerador a 4°C.

3.2.13. Suplementos Adicionados ao Meio Mínimo

Estoque de suplementos foram preparados, adicionando-se cada um deles em frascos escuros contendo 10 ml de água destilada esterilizada. Estes foram posteriormente aquecidos por 15 minutos e conservados em refrigerador a 4°C.

3.2.14. Solução Salina

Preparou-se uma solução de cloreto de sódio 0,85% (dissolve-se o sal em água destilada). A solução foi distribuída em frascos (9 ml por frasco) sendo a seguir autoclavada.

3.2.15. Solução de Tween-80 (0,1%)

Foi adicionado 0,1 ml de Tween-80 em 100 ml de água destilada com homogeneização. A solução foi distribuída em tubos de ensaio (2,5 ml), que foram a seguir autoclavados e mantidos à temperatura ambiente.

3.2.16. Solução de Albumina 5%

Preparou-se uma solução com 5,0 ml de clara de ovo em 100 ml de água destilada. Filtrou-se e conservou-se em frasco escuro a 4°C no refrigerador.

3.2.17. Solução Helly

Bicromato de potássio, 3 g; Cloreto de mercúrio, 5 g e Água destilada, 100 ml. Conservou-se a solução em frasco escuro à temperatura ambiente.

3.2.18. Solução Giemsa

Diluiu-se uma parte de Giemsa em 66 partes de glicerina a 60°C e após resfriamento, misturou-se com 66 partes de metanol. Esta solução foi mantida à temperatura ambiente.

3.2.19. Formol Neutro

O formol neutro foi preparado pela adição de uma parte de carbonato de cálcio em 3 partes de formalina. A solução foi agitada esporadicamente durante 10 dias.

3.2.20. Solução Tampão Fosfato pH 6,9

Solução A: NaH_2PO_4 , 27,8 g e água destilada, 1.000 ml.

Solução B: Na_2HPO_4 , 53,65 g e água destilada, 1.000 ml.

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

3.2.21. Tampão Tris-Citrato pH 8,6

Trizma-base 0,076 M, 9,2 g em 1.000 ml de água destilada e Ácido cítrico 0,005 M, 1,05 g em 1.000 ml de água destilada.

Quando básico, adicionou-se ácido cítrico até chegar pH 8,6, e quando ácido adicionou-se Tris Citrato até pH 8,6. Completou-se o volume com Balão.

3.2.22. Tampão Borato pH 8,1

Ácido bórico 0,3 M, 18,5 g/1.000 ml de água e NaOH 0,06 M, 2,4 g/1.000 ml de água. Corrigiu-se o pH com ácido bórico

até pH 8,1 ou com NaOH quando este estava ácido.

3.2.23. Tampão Fosfato 0,2 M pH 5,8

Solução A: NaH_2PO_4 , 27,6 e água destilada 1.000ml.

Solução B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 71,6 g e água destilada, 1.000 ml.

Adicionaram-se 920 ml de solução A em 80 ml de solução B. As soluções A e B foram conservadas no refrigerador e o tampão fosfato foi preparado no momento de uso.

3.2.24. Solução de KCl 1,2 M pH 5,8

Para o preparo desta solução, 84,47 g de KCl foram dissolvidos com agitação e aquecimento em 500 ml de solução A (tampão fosfato pH 5,8). Levou-se ao potenciômetro e adicionou-se solução B (tampão fosfato pH 5,8) até atingir-se pH 5,8. O volume final foi acertado para 1000 ml com tampão fosfato pH 5,8. Autoclavou-se e conservou-se em refrigerador.

3.2.25. Solução KCl 0,6 M pH 5,8

Esta solução foi preparada diluindo-se a solução KCl 1,2 M (ítem 3.2.24.) volume a volume em tampão fosfa-

to pH 5,8. Autoclavou-se e conservou-se em refrigerador.

3.2.26. Solução de Polietilenoglicol (PEG) 30%

Solução A: CaCl₂ , 11,0 g e água destilada, 1.000 ml.

Solução B: Glicina, 3,75 g e água destilada, 1.000 ml.

Foram adicionados 10,0 ml da solução A em 10,0 ml de solução B e o volume completado para 100 ml com água destilada. O pH foi corrigido para 8,0 com NaOH 4% e adicionado PEG 6.000 em concentração final de 30%.

3.2.27. Solução de Enzimas para Produção de Protoplastos (HAMLYN *et alii*, 1981)

Para cada 1,0 ml de KCl 0,6 M em tampão fosfato pH 5,8 foram adicionados 5,0 mg de complexo lítico, sendo este constituído de 2,5 mg de "celulase CP" e 2,5 mg de NOVOZYM 234.

3.2.28. Solução de Benlate

Metil-1 (Buticarbamoil) 2-Benzimidazol Carbomato (Benlate), 24 mg e água destilada esterilizada, 100 ml. O benlate foi dissolvido em 1 gota de acetona e posteriormente adicionou-se água. Filtrou-se e aqueceu-se a solução em ba-

nho-maria durante 15 minutos. A solução foi conservada à 4°C.

3.2.29. Gel de Acrilamida

Acrilamida, 3,325 g; Bis acrilamida, 0,175 g; Temed, 50 µl; Persulfato de Amônio 10%, 0,6 ml e Tampão Tris-citrato pH 8,6, 50 ml.

3.2.30. Solução de Persulfato de Amônia (AP)

Solução aquosa a 10% de AP.

3.2.31. Solução para Revelação de Esterases

Fast Blue R.R., 25 mg; α naftilacetato, 10 mg e tampão fosfato 0,2M pH 5,8, 50 ml.

3.2.32. Solução de Lugol

Iodo, 4 g; Iodeto de potássio, 8 g; água destilada, 100 ml. Esta solução concentrada foi diluída 1:10.

3.3. Sistema de Filtro para Técnica de Enriquecimento

No interior de funis de vidro foram fixadas 6

camadas de gaze com auxílio de fita crepe. Este conjunto foi envolto em papel de alumínio e autoclavado por 15 minutos a 120°C.

3.4. Uso de Palitos para Transferência de Colônias

Foram utilizados palitos roliços para transferir conídios no caso de inoculação em placas.

3.5. Esterilização e Incubação

Os meios de cultura e as soluções utilizadas foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 120°C. A temperatura de incubação foi de 28°C.

3.6. Coloração de Conídios (ROBINOW e CATEN, 1969)

Conídios jovens (2 - 3 dias) de crescimento em MC a 28°C, foram coletados, colocados sobre lamínula em presença de albumina 5% e homogeneizados com o auxílio de outra lamínula. Após secagem, colocou-se 5 ml de fixador Helly adicionado de mais ou menos 0,3 ml de formol neutro sobre a lamínula por 15 minutos no escuro. Estas foram posteriormente lavadas com álcool 70%. A seguir fez-se a hidrólise a 63°C com HCl 1N por 20 minutos em banho-maria, sendo então lavada em água destila-

da por duas vezes. O material foi corado com 10 ml de tampão fosfato pH 6,9 mais 18 gotas de solução de Giemsa, lavado com tampão fosfato e observado ao microscópio ótico.

3.6.1. Determinação do Número de Núcleos por Conídio

Conídios provenientes de crescimento em MC por 2-3 dias a 28°C foram preparados segundo o ítem 3.6. Estes foram observados ao microscópio ótico e determinada a porcentagem de núcleos por conídio. Para este fim fez-se a observação de 1.000 conídios de cada linhagem.

3.6.2. Medida do Tamanho dos Conídios

A medida dos conídios foi feita após preparação do material, como descrito no ítem 3.6., e utilizando-se uma ocular micrométrica adaptável ao microscópio ótico. Foi feito a medida de 30 conídios escolhidos aleatoriamente de cada linhagem.

3.6.3. Medida do Tamanho de Núcleos

O material foi preparado segundo o ítem 3.6. e a medida de 30 núcleos de conídios uni, bi, tri e tetranucleados foi feita utilizando-se ocular micrométrica adaptável ao

microscópio ótico.

3.7. Determinação dos Padrões Eletroforéticos em Linhagens de *A. awamori* e *A. niger* por Eletroforese em Gel de Acrilamida

3.7.1. Preparação das Amostras

As linhagens a serem determinadas eletroforéticamente foram crescidas em tubos de ensaio contendo MM líquido (2,5 ml) por 96 horas a 28°C. Neste período formou-se uma fina película que foi retirada com alça e colocada em tubo com 0,2 ml de tampão tris-citrato pH 8,6 (tampão gel). Usando-se um bastão de vidro o micélio foi esmagado, sendo logo após adicionado mais 0,1 ml de tampão e 0,1 ml de sacarose 40%. Estas foram centrifugadas a 3.000 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi aplicado ao gel de eletroforese.

3.7.2. Placa de Gel de Acrilamida

Foram dissolvidos 3,325 g de acrilamida e 0,175 g de bisacrilamida em 50 ml de tampão tris-citrato pH 8,6. Após dissolvido foi adicionado 50 µl de TEMED (tetramethyl - ethylenodiamine) e 0,6 ml de solução AP 10% (persulfato de amônio), sendo a mistura imediatamente vertida em placa de 15 cm X 16 cm X 0,3 cm. A polimerização ocorreu em tem

peratura ambiente. Foi feita uma pré corrida com amperagem e voltagem baixa por 30 minutos em geladeira.

3.7.3. Aplicação das Amostras e Corrida da Eletroforese

Com auxílio de micropipetas colocou-se 30 ml de amostra por canaleta do gel, sendo que em uma delas colocou-se o corante azul de bromo fenol. A placa foi colocada em cuba de eletroforese vertical. O tampão do eletrodo utilizado foi o tampão borato pH 8,2. A corrida foi feita a 30 mA, 120 V em geladeira por quatro horas.

3.7.4. Revelação das Esterases

Após a corrida o gel foi cuidadosamente retirado da placa e colocado em cuba de plástico com 50 ml da solução reveladora (ítem 3.2.31.).

3.8. Sobrevivência à Mutagênicos

3.8.1. Sobrevivência à Luz Ultra Violeta

Suspensões de confídios das linhagens de *A. awamori* ATCC 22342 e ATCC 11382 em tween-80 foram feitas, e com auxílio de câmara de Neubauer o número de confídios por ml foi estimado. Es-

tas suspensões foram diluídas (1:10) em salina e colocadas em placa de Petri esterilizadas, e então submetidas à irradiação luz ultravioleta a diferentes intensidades de fluxo de energia ($J/m^2/s$). Diluições apropriadas de cada tempo de irradiação foram feitas em soluções salina 0,85% e 0,1 ml foi semeado em placa contendo MC. As placas foram incubadas a $28^{\circ}C$ por mais ou menos 48 horas, sendo após este período contado o número de colônias por placa. Fez-se a curva de sobrevivência, tomando-se o número de colônias no tempo zero minutos de irradiação como 100% de sobrevivência.

3.8.2. Sobrevivência à Radiação Gama

Suspensões de conídios das linhagens de *A. awamori* ATCC 22342, *A. niger* ATCC 10864 e ATCC 22343, foram estimados quanto ao número de conídios por ml e, diluições de 1:10 em salina foram submetidas a diferentes doses de irradiação gama ^{60}Co (Krad). Diluições apropriadas de cada dose foram feitas em solução salina 0,85% e, 0,1 ml foi semeado em placa contendo MC. As placas foram incubadas a $28^{\circ}C$ por volta de 48 horas, sendo após este período contado o número de colônias por placa. A curva de sobrevivência foi feita, tomando-se o número de colônias obtidas na dose de zero Krad de irradiação como 100% de sobrevivência.

3.9. Determinação da Heterocariose na Linhagem de *Aspergillus awamori* ATCC 22342 e *A.niger* ATCC 22343

Separadamente, foram feitas suspensões de conídios em tween-80 das linhagens ATCC 22342 e ATCC 22343. Estas foram diluídas apropriadamente e semeadas em MC, após incubação a 28°C por 96 horas, estas foram transferidas para MM(placa com 26 pontos). Após a verificação de que algumas colônias cresciam normalmente enquanto que outras apresentavam crescimento residual, foi feita semeadura de uma mesma suspensão na mesma diluição em MM e em MC. Depois de 72 horas as colônias foram contadas.

3.9.1. Detecção da Auxotrofia nas Linhagens *A. awamori* ATCC 22342 e *A. niger* ATCC 22343

Conídios das colônias crescidas em MC, foram novamente transferidas para MC, mas agora em placa com 26 pontos. Após incubação a 28°C por 96 horas, estas foram transferidas com auxílio do replicador multifio para MM, MM + vitaminas, MM + aminoácidos, MM + ácidos nucleicos. Da mesma forma citada acima as colônias foram transferidas para MM + todos os aminoácidos separadamente. Após 96 horas de incubação a 28°C observou-se crescimento normal ou residual das colônias.

3.9.2. Isolamento de colônias de *A. niger* ATCC 22343 e *A. awamori* 22342(pro/arg)⁻ e (pro/arg)⁺

O isolamento de colônias(pro/arg)⁻ e (pro/arg)⁺ de *A. niger* ATCC 22343 e *A. awamori* ATCC 22342 foi feito através de várias sementeiras em MC e transferências para MM após crescimento e esporulação. Através de observação visual e repicagem isolaram-se colônias que sempre crescem bem em MM, colônias que sempre apresentam crescimento residual em MM mas, cres-cimento normal em MM + prolina ou MM + arginina e também colônias que tanto apresentavam crescimento normal como residual em MM.

3.9.3. Evidenciação do Bloqueio Metabólico da Via Biossintética dos Aminoácidos Prolina e Arginina nos Isolados(pro/arg)⁻ das Linhagens ATCC 22342 e ATCC 22343.

As colônias isoladas que apresentaram somente crescimento residual em MM foram inoculadas em MM e MM suplementados com intermediários pertencentes à via metabólica dos aminoácidos prolina e arginina (arginina, prolina, ornitina, ácido glutâmico, citrulina, glutamina). Após 72 horas de incubação a 28°C, foi feita a medida do diâmetro das colônias nos diversos meios suplementados.

Vale ainda ressaltar que esta metodologia des-

crita foi seguida para ambas as linhagens, isto é, ATCC 22342 e ATCC 22343.

3.10. Obtenção de Mutantes Auxotróficos e Morfológicos

3.10.1. Mutantes Auxotróficos e Morfológicos obtidos com Irradiação Gama

Foram feitas suspensões de conídios das linhagens selvagens de *A. niger* ATCC 10864 e ATCC 22343 em tween-80 0,1% provenientes de crescimento em MC por 7 a 8 dias a 28°C. O número destes conídios foram estimados fazendo-se o uso de câmara de Neubauer, sendo irradiados com radiação gama ^{60}Co na dose de 40 Krad para a linhagem ATCC 10864 e dose de 60 Krad para a linhagem ATCC 22343. Após irradiação diluições apropriadas foram semeadas em MC e incubadas por 48 horas a 28°C. Depois destas colônias terem esporulado, estas foram transferidas com auxílio de palitos roliços esterilizados para MM (placa com 26 pontos). Após 48 horas de incubação, as colônias não crescidas foram transferidas novamente para MC, e então consideradas como sendo mutantes auxotróficos. Mutantes morfológicos foram selecionados através de observação visual da morfologia de colônias.

Com objetivo de se ensaiar as deficiências nutritivas dos mutantes obtidos, MM sólido mais 0,1 ml de cada

uma das soluções de caseína hidrolizada, de ácidos nucléicos, de vitaminas e de extrato de leveduras, foram feitas. Os mutantes auxotróficos foram inoculados nas placas acima e estas foram incubadas por 2 ou 3 dias a 28°C. Desta forma o crescimento dos mutantes em uma das placas, e não em MM, indicou a deficiência de cada um, sendo então posteriormente transferidos para MM mais cada um dos aminoácidos, MM mais cada um dos ácidos nucléicos e cada uma das vitaminas separadamente. Para obtenção de duplos mutantes seguiu-se o mesmo critério acima com exceção de que o requisito nutricional referente à mutação simples era adicionado ao MM.

3.10.2. Mutantes Auxotróficos e Morfológicos obtidos com Irradiação Ultravioleta

Conídios da linhagem de *Aspergillus awamori* isolado (pro/arg)⁻ provenientes de crescimento em MC por 7 a 8 dias a 28°C, foram transferidos para solução de tween-80. O número de conídios foi estimado fazendo-se contagem em câmara de Neubauer, sendo posteriormente a suspensão irradiada com luz ultravioleta recebendo 1.872 j/m²/s. Após irradiação diluições apropriadas foram semeadas em MC e incubada por 48 horas a 28°C.

Os passos que sucederam estas etapas foram iguais aos descritos no ítem 3.10.1., com exceção de que foi adicionado 0,1 ml de prolina por placa.

3.10.3. Enriquecimento de Mutantes Auxotróficos da Linhagem de *Aspergillus awamori* Linhagem ATCC 22342 Selecionado (pro/arg)⁻

Suspensão de conídios da linhagem de *A. awamori* ATCC 22342 selecionado (pro/arg)⁻ em tween-80 0,1% foi submetida à irradiação ultravioleta na dose de 1872 j/m²/s.

Com a finalidade de se ter um controle, 0,1 ml da suspensão apropriadamente diluída, foi semeada em MC antes de ser submetida à irradiação. Após irradiação, novas diluições foram semeadas em MC e 1 ml da suspensão foi inoculado em 5 frascos Erlenmeyer de 500 ml contendo em cada um deles 100 ml de MM + pro líquido (é importante ressaltar que estes frascos foram envoltos com papel alumínio). O conteúdo de um destes frascos foi imediatamente filtrado em funil com gaze (ítem 3.3.) e o filtrado foi centrifugado a 4.000 rpm por minutos.

O precipitado foi ressuspendido em 3 ml de solução salina e procedeu-se a semeadura desta em MC (0,1 ml por placa). Os 4 frascos restantes foram incubados em mesa rotatória a 30°C com agitação de 150 rpm, sendo estes retirados da incubadora em diferentes intervalos de tempo, com 12, 20, 24, e 36 horas. Após retirado da incubadora estes foram filtrados, centrifugados, ressuspendidos e 0,1 ml semeados em MC, da mesma forma descrita acima. Estas placas foram incubadas a 28°C por 72 horas. Terminado este tempo as colônias foram con

tadas e transferidas para placas com 26 pontos contendo MM + pro para que fossem reconhecidos os mutantes auxotróficos, bem como para se verificar a porcentagem de mutantes auxotróficos nos diferentes tempos de filtração.

3.11. Teste da Produção de Enzimas Amilolíticas em Placa

As linhagens selvagens de *A. awamori* ATCC 22342 e ATCC 11382, e de *A. niger* ATCC 22343 e ATCC 10864 bem como alguns dos mutantes de *A. niger* ATCC 22343 e *A. awamori* ATCC 22342 foram inoculados em MM de amido (item 3.2.9.). As placas foram incubadas a 28°C e, após 6 dias de crescimento, foi medido o diâmetro das colônias e também diâmetro da colônia + halo, este detectado através do uso de lugol (item 3.2.32.).

3.12. Testes de Repressão Catabólica de Enzimas Amilolíticas pela Glicose

Conídios das linhagens selvagens de *A. niger* ATCC 10864 e ATCC 22343, e as linhagens selvagens de *A. awamori* ATCC 22342 e ATCC 11382, foram inoculados separadamente no centro da placa de Petri contendo MM (amido), sem glicose, outras adicionados com 0,5%, 1%, 1,5%. Estas foram incubadas por 6 dias a 28°C. De decorrido este período, fez-se a leitura do diâmetro da colônia,

bem como do diâmetro da colônia mais o halo de atuação das enzimas amilolíticas, fazendo-se uso de solução de lugol.

3.13. Curva Dose/Resposta ao Benlate

As linhagens selvagens de *A. awamori* ATCC 22342 e ATCC 11382 e também as linhagens selvagens de *A. niger* ATCC 10864 e ATCC 22343, foram inoculadas em placa de Petri contendo MC, MC + 0,3 µg/ml de benlate, MC + 0,6 µg/ml, MC + 0,9 µg/ml, MC + 1,2 µg/ml, MC + 1,8 µg/ml, MC + 2,4 µg/ml, MC + 3,0 µg/ml, MC + 6,0 µg de benlate por ml de meio. Após 41 horas de incubação a 28°C, seus diâmetros foram tomados.

3.14. Teste de Reversão

Todas as linhagens mutantes foram ensaiadas para reversão das marcas nutricionais. Para tal, utilizou-se MM e meio suplementado com o requisito nutricional da linhagem. Conídios dos diversos mutantes foram suspensos em solução de tween-80 e semeados em placas preparadas conforme descrito acima.

3.15. Análise Genética

3.15.1. Obtenção de Heterocários

Conídios das diferentes linhagens (com complementação para marcas auxotróficas e/ou morfológicas) foram colocados em tubos de ensaio contendo 2,5 ml de MM líquido suplementado com 2% de MC líquido (item 3.2.7.) que permitiu a germinação inicial dos esporos.

Após 6 dias de incubação a 28°C formou-se uma película à qual foi transferida para meio mínimo sólido e em alguns casos MM+prolina. Essa película foi dividida entre os quadrantes da placa, afim de se formarem os setores heterocarióticos. As placas foram incubadas a 28°C por 8 dias.

3.15.2. Obtenção de Diplóides

Conídios de colônias heterocarióticas em MM obtidos pela metodologia de ROPER (1952), foram usados para obtenção de suspensões em tween-80 (cerca de 10⁷ conídios/ml). Estas soluções foram semeadas em MM e em alguns casos MM+pro sem diluição e incubadas a 28°C por 3 - 4 dias. As colônias que se desenvolveram nestas placas foram transferidas novamente para MM (prováveis diplóides) e MC (para testar a estabilidade das colônias isoladas).

3.15.3. Metodologia utilizada para Comprovação da Diploidia

3.15.3.1. Número de Colônias originadas em MC e MM

Para se distinguir as colônias diplóides das colônias heterocarióticas crescidas no MM, conídios destas foram ressuspendidos em solução de tween-80 e o número de conídios por mililitro foi estimado em câmara de Neubauer. Diluições foram feitas de modo a se obter colônias bastante individualizadas na placa. Estas foram semeadas em MM e MC. Os possíveis diplóides deverão originar aproximadamente o mesmo número de colônias tanto em MM como em MC.

3.15.3.2. Número de Setores originados em MC e MC + pFA

O número de setores em MC foi observado após inoculação, dos diplóides e linhagens que os constituíram, no centro das placas contendo MC, as quais foram incubadas à 28°C por 6 dias. Da mesma maneira observou-se o número de setores dos diplóides obtidos em MC + 75 µg/ml de pFA.

3.15.3.3. Número de Núcleos por Conídios dos Diplóides obtidos

Para isso seguiu-se a metodologia descrita no

Ítem 3.6.1., exceto que apenas 300 conídios de cada diplóide foi observado.

3.16. Produção de Protoplastos

Conídios crescidos em MC a 28°C por 7-8 dias, foram suspensos em solução salina e determinadas suas concentrações (conídios/ml) com auxílio de Câmara de Neubauer. As suspensões foram adicionadas em meio completo líquido (Ítem 3.2.4.), para uma concentração final de 10⁶ conídios/ml e, incubadas em agitador rotatório (150 rpm) a 28°C por 23 horas. Ao fim deste período, o micélio desenvolvido foi filtrado em filtro Büchner com auxílio de bomba de vácuo e lavado em KCl 1,2 M (tampão fosfato pH 5,8). A seguir o micélio foi pesado e colocado em presença de KCl 0,6 M (tampão fosfato pH 5,8) e complexo de enzimas líticas na proporção de 50 mg de micélio: 1,0 ml de KCl 0,6 M 5 mg de enzima, sendo 50% de celulase CP e 50% de NOVOZIN.

Incubou-se novamente em agitador rotatório por 2:30 horas para que ocorresse a digestão lítica. Após este período, verificou-se a presença de protoplastos com o auxílio de microscópio. Após observar-se a presença de protoplastos, centrifugou-se a suspensão por alguns segundos a 500 rpm, retirou-se o sobrenadante e este foi centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi eliminado e o "pellet"

foi ressuspensão em KCl 0,6 M e então novamente centrifugado (3.000 rpm, 10 minutos). Esta operação foi repetida duas vezes. Os protoplastos obtidos foram ressuspensos em KCl 0,6 M e contados em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico.

3.17. Fusão de Protoplastos (PEBERDY, 1979)

Os protoplastos obtidos em KCl 0,6 M foram misturados em quantidades iguais, cerca de 10^6 , centrifugados a 3.000 rpm por 10 minutos e o pellet foi lavado por centrifugação em presença de KCl 0,6 M por duas vezes. O pellet obtido, foi ressuspensão em 1 ml de polietileno glicol (PEG) a 30°C e mantido a 30°C por 10 minutos. Após este período, adicionou-se KCl 0,6 M e centrifugou-se por 10 minutos a 3.000 rpm. Lavou-se duas vezes. O pellet obtido foi ressuspensão em 1 ml de KCl 0,6 M e diluições apropriadas foram feitas e semeadas pela técnica "pour plate" (0,5 ml) em MM KCl e MC KCl ($45 - 50^{\circ}\text{C}$).

3.18. Verificação da presença de Hifas, Esferoplastos e Conídios na suspensão de Protoplastos

Os protoplastos das linhagens mutantes obtidos no ítem 3.16. foram semeados por "pour plate" em MC e MC KCl.

A comparação do número de colônias crescidas em MC e MC KCl indicará o número de hifas e conídios presentes na solução, visto que em MC haverá crescimento de hifas e conídios enquanto que em MC KCl haverá crescimento de hifas, protoplastos e conídios.

3.19. Teste de Reversão dos Protoplastos

Suspensões não diluídas de protoplastos obtidos pelo item 3.16. foram semeados por "pour plate" em MM KCl. As colônias crescidas neste meio após incubação a 28°C por 7 - 8 dias representam os revertentes.

3.20. Análise estatística

Para a evidenciação do bloqueio metabólico da via biossintética dos aminoácidos prolina e arginina (item 3.9.3.), foi realizada a análise da variância da medida dos diâmetros das colônias crescidas nos diferentes meios de acordo com as substâncias pertencentes à via metabólica desses aminoácidos. Nos testes de repressão catabólica das enzimas amilolíticas pela glicose (item 3.12.), foi também realizada a análise da variância para os índices colônia + halo (colônia das quatro linhagens crescidas em MM 1% de amido e concenu

trações variáveis de glicose, comparando os índices obtidos entre as linhagens e, entre cada linhagem dentro dos diferentes meios.

Nos dois casos, como o delineamento experimental utilizado, foi inteiramente casualizado, utilizou-se o modelo matemático abaixo apresentado (PIMENTEL GOMES, 1973).

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Tratamentos	n-1	Q ₁
Erro	n (r-1)	Q ₂
T o t a l	(n.r) - 1	

Em ambos os casos o F foi calculado dividindo-se os quadrados médios dos tratamentos pelo quadrado médio do erro. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey através da seguinte fórmula: $\Delta = q \frac{s}{\sqrt{r}}$, 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.

O controle entre as médias foi do tipo:

$$Y = \hat{m}_i - \hat{m}_u.$$

4. RESULTADOS

4.1. Diâmetros de conídios, núcleos e porcentagens de conídios uni, bi, tri e tetranucleados

Após a coloração pelo método descrito no item 3.6., foi possível observar conídios uni, bi, tri e tetranucleados nas linhagens ATCC 22342 e ATCC 22343 e conídios uni e binucleados nas linhagens ATCC 11382 e ATCC 10864. As frequências obtidas para cada um dos tipos de conídios das quatro linhagens, estão apresentadas na Tabela 1.

A Tabela 2 mostra os valores médios (\bar{m}) e os desvios padrões (\hat{s}) do diâmetro de 30 conídios e de seus núcleos das duas linhagens de *Aspergillus awamori*, ATCC 22342 e ATCC 11382, e também das duas linhagens de *Aspergillus niger*, ATCC 10864 e ATCC 22343.

Tabela 1 - Percentagens de conídios uni, bi, tri e tetranucleados das linhagens selvagens de *A. niger* ATCC 22343, ATCC 10864 e de *A. awamori* ATCC 22342 e ATCC 11382.

Linhagens	Percentagem de conídios				Nº de conídios observados
	Uninucleados	Binucleados	Trinucleados	Tetranucleados	
ATCC 22342	27,0	71,6	1,0	0,4	1.000
ATCC 11382	45,2	54,8	0,0	0,0	1.000
ATCC 22343	35,7	55,3	7,9	1,1	1.000
ATCC 10864	34,8	65,2	0,0	0,0	1.000

4.2. Sobrevivência a mutagênicos físicos

4.2.1. Sobrevivência à radiação gama

Suspensões de conídios das linhagens de *Aspergillus awamori* ATCC 22342, *Aspergillus niger* ATCC 10864 e ATCC 22343, foram irradiadas com radiação gama Cobalto 60 (^{60}Co) como descrito no ítem 3.8.2. As Tabelas 3, 4 e 5, apresentam os resultados de sobrevivência obtidas, para as linhagens acima citadas. Com os dados dessas Tabelas, foram construídas as curvas de sobrevivência que estão representadas nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 - Diâmetro e desvios padrões de conídios e núcleos das linhagens ATCC 22342, ATCC 11382, ATCC 22343 e ATCC 10864.

L i n h a g e n s		Diâmetro em micrômetros				
		Conídios			Núcleos	
		\hat{m}	\pm	s	\hat{m}	\pm
ATCC 22342	Uninucleados	4,10	0,28		1,84	0,15
	Binucleados	4,52	0,39		1,81	0,10
	Trinucleados	5,47	0,29		1,82	0,11
	Tetranucleados	5,77	0,18		1,80	0,08
ATCC 11382	Uninucleados	3,99	0,19		1,72	0,11
	Binucleados	4,30	0,03		1,67	0,14
ATCC 22343	Uninucleados	4,34	0,38		1,84	0,19
	Binucleados	4,56	0,25		1,73	0,13
	Trinucleados	5,70	0,48		1,75	0,07
	Tetranucleados	6,41	0,51		1,67	0,12
ATCC 10864	Uninucleados	4,07	0,22		1,80	0,10
	Binucleados	4,28	0,21		1,82	0,13

Tabela 3 - Percentagem de conídios de *A. awamori* ATCC 22342 sobreviventes à radiação gama. (Os dados constituem a média de 2 repetições).

Dose (Krad)	Conídios viáveis/ml	% relativa de sobreviventes
0	$1,22 \times 10^6$	100,000
20	$8,85 \times 10^5$	72,540
40	$1,09 \times 10^5$	8,890
60	$4,05 \times 10^4$	3,306
80	$9,95 \times 10^3$	0,779
100	$2,63 \times 10^3$	0,214

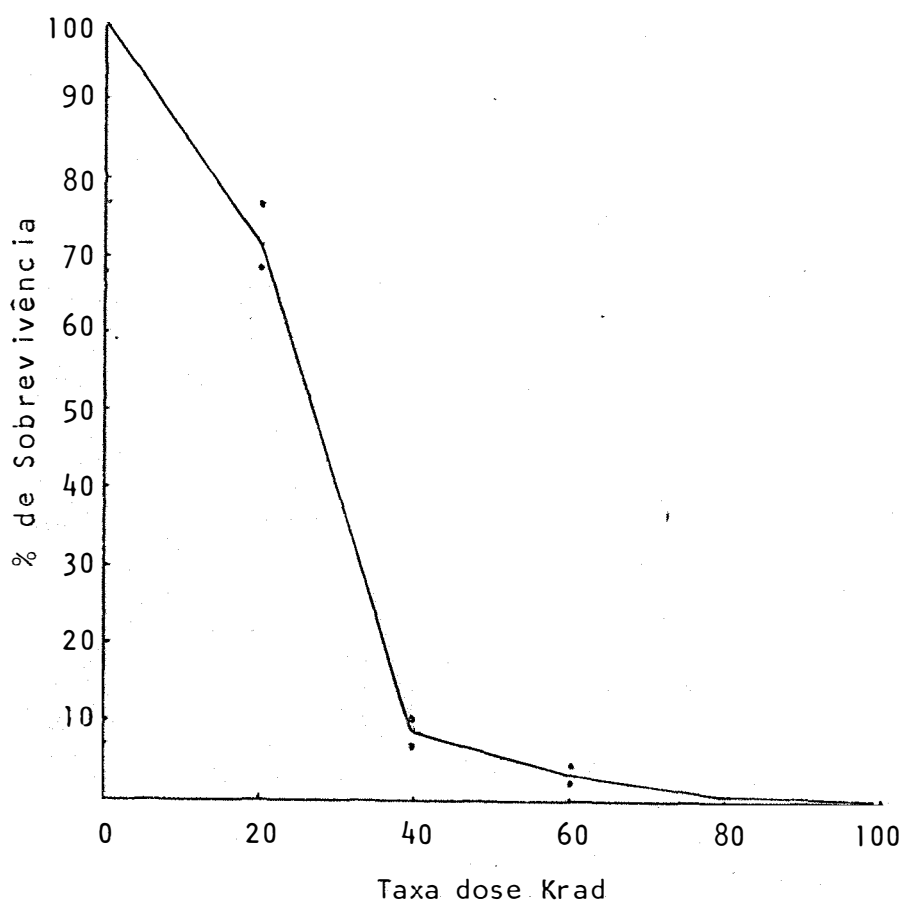


Figura 1 - Curva de sobrevivência de *A. awamori* linhagem ATCC 22342 à radiação gama.

Tabela 4 - Percentagem de conídios de *A. niger* ATCC 10864 sobreviventes à radiação gama. (Os dados constituem a média de 2 repetições).

Dose (Krad)	Conídios viáveis/ml	% relativa de sobrevivência
0	$1,90 \times 10^7$	100,000
20	$1,52 \times 10^6$	10,980
40	$4,74 \times 10^5$	3,490
60	$6,25 \times 10^4$	0,460
80	$2,45 \times 10^4$	0,147
100	$1,17 \times 10^4$	0,078

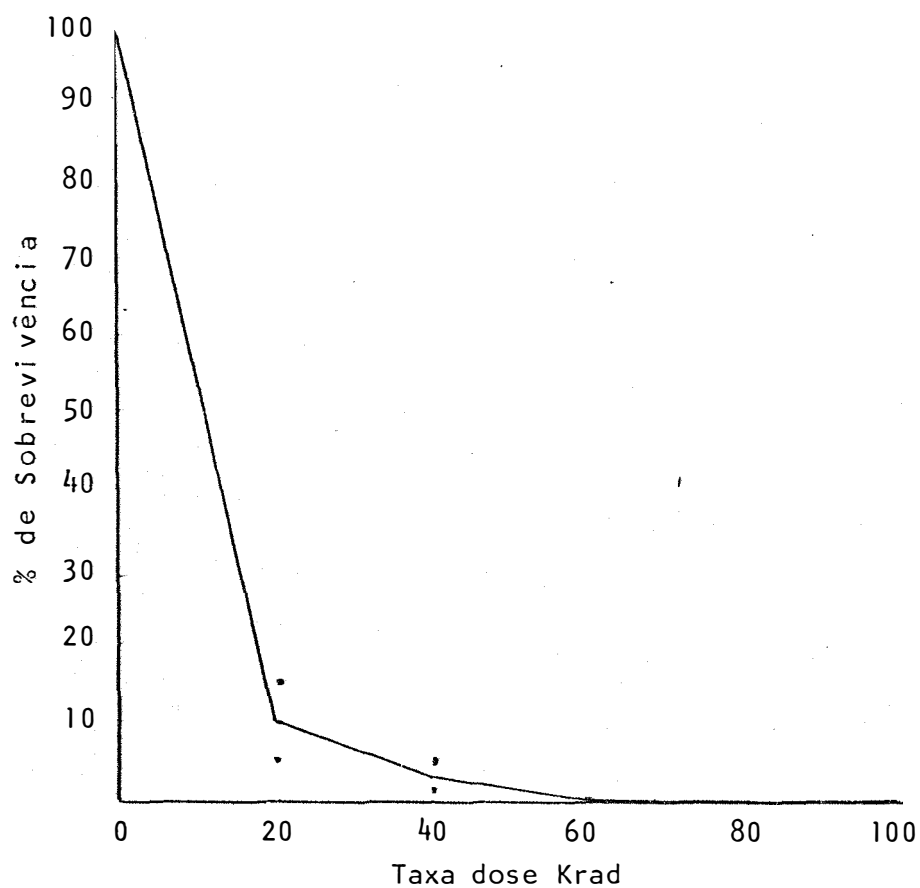


Figura 2 - Curva de sobrevivência de *A. niger* linhagem ATCC 10864 à radiação gama.

Tabela 5 - Percentagem de conídios de *A. niger* ATCC 22343 sobreviventes à radiação gama. (Os dados constituem a média de 2 repetições).

Dose (Krad)	Conídios viáveis/ml	% relativa de sobrevivência
0	$1,32 \times 10^7$	100,000
20	$8,20 \times 10^6$	62,120
40	$1,21 \times 10^6$	9,160
60	$6,05 \times 10^5$	4,580
80	$9,05 \times 10^4$	0,680
100	$2,96 \times 10^4$	0,220

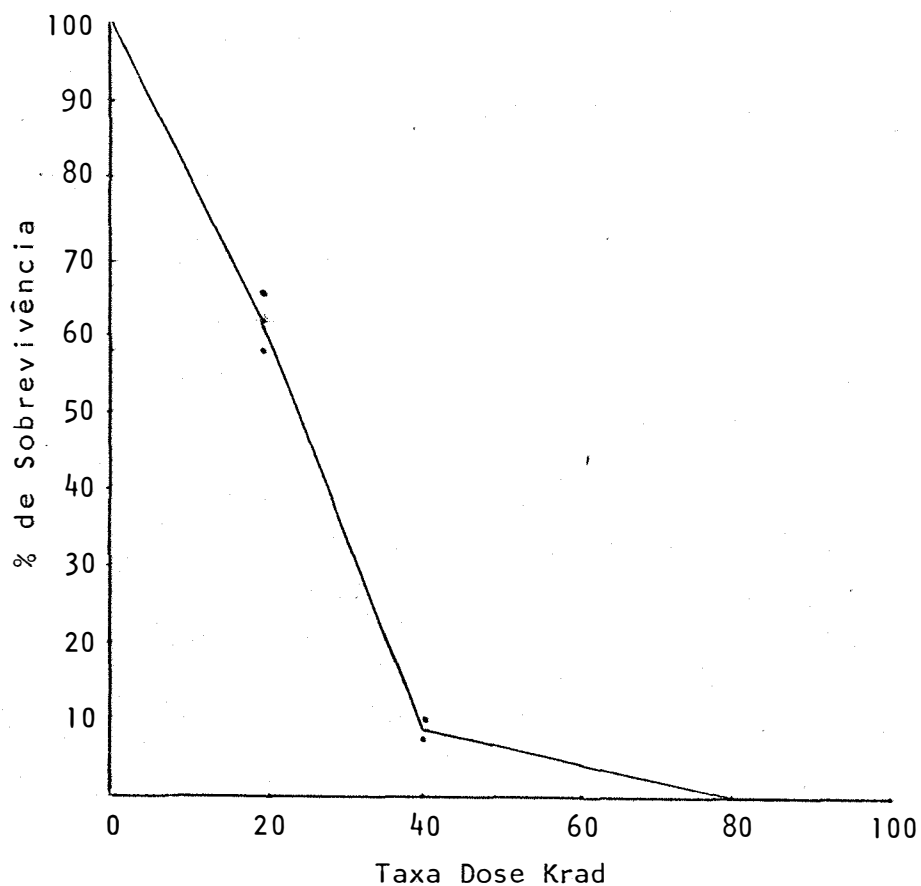


Figura 3 - Curva de sobrevivência de *A. niger* linhagem ATCC 22343 à radiação gama.

4.2.2. Sobrevivência à luz ultravioleta

Suspensões de conídios das linhagens de *A. awamori* ATCC 22342 e ATCC 11382, foram irradiadas com luz ultravioleta, como descrito no ítem 3.8.1. As Tabelas 6 e 7, apresentam os resultados de sobrevivência obtidos, e as Figuras 4 e 5 apresentam as respectivas curvas de sobrevivência.

Tabela 6 - Percentagem de conídios de *A. awamori* ATCC 22342 sobreviventes à luz ultravioleta. (Os dados constituem a média de 2 repetições).

Fluxo de energia J/m ² /s	Conídios viáveis/ml	% relativa de sobrevivência
0	$3,80 \times 10^5$	100,000
468	$1,92 \times 10^5$	52,290
936	$1,17 \times 10^5$	28,210
1.872	$3,14 \times 10^4$	6,230
2.808	$8,17 \times 10^3$	1,120
3.744	$3,34 \times 10^3$	0,620
4.680	$1,06 \times 10^3$	0,390

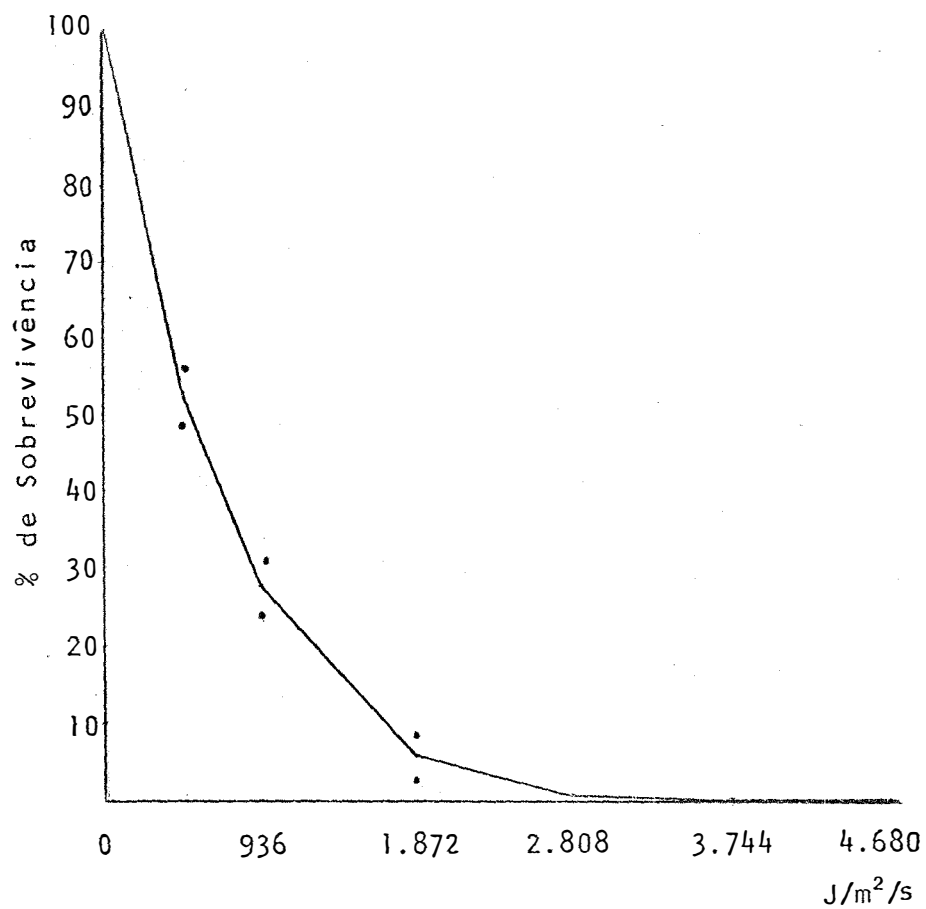


Figura 4 - Curva de sobrevivência de *A. awamori* linhagem ATCC 22342 à luz ultravioleta.

Tabela 7 - Percentagem de conídios de *A. awamori* ATCC 11382 sobreviventes à luz ultravioleta. (Os dados constituem a média de 2 repetições).

Fluxo de energia J/m ² /s	Conídios viáveis/ml	% relativa de sobrevivência
0	$5,95 \times 10^5$	100,000
468	$3,50 \times 10^5$	58,000
936	$1,10 \times 10^4$	1,840
1.872	$1,00 \times 10^3$	0,160
2.808	$4,40 \times 10^2$	0,075
3.744	$2,50 \times 10^2$	0,042
4.680	$1,00 \times 10^2$	0,016

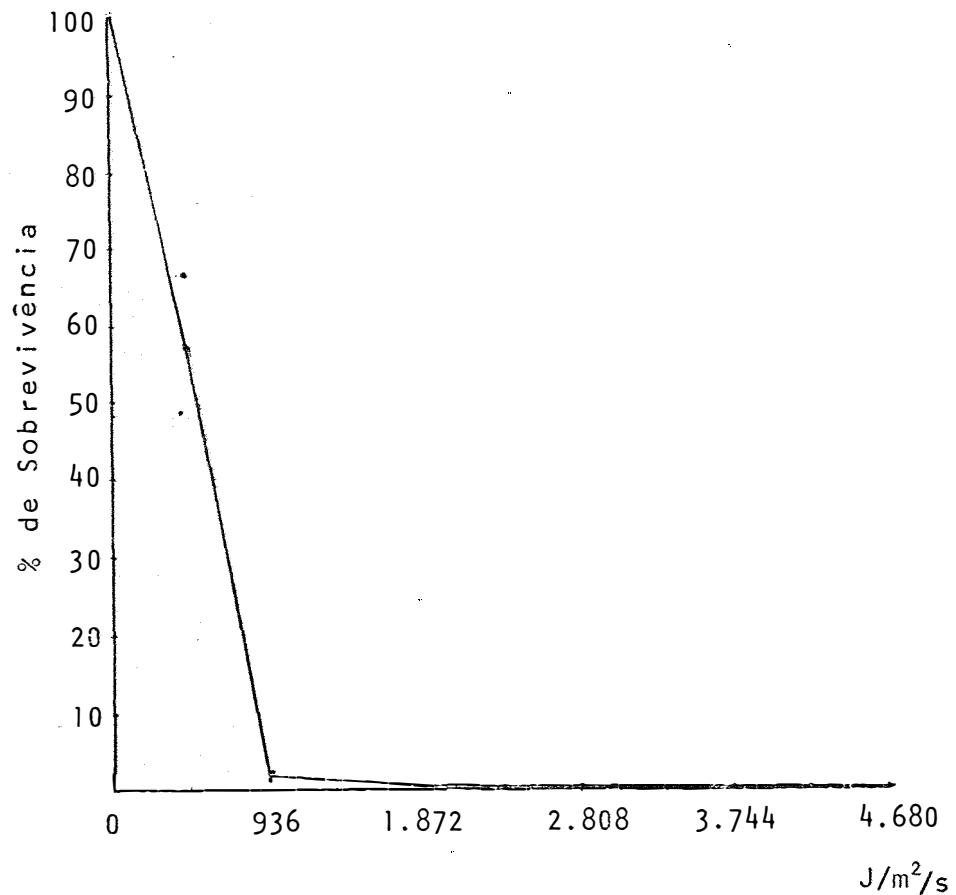


Figura 5 - Curva de sobrevivência de *A. awamori* linhagem ATCC 11382 à luz ultravioleta.

4.3. Relação da média do número de núcleos por conídio e percentagem de sobrevivência

Com objetivo de relacionar o número de núcleos por conídio e a percentagem de sobrevivência aos mutagênicos usados, foram utilizados os dados da Tabela 1 para se calcular a média do número de núcleos por conídio para cada linhagem e esta média foi relacionada com as percentagens de sobrevivência às diferentes doses. Os dados são rerepresentados na Tabela 8 e 9, para irradiação gama e luz ultravioleta, respectivamente.

Tabela 8 - Média do número de núcleos por conídio e percentagens de sobrevivência à radiação gama ^{60}Co nas diferentes doses.

Linhagens	Média do número de núcleos por conídio	% de Sobrevivência				
		Doses (Krad)				
		20	40	60	80	100
ATCC 22342	1,748	72,54	8,89	3,30	0,77	0,21
ATCC 22343	1,744	62,12	9,16	4,58	0,68	0,22
ATCC 10864	1,652	10,98	3,49	0,46	0,14	0,07

Tabela 9 - Média do número de núcleos por conídio e percentagem de sobrevivência à diferentes doses de ultravioleta.

Linhagens	Média do número de núcleos por conídios	% de sobrevivência					
		Doses ($\text{J}/\text{m}^2/\text{s}$)					
		468	936	1872	2808	3744	4680
ATCC 22342	1,748	52,29	28,21	6,23	1,12	0,62	0,39
ATCC 11382	1,548	58,00	1,84	0,16	0,07	0,04	0,01

4.4. Heterocariose na linhagem de *A. awamori* ATCC 22342 e *A. niger* ATCC 22343

Utilizando-se da metodologia descrita no ítem 3.9., o número de colônias obtidas em meio mínimo e em meio completo de uma mesma suspensão de conídios em tween-80 é apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Número de colônias da linhagem ATCC 22342 e ATCC 22343 em MC e MM. (Os resultados constituem a média de 10 placas).

Linhagem	MC	MM
ATCC 22343	159,0	108,2
ATCC 22342	47,5	10,1

4.4.1. Auxotrofia nas linhagens de *A. awamori* ATCC 22342 e *A. niger* ATCC 22343

Após transferência de colônias isoladas para MM, MM+vitaminas, MM+ácidos nucleicos e MM+aminoácidos como descrito no ítem 3.9.1., observou-se crescimento normal para 100% das colônias em MM+aminoácidos, enquanto que em MM, MM+vitaminas, MM+ácidos nucleicos continuou o aparecimento de colônias com crescimento normal e também residual. Posteriormente estas foram transferidas para MM+todos os aminoácidos separadamente e o resultado observado foi crescimento

normal para todas as colônias em placas contendo MM suplementado com prolina (pro) e/ou MM suplementado com arginina (arg).

Utilizando-se da metodologia descrita no ítem 3.9.2. pode-se isolar colônias que sempre apresentavam crescimento normal em MM (pro/arg)⁺ colônias que sempre apresentavam crescimento residual em MM sem prolina ou arginina (pro/arg)⁻ e colônias que continuavam a segregar em MM ausente de prolina ou arginina (pro/arg)^{+⁻}.

4.4.2. Evidenciação do bloqueio metabólico da via biossintética dos aminoácidos prolina e arginina nos isolados (pro/arg)⁻ das linhagens ATCC 22342 e ATCC 22343

Após inoculação de colônias (pro/arg)⁻ em MM suplementado com substâncias pertencentes à via metabólica dos aminoácidos prolina e arginina (ítem 3.9.3.). A medida do diâmetro das colônias nos diversos meios suplementados foi efetuada e estas são apresentadas na Tabela 11 e, os valores e significâncias dos quadrados médios da análise da variância na Tabela 12. A Tabela 13 apresenta a média do diâmetro das colônias em MM suplementado com prolina, arginina e ornitina, após 48, 72 e 96 hs de incubação.

Tabela 11 - Medida do diâmetro das colônias das linhagens ATCC 22342 (pro/arg)⁻ e ATCC 22343 (pro/arg)⁻ em meio mínimo e meio mínimo suplementado com substâncias pertencentes à via metabólica dos aminoácidos prolina e arginina.

Meios de Cultura	L i n h a g e n s							
	22343(pro/arg) ⁻			22343(pro/arg) ⁻				
	I	II	III	Média	I	II	III	Média
MM + Prolina	1,7	1,6	1,5	1,600a	1,5	1,5	1,5	1,500a
MM + Arginina	1,5	1,5	1,6	1,533a	1,5	1,6	1,5	1,533a
MM + Ornitina	1,2	1,0	1,1	1,100b	1,1	1,3	1,2	1,200b
MM + Citrulina	0,4	0,3	0,3	0,333c	0,3	0,3	0,3	0,300c
MM + Ácido Glutâmico	0,3	0,3	0,3	0,300c	0,4	0,4	0,3	0,367c
MM + Glutamina	0,3	0,3	0,3	0,300c	0,5	0,5	0,4	0,467c
Meio Mínimo (MM)	0,3	0,3	0,3	0,300c	0,3	0,3	0,3	0,300c

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

DMS: 0,1296.

Tabela 12 - Valores e significância dos Quadrados Médios da Análise da Variância da Medida do Diâmetro das Colônias das linhagens ATCC 22342 pro/arg⁻ e ATCC 22343 pro/arg⁻ em MM e MM suplementado com substâncias pertencentes à via metabólica dos Aminoácidos prolina e arginina.

Fontes de Variação	G.L.	Q.M.	F
Linhagens	1	0,0100	3,0107 n.s.
Meio para Linhagem 1	6	1,1165	338,3333**
Meio para Linhagem 2	6	0,9930	300,9090**
Erro	28	0,0033	
Média:		1,186	
Coeficiente de Variação: %		4,84	

n.s. = Não significativo.

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 13 - Média do diâmetro das colônias das linhagens ATCC 22342 (pro/arg)⁻ e ATCC 22343 (pro/arg)⁻ em MM suplementado com arginina, prolina e ornitina em diferentes períodos de incubação.

Meios	Linhagens					
	22343			22342		
	Horas de incubação			Horas de incubação		
	48	72	96	48	72	96
MM + Prolina	1,00	1,50	2,50	1,00	1,60	2,70
MM + Arginina	1,05	1,60	2,60	1,10	1,55	2,65
MM + Ornitina	0,10	1,00	1,85	0,50	1,30	2,30

4.5. Obtenção de mutantes

4.5.1. Obtenção de mutantes de *A. awamori*, linhagem ATCC 22342

Conídios da linhagem de *A. awamori* ATCC 22342 selecionados (pro/arg)⁻ foram submetidos à irradiação ultravioleta, como descrito no item 3.10.2. Cerca de 1.500 colônias foram analisadas, não sendo detectado nenhum mutante auxotrófico nem mesmo morfológico. Desta forma tentou-se um enriquecimento de mutantes auxotróficos pelo método de filtração descrito no item 3.10.3. Os resultados são apresentados nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14 - Número de conídios por mililitro (ml), irradiados e não irradiados, sem filtração.

	Nº de colônias por ml	
	Sem filtração	Não irradiado
	Irradiado	$1,88 \times 10^5$

Tabela 15 - Número de conídios por ml após diferentes tempos de incubação e filtração.

	Tempo (horas)	Nº de colônias por ml em MC
	Com filtração	zero
12		$1,23 \times 10^3$
20		$2,51 \times 10^2$
24		$1,37 \times 10^2$
36		$3,70 \times 10^1$

A Tabela 16 mostra a percentagem de mutantes auxotróficos obtidos nos diferentes tempos de incubação em MM líquido. Com esses resultados construiu-se a Figura 6. Na Figura 7 está representada em esquema, os passos seguidos para obtenção de mutantes da linhagem ATCC 22342 através da técnica de enriquecimento por filtração e da técnica de isolamento total. Os marcadores genéticos obtidos foram: ade, met, pro, pyr (requisitos nutricionais para adenina, metionina, prolina, piridoxina, respectivamente) e marcadores morfológicos mor₁, mor₂, mor₃, correspondendo os dois primeiros a colônias de crescimento normal de coloração bege e o último a colônia pouco compacto com esporulação escassa de coloração bege.

4.5.2. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos da linhagem de *A. niger* ATCC 10864

Mutantes de *A. niger* linhagem ATCC 10864 foram obtidos através de indução com irradiação gama, utilizando-se a metodologia descrita no ítem 3.10.1.

Na Figura 8 está representado os passos seguidos para a obtenção de mutantes simples e duplos de *A. niger* ATCC 10864. Os marcadores genéticos obtidos foram: pab, nic, pyr, bio, ade (requisitos nutricionais para ácido *p*-aminobenzóico, ácido nicotínico, piridoxina, biotina e adenina, respectivamente) e marcadores morfológicos mor₁ que corresponde a colônia de conídios esverdeados e mor₂ que corresponde a colônia de crescimento irregular, micélio amarelo e de escassa esporulação.

Tabela 16 - Percentagem de mutantes auxotróficos obtidos nos diferentes tempos de incubação.

Tempo (horas)	Nº de colônias analisadas	Nº de mutantes auxotróficos	% de mutantes
zero	1.331	1	0,075
20	182	5	2,747
24	130	4	3,076
36	34	0	0

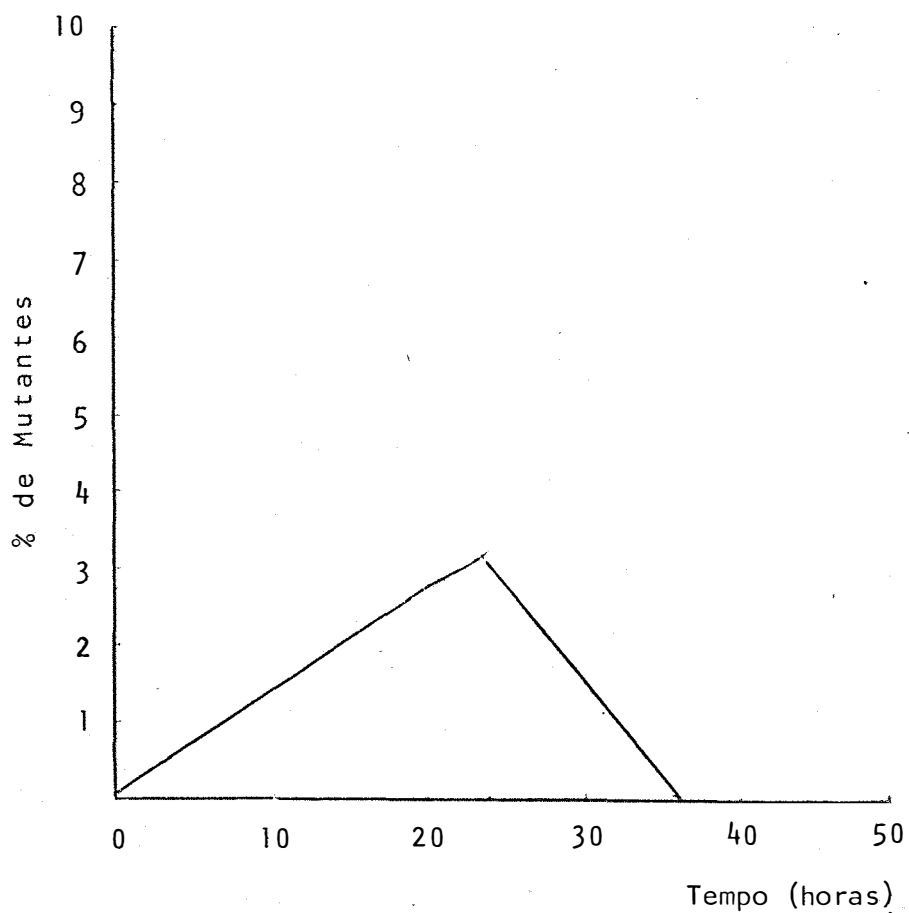


Figura 6 - Percentagem de mutantes obtidos nos diferentes tempos de incubação.



Figura 7 - Passos seguidos para obtenção dos mutantes morfológicos e auxotróficos de *A. awamori* linhagem ATCC 22342.

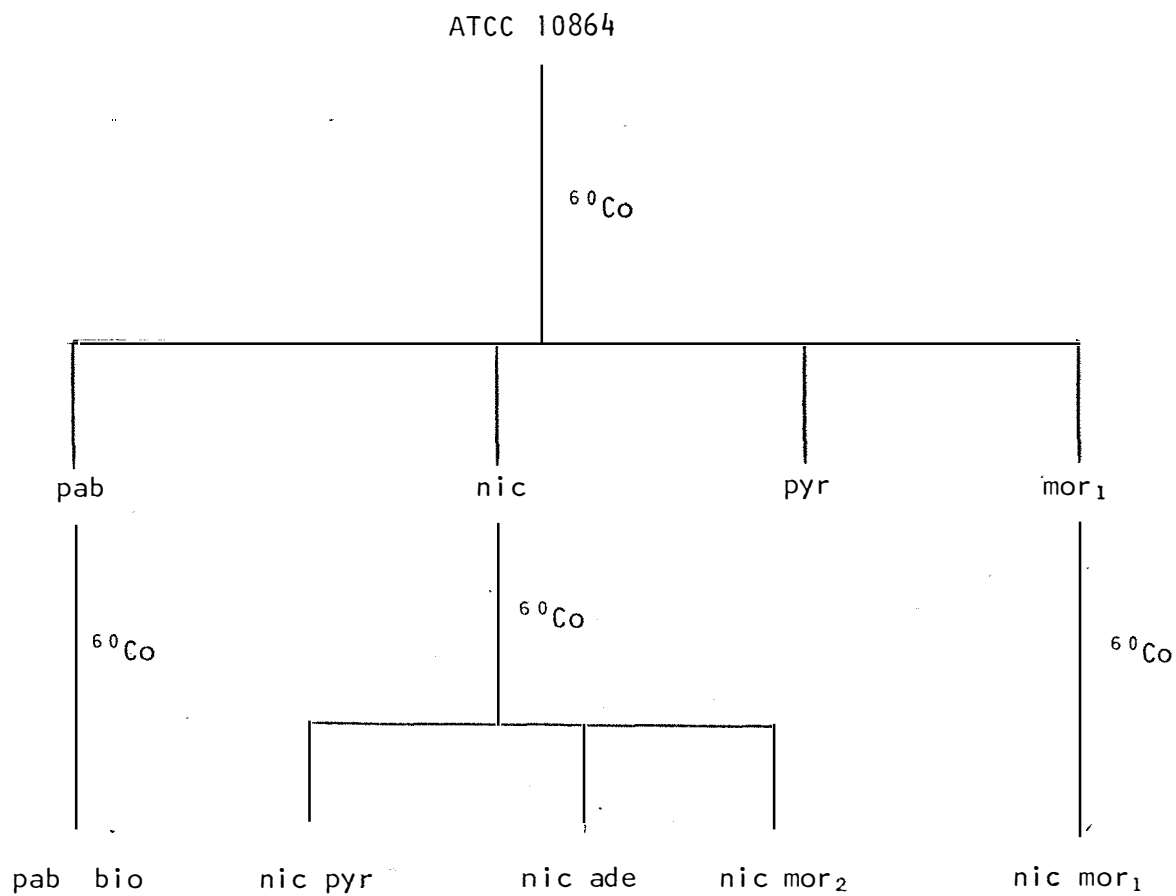


Figura 8 - Passos seguidos para obtenção de mutantes de *Aspergillus niger* ATCC 10864.

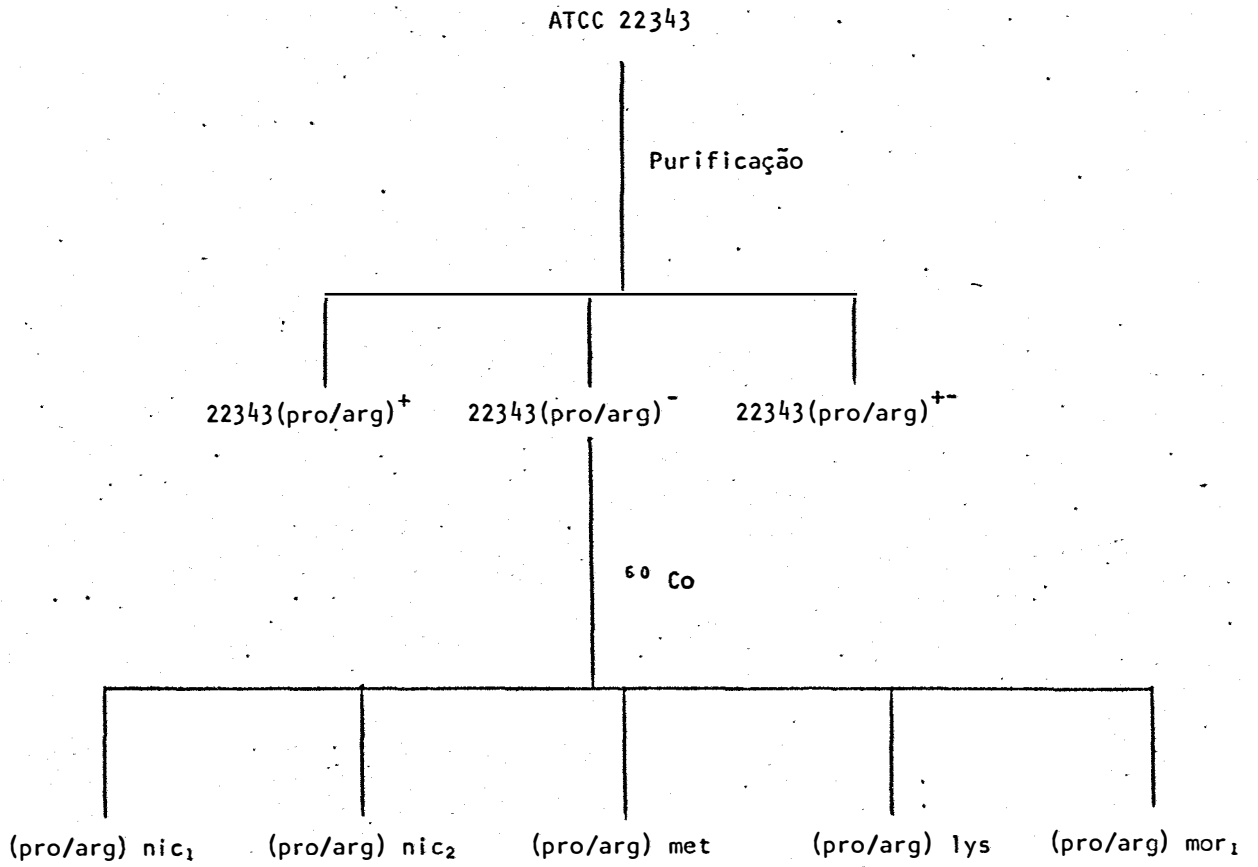


Figura 9 - Passos seguidos para obtenção de mutantes de *A. niger* linhagem ATCC 22343.

4.5.3. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos de *A. niger* linhagem ATCC 22343

A Figura 9 demonstra os passos seguidos para obtenção de mutantes de *A. niger* ATCC 22343 com irradiação gama como descrito no ítem 3.10.1. Os marcadores genéticos obtidos foram pro, arg, nic, met, lys (requisitos nutricionais para prolina, arginina, ácido nicotínico, metionina e lisina, respectivamente). O mutante morfológico mor₁ apresenta colônia de crescimento normal com conídios brancos.

4.6. Teste de reversão

Os mutantes de *A. niger* e *A. awamori* foram ensaiados (segundo o ítem 3.14.) para verificação da estabilidade das marcas nutricionais e morfológicas para que pudessem ser utilizadas com devida segurança na análise genética. A frequência de reversão espontânea para os marcadores dos mutantes obtidos e a serem utilizados nos cruzamentos genéticos estão representados na Tabela 17. A simbologia desses mutantes, para as linhagens ATCC 22342, ATCC 22343 e ATCC 10864, está apresentada na Tabela 18. As características fenotípicas das linhagens originais utilizadas encontram-se na Figura 10 e da linhagem ATCC 22342 com os três mutantes morfológicos dela obtida podem ser vistos na Figura 11.

Tabela 17 - Frequência de reversão espontânea de diferentes mutantes de *A. awamori* e *A. niger* utilizados nos cruzamentos genéticos.

M u t a n t e s	Frequência de reversão em 10^6 conídios
ATCC 22342 (pro/arg) ade	< 1
ATCC 22342 (pro/arg) pyr	< 1
ATCC 22342 (pro/arg) met mor ₂	< 1
ATCC 22343 (pro/arg) nic	< 1
ATCC 22343 (pro/arg) met	< 1
ATCC 10864 nic ade	< 1
ATCC 10864 nic mor ₂	< 1
ATCC 10864 pab bio	< 1

Tabela 18 - Simbologia dos mutantes de *A. awamori* e *A. niger* obtidos por irradiação gama e luz ultravioleta, utilizados para cruzamentos.

Linhagem original irradiada	Morfo- logia	Mutante nutricional	Simbologia do mutante
	normal	prolina ou arginina, piridoxina.	(pro/arg) pyr
ATCC 22342	normal	prolina ou arginina, adenina.	(pro/arg) ade
	esporos bege	prolina ou arginina, metionina.	(pro/arg) met mor ₂
ATCC 22343	normal	prolina ou arginina, ácido nicotínico.	(pro/arg) nic
	normal	prolina ou arginina, metionina.	(pro/arg) met
	normal	ácido nicotínico, adenina.	nic ade
ATCC 10864	normal	ácido paraaminoben- zôico, biotina	pab bio
	micélio amarelo	ácido nicotínico	nic mor ₂

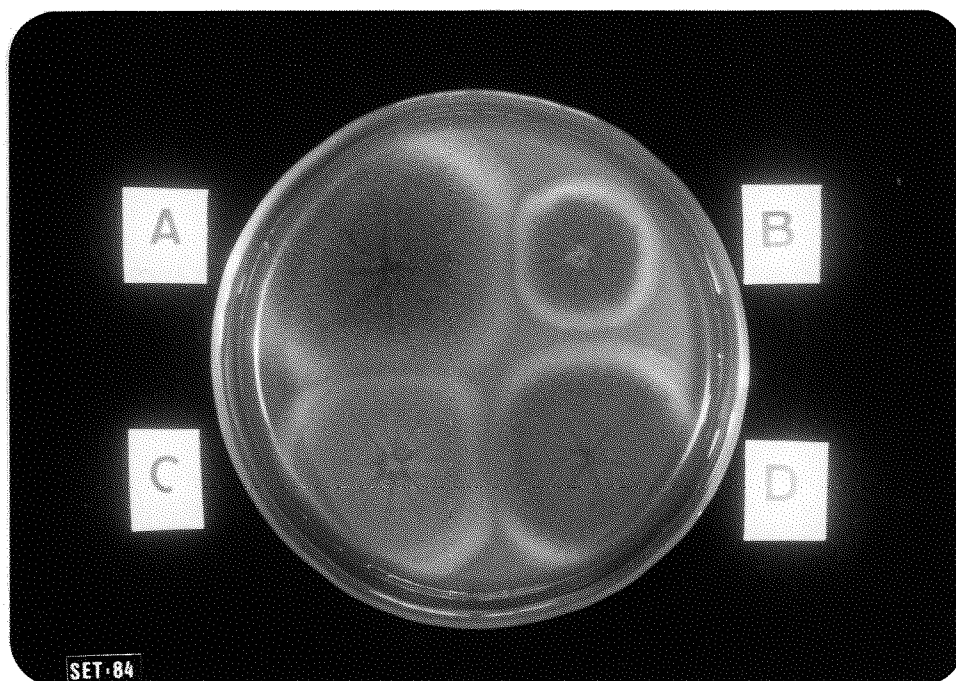


Figura 10 - Linhagens de *A. niger*: A- ATCC 10864 e B- ATCC 22343, e Linhagens de *A. awamori*: C- ATCC 11382 e D- ATCC 22342.

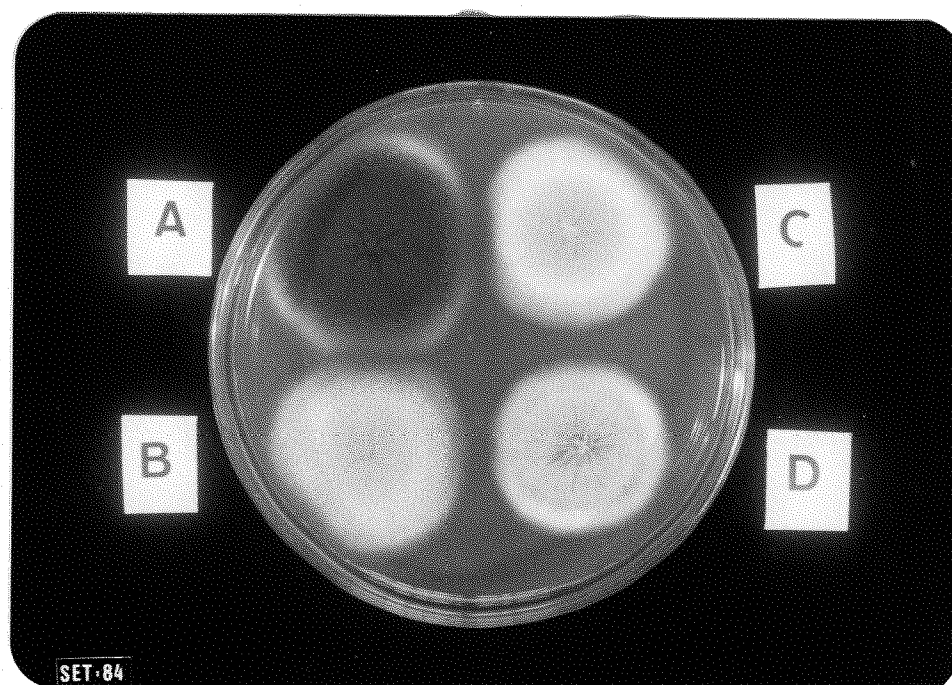


Figura 11 - Linhagens de *A. awamori*: A- ATCC 22342 e mutantes morfológicos dela obtidos: B- mor₁, C- mor₂ e D- mor₃.

4.7. Produção de enzimas amilolíticas em placas

Seguindo-se a metodologia descrita ítem 3.11. obteve-se o diâmetro das colônias, e o diâmetro das colônias mais os halos de degradação de amido, e desta forma pode-se calcular a relação colônia+halo/colônia das linhagens selvagens (apresentados na Tabela 19) e dos mutantes das duas linhagens mais produtoras utilizados em alguns dos cruzamentos citados na Tabela 25 (apresentados na Tabela 20).

Tabela 19 - Média do diâmetro em centímetro (cm) das colônias, colônia+halo e relação colônia+halo/colônia das linhagens selvagens de *A. niger* e *A. awamori*.

L i n h a g e n s	Diâmetro das colônias (cm)	Diâmetro colônia + halo (cm)	$\frac{\text{Halo + colônia}}{\text{colônia}}$
22342	2,33	4,00	1,72
22343	3,10	4,90	1,58
10864	5,16	6,03	1,17
11382	4,10	5,20	1,27

Tabela 20 - Média do diâmetro em centímetros (cm) das colônias, colônia+halo e relação colônia+halo/colônia das mutantes de *A. niger*, linhagem 22343 e *A. awamori* linhagem 22342.

L i n h a g e n s	Diâmetro das colônias (cm)	Diâmetro colônia + halo (cm)	$\frac{\text{Halo + colônia}}{\text{colônia}}$
22342 (pro/arg) met mor ₂	2,82	4,74	1,68
22342 (pro/arg) pyr	2,80	4,74	1,69
22342 (pro/arg) ade	-	-	-
22343 (pro/arg) nic	2,82	4,68	1,65
22343 (pro/arg) met	-	-	-

(-) não realizado.

4.8. Teste de repressão catabólica das enzimas amilolíticas pela glicose

Os resultados do diâmetro das colônias e relação colônia + halo/colônia em placas contendo meio mínimo a-crecido de prolina 1% de amido e diferentes concentrações de glicose, variando de 0 a 1,5% das linhagens ATCC 22342, ATCC 10864, ATCC 11382 e ATCC 22343, foram tomados segundo o ítem 3.12. (apresentado na Tabela 21). A Tabela 22 mostra a comparação das médias dos índices colônia + halo feito pelo teste de Tukey, enquanto que a Tabela 23 apresenta os valores e significâncias dos quadrados médios da análise da variância.

Tabela 21 - Médias dos diâmetros de colônias + halos, colônias e relação halo + colônia em placas contendo MM 1% de amido e concentrações variáveis de glicose. Linhagens: ATCC 10864, ATCC 22342, ATCC 11382 e ATCC 22343. (Os dados constituem a média de 3 repetições).

Linhagens	MM + 0% Glicose		MM + 0,5% Glicose		MM + 1% Glicose		MM + 1,5% Glicose							
	Col.+ha 10	Col. 10/col.	Col.+ha 10	Col. 10/col.	Col.+ha 10	Col. 10/col.	Col.+ha 10	Col. 10/col.						
10864	6,03	5,16	1,17	1,17	6,10	5,33	1,14	1,11	5,83	5,50	1,06			
22342	4,00	2,33	1,72	1,72	4,36	2,3	1,90	1,87	4,2	2,24	3,70	1,83	2,02	
11382	5,20	4,10	1,27	1,27	5,47	4,46	1,23	1,31	5,60	4,26	1,31	5,40	4,23	1,27
22343	4,90	3,1	1,58	1,58	4,98	3,10	1,60	1,60	5,33	3,33	1,60	5,26	3,30	1,60

Tabela 22 - Comparação das médias dos índices colônia + halo/colônia em placas contendo MM 1% amido e concentrações variáveis de glicose.

Meios de Cultura	L i n h a g e n s																				
	1	0	8	6	4	2	2	3	4	2	1	1	3	8	4	2	2	3	4	3	
	Média	I	II	III	Média	I	II	III	Média	I	II	III	Média	I	II	III	Média	I	II	III	Média
MM + 0% Glicose	1,15	1,18	1,18	1,18	1,17a	1,67	1,74	1,74	1,74	1,72a	1,27	1,27	1,27	1,27	1,27	1,27	1,27a	1,58	1,58	1,58	1,58a
MM + 0,5% Glicose	1,13	1,15	1,15	1,15	1,14a	1,91	1,87	1,91	1,90ab	1,22	1,22	1,22	1,25	1,23a	1,60	1,55	1,67	1,61a	1,61a	1,61a	1,61a
MM + 1,0% Glicose	1,10	1,13	1,11	1,11a	2,67	2,00	2,00	2,04	2,24b	1,39	1,25	1,30	1,31a	1,56	1,71	1,54	1,60a	1,60a	1,60a	1,60a	1,60a
MM + 1,5% Glicose	1,05	1,07	1,05	1,06a	1,94	1,95	2,17	2,02ab	1,34	1,29	1,20	1,28a	1,61	1,49	1,70	1,60a	1,60a	1,60a	1,60a	1,60a	1,60a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
DMS = 0,357.

Tabela 23 - Valores e significâncias dos Quadrados Médios da Análise de Variância relação halo + colônia/colônia em placas contendo MM 1% de amido e concentrações variáveis de glicose.

Fontes de Variação	G.L.	Q.M.	F
Linhagens	3	1,6927	100,7560**
Linhagem 1 p/Meio	3	0,0071	0,4226 n.s.
Linhagem 2 p/Meio	3	0,0937	5,5773**
Linhagem 3 p/Meio	3	0,0035	0,2083 n.s.
Linhagem 4 p/Meio	3	0,0004	0,0238 n.s.
Erro	32	0,0168	
Média		1,49	
Coeficiente de Variação: %		8,70	

n.s. = Não significativo.

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

4.9. Curvas de dose resposta ao benlate

Os diâmetros das colônias de linhagens selvagem inoculadas em MC após 41 horas de incubação contendo concentrações variáveis de solução benlate são apresentados na Tabela 24. (Os dados correspondem à média de 3 repetições).

Com estes dados construiu-se a Figura 12.

Tabela 24 - Diâmetro das colônias das linhagens selvagens em diferentes concentrações de benlate.

() $\mu\text{g/ml}$	22342	11382	22343	10864
0,0	1,97	1,97	1,2	2,3
0,3	1,90	1,95	1,2	2,36
0,6	1,83	1,83	1,2	2,3
0,9	1,83	1,77	1,2	2,13
1,2	1,40	1,40	1,13	1,53
1,8	0,75	0,4	0,65	0,65
2,4	0,25	0	0,3	0,55
3,0	0	0	0	0,43
6,0	0	0	0	0,40

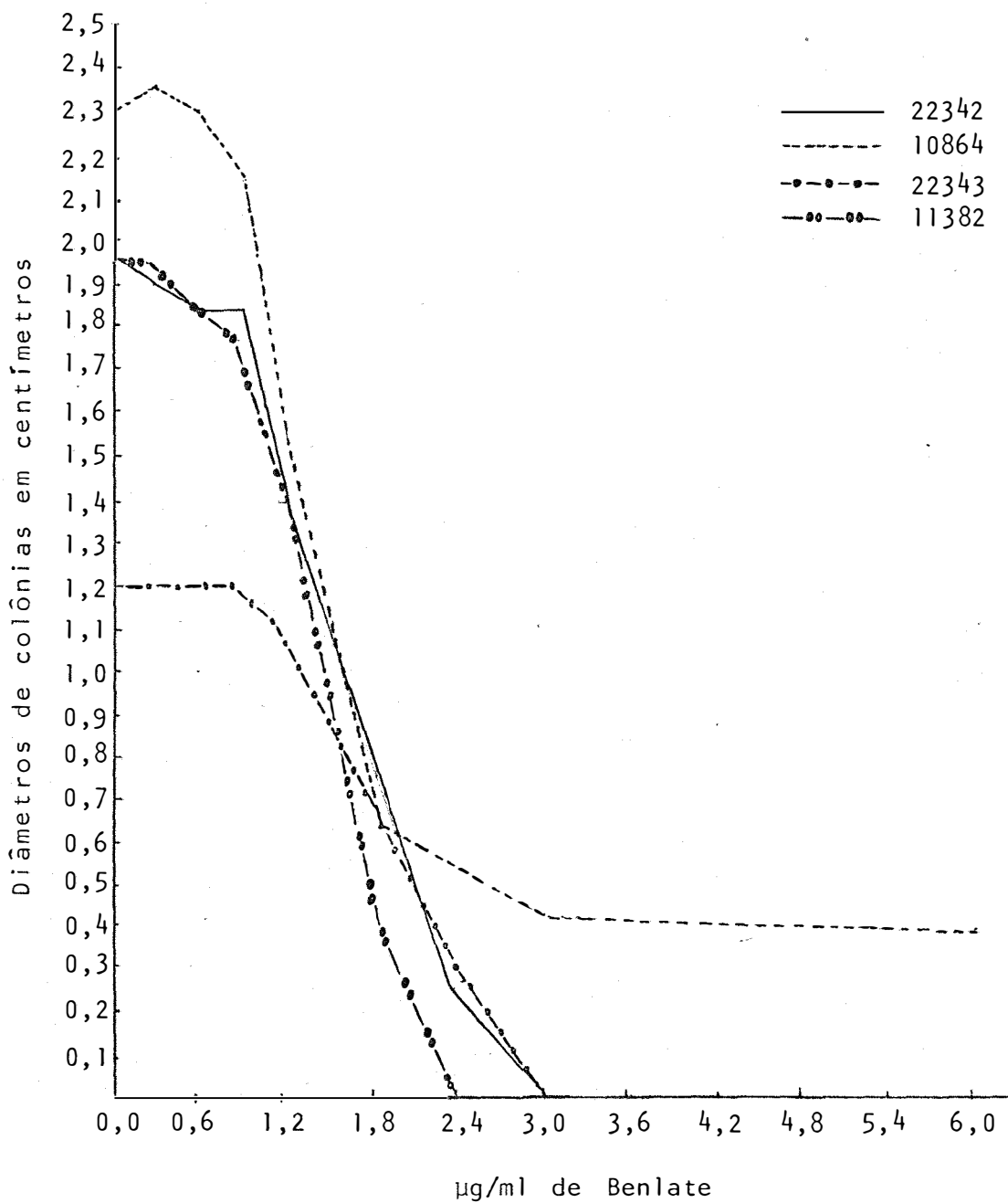


Figura 12 - Curva dose resposta ao Benlate das linhagens ATCC 22342, ATCC 22343, ATCC 11382 e ATCC 10864.

4.10. Padrão eletroforético de esterases das linhagens ATCC 22342, ATCC 10864, ATCC 11382 e ATCC 22343

O perfil eletroforético para esterases em gel de poliacrilamida das linhagens selvagens obtido segundo o item 3.7., é apresentado na Figura 13.

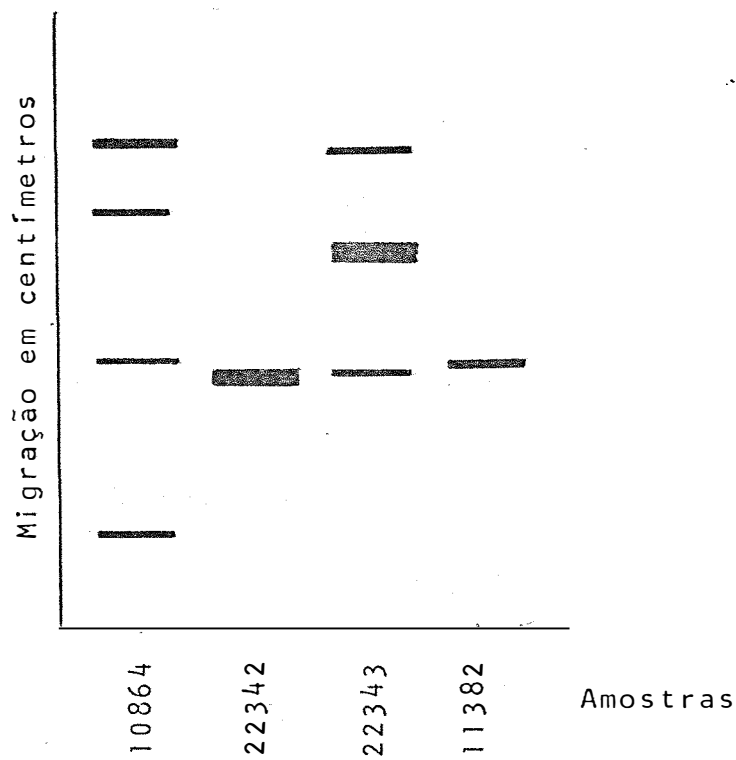


Figura 13 - Padrão eletroforético de Esterases.

4.11. Cruzamentos genéticos pela metodologia clássica

4.11.1. Obtenção de heterocários

Após obtidos os mutantes tentou-se a obtenção de heterocários conforme o método descrito no ítem 3.15.1. Utilizando-se conídios das linhagens representadas na Tabela 18, várias combinações foram feitas para os cruzamentos.

As melhores películas formadas entre os cruzamentos foram transferidas para meio mínimo e a Tabela 25 mostra o desenvolvimento dessas películas.

Tabela 25 - Desenvolvimento de películas em MM + 2% MC e após transferidas para MM sólido e, em alguns casos MM + prolina.

C r u z a m e n t o	Desenvolvimento da película em MM+2%MC	Desenvolvimento da película em MM sólido
10864 pab bio x 10864 nic ade	++	++
22342 (pro/arg) pyr x 22342 (pro/arg) met mor ₂	++	++
22342 (pro/arg) pyr x 22342 (pro/arg) ade	++	++
22343 (pro/arg) nic x 22343 (pro/arg) met	++	++
22343 (pro/arg) met x 10864 nic ade	--	--
22343 (pro/arg) met x 10864 nic mor ₂	+-	--
22343 (pro/arg) nic x 22342 (pro/arg) met mor ₂	++	+-
10864 pab bio x 22342 (pro/arg) met mor ₂	+-	--
10864 nic pyr x 22342 (pro/arg) met mor ₂	+-	--

Após crescimento dos conídios semeados em MM provenientes das películas que cresceram em MM, pode-se observar a frequência de colônias crescidas neste meio para alguns cruzamentos (heterocários e/ou diplóides) que é apresentado na Tabela 26.

4.11.2. Isolamento dos possíveis diplóides

Os possíveis diplóides dos diferentes cruzamentos foram isolados seguindo-se a metodologia descrita no ítem 3.15.2. Para a diferenciação de colônias heterocarióticas e diplóides a metodologia descrita no ítem 3.15.3. foi utilizada. Os possíveis diplóides foram ressuspensos em tween-80 semeados MM e MC, desta forma pode-se observar que algumas colônias originavam o mesmo número em MC e em MM (diplóides) enquanto que outras apresentavam número de colônias significativamente maior em MC. Colônias que resultaram em mesmo número de conídios germinando em MC e MM foram selecionados e então inoculados em MC e MC + pFA conforme a metodologia descrita no ítem 3.15.3.2. A Tabela 27 apresenta o número de setores originados nestes meios. As linhagens mutantes utilizadas para constituírem os possíveis diplóides, citadas na Tabela 18, foram também inoculadas em MC, de acordo com a metodologia descrita no ítem 3.15.3.2., sendo essas ausentes de setores.

Tabela 26 - Frequência de heterocárrios e/ou diplóides obtidos de alguns cruzamentos.

C r u z a m e n t o s	Nº de colô- nias em MC	Nº de colô- nias em MM	Frequência de hetero- cários e/ou diplóides em 10 ⁶ confídios
10864 pab bio X 10864 nic ade	3,8 x 10 ⁷	3,8 x 10 ¹	1
22342(pro/arg) pyro X 22342(pro/arg) met mor ₂	6,0 x 10 ⁶	2,2 x 10 ²	36
22342(pro/arg) pyr X 22342(pro/arg) ade	-	-	-
22343(pro/arg) nic X 22343(pro/arg) met	-	-	-
22343(pro/arg) nic X 22342(pro/arg) met mor ₂	6,0 x 10 ⁶	6,8 x 10 ²	113

(-) não realizado.

Tabela 27 - Média de setores obtidos em MC e MC + pFA.

D i p l ó i d e	\bar{X} de setores em MC	\bar{X} de setores em MC + pFA
10864 pab bio// 10864 nic ade	1,20	3,04
22342(pro/arg) pyr // 22342(pro/arg) met mor ₂	0,37	0,48
22342(pro/arg) pyr // 22342(pro/arg) ade	2,74	4,18
22343(pro/arg) nic// 22343(pro/arg) met	1,18	2,28
22343(pro/arg) nic// 22342(pro/arg) met mor ₂	2,19	2,96

Ainda para a comprovação da diploidia o número de núcleos por conídios foi estimado utilizando-se da metodologia descrita no ítem 3.15.3.3. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 28.

4.12. Fusão de protoplastos

Com o objetivo de se obter híbridos interespecíficos de *A. niger* linhagem ATCC 10864 e *A. awamori* linhagem ATCC 22342 a técnica de isolamento e fusão de protoplastos foi utilizada, visto que através de cruzamento pela metodologia clássica (ciclo parassexual) não foi possível a obtenção de diplóides utilizando-se as linhagens mutantes ATCC 22342 (pro/arg) met mor₂ e ATCC 10864 nic ade como parentais. Através da metodologia descrita no ítem 3.16., obteve-se protoplastos das referidas linhagens. A Tabela 29 mostra o número de protoplastos obtidos de cada linhagem, através da estimativa em câmara de Neubauer e o número de colônias resultante da semeadura em MC e MC KCl para ambas as linhagens.

Tabela 28 - Percentagens de confídios uni, bi, tri e tetranucleados dos prováveis diploides.

D i p l ó i d e	Porcentagens de confídios			
	Uninu- cleados	Binu- cleados	Trinu- cleados	Tetra- nuclea- dos
10864 pab bio// 10864 nic ade	59,33	40,67	0,00	0,00
22342(pro/arg) pyr // 22342(pro/arg) met mor	75,00	25,00	0,00	0,00
22342(pro/arg) pyr // 22342(pro/arg) ade	77,32	20,80	1,55	0,33
22343(pro/arg) nic// 22343(pro/arg) met	53,00	40,33	5,33	1,34
22343(pro/arg) nic// 22342(pro/arg) met mor ₂	53,33	44,33	1,67	0,67

Tabela 29 - Número de protoplastos estimados em câmara de Neubauer e número de colônias/ml crescidos em MC e MC KCl.

L i n h a g e n s	Nº de protoplastos estimado em câmara de Neubauer	Nº de colônias/ml em MC	Nº de colônias/ml em MC KCl
ATCC 22342 (pro/arg) met mor ₂	1,84 x 10 ⁵	1,72 x 10 ²	4,0 x 10 ⁵
ATCC 10864 nic ade	5,44 x 10 ⁶	0,13 x 10 ¹	5,2 x 10 ⁵

A metodologia descrita no ítem 3.19. foi utilizada para se obter a frequência de reversão dos marcadores genéticos dos protoplastos obtidos, e para ambas as linhagens a frequência de reversão dos protoplastos foi menor que 1.

A fusão de protoplastos foi realizada utilizando-se a metodologia descrita no ítem 3.17., e o número de colônias crescidas em MC KCl e MM KCl é apresentado na Tabela 30.

Tabela 30 - Média do número de colônias crescidas após fusão de protoplastos em MC KCl e em MM KCl.

C r u z a m e n t o	Média do número de colônias em MC KCl	Média do número de colônias em MM KCl
22342(pro/arg) met mor ₂ X 10864 nic ade	*6,0 x 10 ⁵	5 x 10 ⁻¹

*92,86% das colônias crescidas no MC KCl é da linhagem 22342(pro/arg) met mor₂.

4.13. Teste da produção de enzimas amilolíticas em placas para os diplóides obtidos

Seguindo-se a metodologia descrita no ítem 3.11., obteve-se o diâmetro das colônias, e o diâmetro das colônias mais os halos de degradação do amido, e desta forma pode-se calcular a relação colônia + halo/colônia dos diplóides obtidos. (Tabela 31).

Tabela 31 - Média do diâmetro em centímetro das colônias, colônia + halo e relação colônia + halo/colônia dos diplóides obtidos.

D i p l ó i d e	Diâmetro das colônias	Diâmetro halo + colônia	$\frac{\text{Halo} + \text{colônia}}{\text{colônia}}$
22342 pro/pyr // 22343 pro met mor ₂	2,20	4,36	1,98
22342 pro ade// 22342 pro pyr	2,26	4,24	1,87
22343 pro nic// 22343 pro met	2,00	4,60	2,30
22342 pro met mor ₂ // 22343 pro nic	1,52	4,14	2,72
10864 nic ade// pab bio	-	-	-

(-) não realizado.

5. DISCUSSÃO

5.1. Aspectos citológicos e indução de mutação

No que diz respeito ao melhoramento de *Aspergillus* pertencentes ao grupo niger para produção industrial de substâncias exógenas, um dos aspectos de interesse tem sido a instabilidade de linhagens. Entre os vários fatores que devem estar envolvidos nessa instabilidade, pode-se relacionar a formação de conídios com mais de um núcleo, que normalmente ocorrem nas espécies desse grupo. Desse modo, a instabilidade poderia estar associada a fenômenos de heterocariose, admitindo-se formação de conídios com mais de um núcleo homo ou heterocarióticos. Neste sentido o estudo do número de núcleos por conídio nestes *Aspergillus* poderia ter implicações no melhoramento destes, além do seu grande valor como técnica auxiliar nos estudos genéticos.

Através da análise da proporção de conídios binucleados em 34 linhagens de *A. niger*, BARACHO e COELHO (1978)

observaram diferenças significativas entre linhagens, quanto à produção de conídios binucleados, sendo encontrado de 17 a 80% desse tipo de conídio entre as linhagens analisadas. Os mesmos autores relataram que em alguns casos essa variabilidade não parecia decorrer de uma condição genética das linhagens, mas seria decorrente do processo empregado na manutenção da linhagem ou ser consequência das diferentes idades dos conídios examinados.

No presente trabalho, diferenças no número de núcleos por conídio foram também observadas para as linhagens de *A. niger* e *A. awamori* analisadas (Tabela 1), sendo que na linhagem de *A. niger* ATCC 22343 observaram-se conídios uni, bi, tri e tetranucleados, enquanto que para a linhagem ATCC 10864 somente conídios uni e binucleados foram encontrados. O mesmo foi observado para *A. awamori* onde a linhagem ATCC 22342 apresentou conídios com um, dois, três e até quatro núcleos, enquanto que para a linhagem ATCC 11382 somente conídios com um e dois núcleos foram encontrados. Pode-se também verificar pelos dados dessa Tabela que entre as linhagens de *A. awamori* ocorre grande diferença na frequência de conídios uni e binucleados, enquanto que para as linhagens de *A. niger* esta diferença foi menos acentuada. Sendo as condições utilizadas idênticas para todas as linhagens pode-se inferir que estas são características da própria linhagem.

O diâmetro dos núcleos e conídios uni, bi, tri e tetranucleados das linhagens selvagens foram medidos (Tabela 2). Das mensurações efetuadas, pode-se observar que nas quatro linhagens o diâmetro dos conídios aumenta proporcionalmente com o aumento do número de núcleos por conídio. Neste sentido os dados obtidos diferiram dos apresentados por ROSIM *et alii* (1977) para 3 linhagens mutantes de *A. niger*, onde o diâmetro dos conídios uninucleados foram os mesmos dos conídios binucleados. Com relação aos núcleos, não foram observadas diferenças entre o diâmetro e o número de núcleos por conídio, compatível com os resultados de ROSIM *et alii* (1977), indicando que núcleos dos conídios binucleados e uninucleados tem as mesmas dimensões.

O estabelecimento de curvas de sobrevivência utilizando-se radiação gama ^{60}Co (Tabelas 3, 4 e 5 e Figuras 1, 2 e 3) e luz ultravioleta (Tabelas 6 e 7 e Figuras 4 e 5), possibilitou verificar diferenças entre as espécies e entre linhagens da mesma espécie quanto a sensibilidade para as doses utilizadas, bem como a escolha da dose adequada para a obtenção de mutantes. Para o *A. awamóri* linhagem ATCC 22342 e *A. niger* linhagem ATCC 22343 observou-se que a dose de 60 krad de radiação gama ^{60}Co permitiu a sobrevivência de 3,306% e 4,58%, respectivamente, enquanto que para a linhagem ATCC 10864 de *A. niger* a dose de 40 krad foi a que permitiu 3,49%

de conídios sobreviventes. Utilizando-se luz ultravioleta verificou-se que a dose de $1.872 \text{ J/m}^2/\text{s}$ que corresponde a 20 minutos de irradiação na fonte usada, permite 6,23% de conídios sobreviventes para a linhagem ATCC 22342 de *A. awamori* e, para a linhagem ATCC 11382 esta mesma dose de irradiação permitiu somente 0,160% de sobrevivência. Para outras duas linhagens de *A. awamori*, IZ 1066 e IZ 1887, obtidas da micoteca do Instituto Zimotécnico, ESALQ/USP, as doses de 40 e 60 Krad de radiação gama permitiu melhor percentagem de sobrevivência para a obtenção de mutantes (FUNGARO e PIZZIRANI-KLEINER, 1983).

Devido a variação observada quanto a sobrevivência das linhagens aos mutagênicos usados e quanto a frequência dos tipos de conídios formados, procurou-se relacionar essas duas características. As relações, média do número de núcleos por conídio com doses de irradiação, estão mostradas nas Tabelas 8 e 9 para radiação gama e para luz ultravioleta, respectivamente. Para os dois mutagênicos, a relação encontrada sugere que quanto maior a média do número de núcleos por conídio, menor será a sensibilidade ao mutagênico. Tal observação pode ser atribuída ao fato de mutações letais em um núcleo de conídios multinucleados serem mascarados pelo alelo selvagem do(s) outro(s) núcleo(s), diminuindo a sensibilidade à irradiação, possibilitando maior sobrevivência.

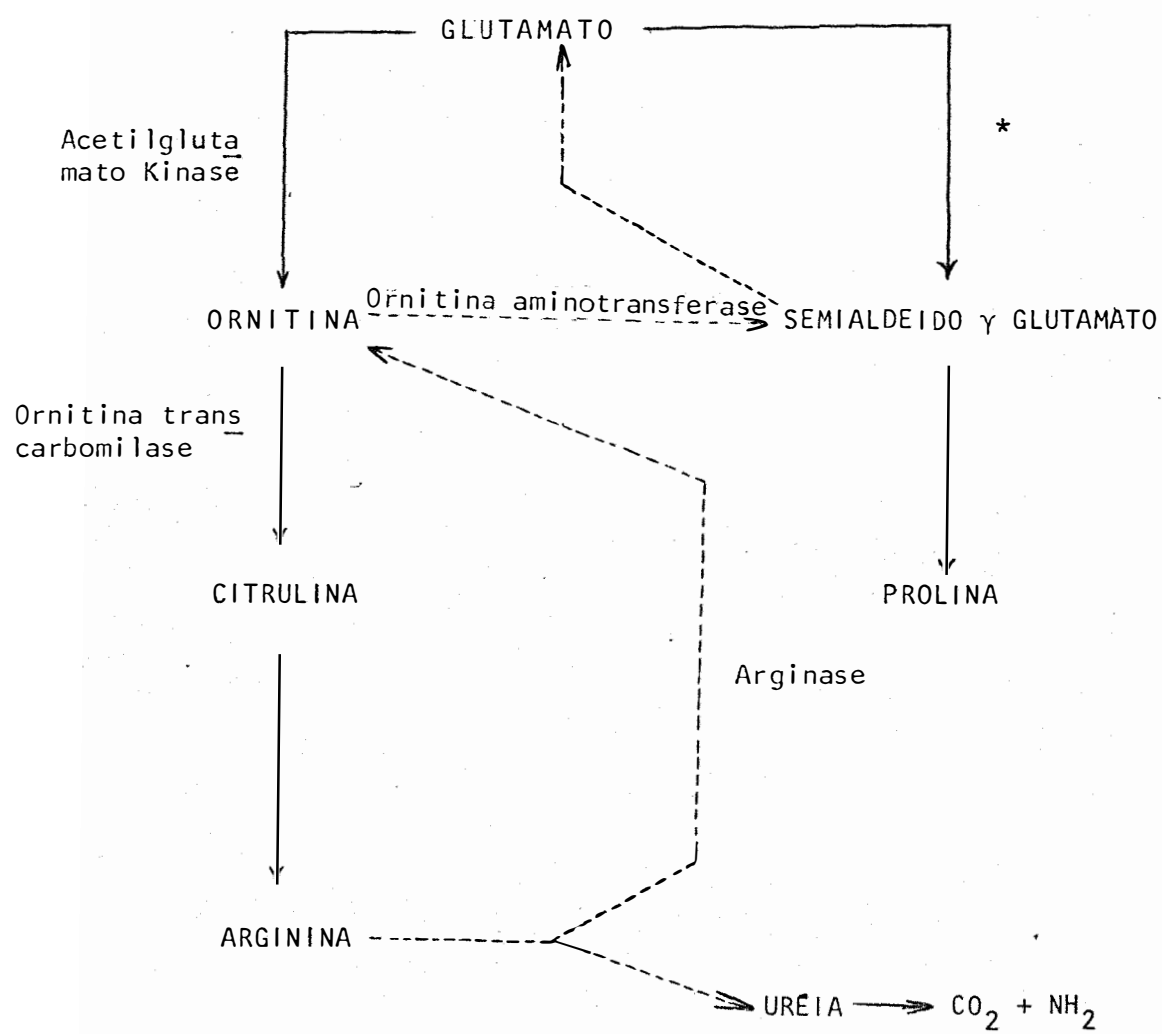
5.2. Heterocariose nas linhagens de *A. awamori* ATCC 22342 e *A. niger* ATCC 22343

Verificou-se que conídios das linhagens ATCC 22342 e ATCC 22343 de *A. awamori* e *A. niger*, respectivamente, quando semeados em MM e MC segundo o ítem 3.9. apresentaram menor número de colônias em MM do que em MC (Tabelas 10). Alguns conídios deveriam ser então auxotróficos e outros prototróficos sugerindo dessa forma uma possível heterocariose das linhagens para algum(s) requisito(s) que impossibilitava certos conídios de se desenvolverem em MM mas que em MC, cresciam normalmente. Assim, os resultados aqui apresentados (ítem 4.4.1.) sugerem que além da presença de mais de um núcleo por conídio estes devem, eventualmente, estar em condição heterocariótica, balanceando prototrofia/auxotrofia para os aminoácidos prolina ou arginina. Dentro desse contexto, VIALTA e BARACHO (1984) observaram em *A. awamori* NRRL 3112, segregação espontânea de conídios mutantes para a síntese de prolina e arginina na frequência de 1,3 a 9,6%, atribuindo-a também, a presença de heterocariose. Entretanto devido a presença de conídios em diferentes condições de proto-auxotrofia na mesma colônia, a percentagem de heterocariose detectável deve variar com o número de repicagens que a linhagem original sofreu até o momento do experimento, sendo portanto não inferida no presente trabalho. Em condições de laboratório, fungos

do gênero *Aspergillus* que formam conídios binucleados ou multinucleados produzem conídios heterocarióticos em heterocarios como *A. oryzae* e *A. sojae* (ISHITANI *et alii*, 1956), *A. niger* (CHANG *et alii*, 1974) e *A. nidulans* (PIZZIRANI-KLEINER, 1981).

Utilizando-se dos isolados (pro/arg)⁻, através da medida do diâmetro das colônias nos diversos meios suplementados com as substâncias intermediárias da biossíntese da arginina e da prolina, pode-se supor o local de ocorrência do bloqueio metabólico na via biossintética destes aminoácidos. Os resultados apresentados na Tabela II revelaram a incapacidade das colônias (pro/arg)⁻, tanto para a linhagem ATCC 22343, como para a linhagem ATCC 22342, crescerem normalmente em MM e MM suplementado separadamente com glutamina, Ácido glutâmico e citrulina e, a capacidade de crescimento nos meios suplementados com prolina, arginina e ornitina.

Nesse particular, no esquema metabólico estabelecido para *Neurospora crassa*, a arginina é sintetizada a partir do glutamato via citrulina e ornitina. A degradação da arginina a glutamato ocorre via ornitina e semialdeido γ glutamato. Sendo que este último é um intermediário biossintético na via da síntese de prolina. Esta relação metabólica é apresentada no esquema a seguir.



*Bloqueio sugerido.

— Via normal.

----- Via alternativa.

A síntese de arginina a partir de glutamato cessa na presença de arginina exógena, devido a inibição da enzima acetilglutamato Kinase. Uma linhagem mutante de *Neurospora crassa* (mutante pro-3) incapaz de sintetizar semialdeído γ glutamato a partir de glutamato foi obtido e, observado que a fonte alternativa para formação de prolina foi a ornitina. Esta via catabólica normalmente opera somente na presença de ornitina ou arginina exógena (WEISS e LEE, 1980).

Através dos resultados obtidos supõe-se que o bloqueio metabólico nas linhagens ATCC 22342 (pro/arg)⁻ e ATCC 22343 (pro/arg)⁻ está na passagem de glutamato para semialdeído γ glutamato, pois estes foram incapazes de crescer em MM suplementado com glutamina e ácido glutâmico, sugerindo que o bloqueio ocorra após a formação destes. Por outro lado, quando prolina é adicionada ao meio, observa-se crescimento, pois nesta hipótese sugerida ela é o produto final da via bloqueada. A arginina quando adicionada ao meio seria convertida através da enzima arginase em ornitina e, esta por sua vez, seria convertida em semialdeído γ glutamato através da via alternativa mediada pela enzima ornitina aminotransferase. Maior viabilização desta hipótese foi verificado quando o MM foi suplementado com ornitina, onde houve crescimento das linhagens, embora o diâmetro das colônias neste meio tenha sido menor que quando comparado ao suplementado com prolina ou arginina.

Sugere-se que o menor tamanho da colônia em meio com ornitina, quando comparado com prolina e arginina, seja porque quando se adiciona ornitina esta tenha que ser convertida em arginina antes de fazer uso da via alternativa. Desse modo somente quando a arginina estiver em excesso haverá bloqueio da enzima ornitina transcarbamilase e então a ornitina será convertida em glutamato γ semialdeído. A Tabela 13 mostra o diâmetro das colônias em meio suplementado com prolina, arginina e ornitina tomados em diferentes tempos. Os dados contidos nessa Tabela demonstraram uma tendência do diâmetro das colônias de aumentar de acordo com o aumento do período de incubação e de se igualarem nos três meios, favorecendo desta maneira a hipótese sugerida acima.

Uma segunda alternativa para justificar as diferenças de crescimento nos meios com prolina, arginina e ornitina, seria a dificuldade de penetração da ornitina na célula.

Quanto ao não crescimento das colônias em meio suplementado com citrulina a exemplo do encontrado para 24 mutantes de *A. nidulans* que requeriam arginina (PONTECORVO *et alii*, 1953b), não se pode inferir se a citrulina exôgena não é utilizada pela célula ou se não faz parte da via metabólica.

Para melhor esclarecimento deste fenômeno, a

obtenção de vários mutantes para síntese de prolina e arginina, bem como a análise bioquímica das linhagens seria de grande valia.

5.3. Obtenção de mutantes

Após irradiação de conídios das linhagens de *A. niger* ATCC 10864 selvagem e da linhagem ATCC 22343 (pro/arg)⁻ obtiveram-se mutantes auxotróficos e morfológicos. Para a linhagem ATCC 10864 foram obtidos mutantes nutricionais deficientes para vitaminas e ácidos nucleicos, enquanto que para a linhagem ATCC 22343 obtiveram-se mutantes para vitaminas e aminoácidos.

Irradiando-se conídios da linhagem de *A. awamori* ATCC 22342 (pro/arg)⁻ com luz ultravioleta e procedendo-se seleção pelo método de isolamento total, verificou-se 0,075% de mutantes auxotróficos, demonstrando uma baixa eficiência deste mutagênico para esta linhagem quando comparada com *A. nidulans* onde foi encontrado 0,5% de mutantes auxotróficos (PONTECORVO *et alii*, 1953b). Entretanto, estes resultados são compatíveis uma vez que em *A. nidulans* os conídios são uninucleados, e na linhagem de *A. awamori* utilizada foram encontrados conídios uni, bi, tri e tetranucleados. Em *A. flavus* que é portador de conídios uni, bi, tri e tetranucleados,

a frequência de mutantes auxotróficos encontrados foi também menor que em *A. nidulans* (MESSIAS, 1977).

A técnica de isolamento de mutantes auxotróficos por enriquecimento pelo método de filtração (FRIES, 1947) permitiu em *A. awamori*, pelo presente trabalho (Tabelas 14 e 15), aumento da frequência de obtenção de mutantes auxotróficos de 0,075% para 3,076%, a exemplo do obtido por (SILVEIRA e AZEVEDO, 1984) em *Metarhizium anisopliae* onde a frequência de mutantes auxotróficos foi aumentada de 0,01% para 6,13%.

Verifica-se pela Tabela 16 e Figura 6, que o tempo de 24 horas de incubação dos conídios irradiados pelo método de filtração proporcionou maior frequência de mutantes auxotróficos. A determinação do referido tempo (24 hs) foi feita pela técnica da réplica individual de colônias do MC para o MM para os diferentes tempos de incubação com obtenção das respectivas porcentagens. Tal determinação poderia ser mais eficientemente obtida através do uso de uma marca morfológica associada a marca auxotrófica.

Assim, tendo em vista a grande importância da determinação exata do melhor tempo de incubação sugere-se que agora, de posse de mutantes com marcas morfológicas e nutricionais, obtidos neste trabalho, como demonstrado na Figura 7, o experimento seja novamente conduzido, inclusive testando-se um maior número de períodos de incubação, a fim de que

esta técnica seja aperfeiçoada para obtenção de maior número de mutantes nesta espécie.

Através deste método, mutantes auxotróficos para aminoácidos e ácidos nucleicos foram obtidos, porém mutantes com deficiência nutricional para vitaminas não foram obtidos no presente trabalho. Nesse particular SILVEIRA e AZEVEDO (1984), referiram-se à ineficiência do método de filtração para obtenção de mutantes deficientes para vitaminas. Um resumo das etapas seguidas para a obtenção dos mutantes das linhagens aqui utilizadas, estão descritas nas Figuras 7, 8 e 9. Alguns desses mutantes (Tabelas 17 e 18) foram selecionados para os próximos passos e nesses, o teste de reversão de mutações foi efetuado (Tabela 17), mostrando que se tratam de marcadores genéticos bastante estáveis, pois as frequências de reversão foram sempre menores que um em 10^6 células.

5.4. Produção de enzimas amilolíticas e outras características das linhagens

A relação do diâmetro colônia + halo/colônia vem sendo usada como uma maneira de seleção prévia de mutantes para maior produção de substâncias exógenas, tais como ácido cítrico e enzimas amilolíticas.

GARDNER *et alii* (1956) comparou a produção de ácido cí

trico em *A. niger*, através da relação entre o índice obtido por medições em placa e a produção de ácido cítrico em meios de fermentação. Para este caso, não foi encontrado correlação que indicasse restrição do método de seleção em placa de linhagem mais produtoras.

Para as enzimas amilolíticas, a produção foi determinada através dos índices de diâmetro de colônia mais diâmetro de halo/diâmetro de colônia. Na avaliação das quatro linhagens originais (Tabela 19), a linhagem ATCC 22342 de *A. awamori* mostrou ser mais promissora na produção dessas enzimas (índice = 1,72) em relação as outras três avaliadas, em bora a linhagem ATCC 22343 de *A. niger* também tenha se mostrado bastante eficiente (índice = 1,58). Os mutantes auxotróficos originados dessas duas linhagens, quando avaliados quanto a produção de enzimas amilolíticas (Tabela 20) mostraram que tanto os mutantes auxotróficos de *A. awamori* como os de *A. niger* não apresentaram variações significativas quanto a produção em relação as linhagens selvagens.

Os diplóides obtidos nos cruzamentos foram ava liados e, pode-se verificar que em todos os casos a produção do mesmo foi superior às linhagens selvagens bem como aos mutantes que lhes deram origem, sendo o diplóide interespecífico de *A. niger* ATCC 22343 e *A. awamori* ATCC 22342 o de maior índice (Tabela 31). Apesar destes resultados serem compatíveis aos de

VALENT e BONATELLI (1983), onde observaram que em *A. niger* os diplóides produziram significativamente mais enzima (amiloglucosidase) que as linhagens haplóides, prefere-se não inferir que a dosagem gênica esteja influenciando na produção, pois o procedimento de uma metodologia mais específica para a dosagem enzimática seria aconselhável.

Dentro do aspecto da repressão catabólica das enzimas amilolíticas (Tabelas 21, 22 e 23), verifica-se que as linhagens ATCC 10864, ATCC 11382 e ATCC 22343 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando as médias dos índices em meio mínimo de amido com 0, 5, 1,0, 1,5% de glicose foram comparadas, sugerindo que estas linhagens não são reprimidas catabolicamente pela glicose. Para a linhagem ATCC 22342 as médias diferiram significativamente, observando-se inclusive, aumentos dos índices em relação ao aumento da concentração de glicose no meio. Nesse particular, há de se considerar que a linhagem utilizada é heterocariótica, produzindo frequentemente conídios auxotróficos para prolina. Assim dependendo do grau de heterocariose do inóculo, prolina deveria ser absorvida para crescimento normal da colônia, a qual poderia estar apresentando utilização dificultada em concentrações mais elevadas de glicose, resultando, experimentalmente, em menor diâmetro de colônias (Tabela 21).

Além da produção das enzimas amilolíticas ou-

tras características das linhagens de *A. awamori* e *A. niger* foram consideradas. Entre essas, o comportamento das linhagens frente a adição de quantidades crescentes de benlate no meio de cultura (Tabela 24, Figura 12). Nesse caso pode ser observado que as quatro linhagens originais diferem quanto aos seus níveis de sensibilidade a esse fungicida, com exceção das linhagens ATCC 22342 e ATCC 22343 onde o crescimento de ambas é inibido com 3 µg/ml de benlate no meio. Essa observação, acrescentada as anteriores discutidas como presença de conídios uni, bi, tri e tetranucleados, heterocariose e produção de enzimas, revela que as linhagens ATCC 22342 e ATCC 22343 são muito semelhantes, apesar de serem de espécies diferentes. Isso nos levou a traçar o perfil eletroforético de estas para as linhagens (Figura 13). Pelo padrão resultante, as quatro linhagens mostraram ser distintas, inclusive a ATCC 22342 que apresentou apenas uma banda espessa e, na mesma posição, a ATCC 22343 apresentou uma banda estreita e ainda duas outras bandas em posições diferentes.

As duas linhagens em questão são espécies distintas como catalogadas pelo ATCC e, de acordo com os parâmetros aqui considerados, são muito semelhantes geneticamente desde que ambas foram sujeitas as mesmas variações ambientais em todas essas características analisadas. Vale ainda ressaltar que são fenotipicamente diferentes quanto a textura da colônia (Figura 10).

5.5. Obtenção de diplóides

O primeiro passo para a formação de diplóides em fungos haplóides é o estabelecimento de um heterocário pela fusão de hifas com núcleos geneticamente diferentes. No presente trabalho, o estabelecimento de heterocários entre os mutantes selecionados foram, tentativamente, realizados considerando cruzamentos intra e interespecíficos. Das tentativas de obtenção de heterocários balanceados, listados na Tabela 25, o desenvolvimento da película heterocariótica foi possível para todas as combinações exceto quando a linhagem de *A. niger* ATCC 10864 foi cruzada com a linhagem de *A. niger* ATCC 22343 e, também quando cruzada com *A. awamori* ATCC 22342, que resultaram em películas finas ou ausentes. A transferência das películas desenvolvidas para MM (alguns casos acrescido de prolina) produziram crescimento, exceto as películas finas acima referidas que não produziram crescimento. Uma outra particularidade foi que a película desenvolvida em MM + 2% de MC resultante do cruzamento de ATCC 22342 com ATCC 22343 resultou crescimento em MM + prolina, porém não vigoroso.

A fusão de hifas e habilidade de formar heterocários são determinados pelo grau de similaridade dos genomas das linhagens envolvidas, sendo que dentro de uma mesma espécie encontram-se linhagens compatíveis e linhagens incompatíveis para formação de heterocários. Em algumas espécies, a

incompatibilidade é bem estabelecida como em *Neurospora crassa* e *Podospora anserina* sendo também demonstrada em *A. nidulans* (FINCHAN *et alii*, 1979). Nesse particular os resultados mostraram ser as linhagens ATCC 22343 e ATCC 10864 incompatíveis.

A formação de heterocários interespecíficos das linhagens de *A. niger* ATCC 10864 com *A. awamori* ATCC 22342 não foi possível, entretanto, pode-se observar a formação de heterocários entre as linhagens de *A. niger* ATCC 22343 com a linhagem de *A. awamori* ATCC 22342. Como discutido anteriormente (ítem 5.4.), as duas últimas linhagens citadas pertencem ao grupo niger mas, são de espécies diferentes e, no entanto, apresentam propriedades e características comuns. A formação de heterocários aqui demonstrada, confirma o alto grau de similaridade genética entre elas.

Para alguns dos cruzamentos foi determinado a frequência de heterocários e/ou diplóides obtidos em MM ou MM + prolina (Tabela 26), sendo encontrado frequência de 1 em 10^6 para o cruzamento intra linhagem ATCC 10864, no cruzamento intralinhagem de *A. awamori* ATCC 22342 a frequência obtida foi de 36 em 10^6 conídios, enquanto que no cruzamento interespecífico de *A. niger* linhagens ATCC 22343 com *A. awamori* ATCC 22342 a frequência obtida foi de 113 em 10^6 conídios. As frequências de heterocários e/ou diplóides formados podem ser relacionados com as frequências dos tipos de conídios produzidos

pelas linhagens. No primeiro caso, a linhagem ATCC 10864 forma somente conídios uni (34,8%) e binucleados (65,2%) e apresentou menor frequência na formação de heterocários. Com a linhagem ATCC 22342 a frequência de heterocários foi maior e esta linhagem produz mais conídios binucleados (71,6%) além de tri e tetranucleados. No terceiro cruzamento, a frequência de heterocários foi superior pois envolveu linhagens onde ambas produzem conídios uni, bi, tri e tetranucleados. Essa mesma relação entre a frequência de heterocários e porcentagens de conídios com mais de um núcleo, já foi verificada para *A. nidulans* (PIZZIRANI-KLEINER, 1981), a qual foi comparada com as frequências obtidas para *A. niger* por CHANG e col. (1974).

Sendo esses fungos multinucleados, núcleos de constituição gênica diferente em um mesmo conídio (conídio heterocariótico) permitiria sua germinação e crescimento em MM. A distinção de colônias heterocarióticas de diplóides foi efetuada semeando-se conídios em MC e MM. No caso das colônias heterocarióticas, foi obtido em MM um número reduzido de colônias quando comparado com o número obtido em MC, visto que os conídios heterocarióticos para os marcadores genéticos utilizados nos cruzamentos segregam havendo possibilidade de aparecimento de conídios uninucleados ou multinucleados com a deficiência nutricional de uma ou de outra linhagem utilizada como parental e, estes são incapazes de crescerem em MM, enquanto

que em colônias diplóides espera-se o mesmo número de colônias em MM e MC. Desta forma, os diplóides foram selecionados e submetidos à análise do número de núcleos por conídios. Através da Tabela 28 observa-se que em todos os diplóides houve aumento na percentagem de conídios uninucleados com consequente diminuição de conídios binucleados em relação aos haplóides selvagens. Em alguns casos esta diferença foi bastante acentuada, tal como no cruzamento de *A. awamori* intralinhagem onde a selvagem apresentou 71,6% de conídios binucleados e nos dois diplóides obtidos a frequência de conídios binucleados foi de 25% em um dos casos e 20,8% no outro. Entretanto nos cruzamentos envolvendo *A. niger*, a diferença de percentagem entre conídios binucleados entre linhagens haplóides e diplóides não foram tão discrepantes quanto para *A. awamori*. Estudos em outras espécies de *Aspergillus* demonstraram também que a condição diplóide, normalmente reduz o número de conídios com mais de um núcleo em comparação com as linhagens haplóides como em *A. flavus* (PAPA, 1973, MESSIAS, 1977), *Aspergillus* sp 321 (PEREIRA, 1978) e *A. nidulans* (PIZZIRANI-KLEINER, 1981). Em *A. niger*, ocorre também redução de conídios com mais de um núcleo em diplóides (AZEVEDO e BONATELLI JR., 1981) e, para outras linhagens é descrito haver aumento de conídios binucleados em diplóides (CHANG *et alii*, 1974).

Para se ter idéia da estabilidade destes diplóides, bem como obter setores recombinantes, estes foram ino

culados em MC e MC acrescido de pFA (Tabela 27). Observou-se que em todos os casos o pFA aumentou o número de setores. Em um dos diplóides de *A. awamori*, 22342(pro/arg) pyr // 22342(pro/arg) ade, o número de setores em meio completo como em MC com pFA foi superior enquanto que, no diplóide 22342(pro/arg)pyr // 22342(pro/arg) met mor₂ o número de setores foi significativamente menor tanto em MC como em MC + pFA. Neste caso, podemos supor que o marcador morfológico (mor₂) de uma das linhagens, tenha algum efeito sobre os diplóides de modo a reduzir sua instabilidade. Esse efeito no entanto, não é tão acentuado quando a linhagem portadora de mor₂ constitui diplóides com linhagens de outras espécies como é o caso do diplóide 22342 (pro/arg) met mor₂// 22343 (pro/arg) nic. Redução da instabilidade de diplóides pela presença de fatores genéticos são descritos em *A. nidulans* (AZEVEDO, 1975; PIZZIRANI-KLEINER, 1981). A variação na instabilidade dos diplóides obtidos pode, por outro lado, estar sendo influenciada por aberrações cromossômicas induzidas em algumas das linhagens envolvidas nos cruzamentos, formando dessa maneira diplóides não balanceados, mas que no presente estudo não foram detectadas. Aberrações cromossômicas como duplicações cromossômicas, alteram a instabilidade de diplóides em relação a diplóides livres de duplicações (CASE e ROPER, 1975; PIZZIRANI-KLEINER, 1981; OLIVEIRA, 1982).

O ciclo parassexual (PONTECORVO e ROPER, 1952) é basicamente caracterizado por heterocariose, formação de di-

plóide, permuta mitótica e haploidização. Apesar de não ter sido ainda observado o ciclo parassexual em *A. awamori* a obtenção de heterocários e diplóides neste trabalho, constitui uma forte evidência da parassexualidade nesta espécie, embora para tal afirmação um grande número de setores originados dos diplóides deverão ser avaliados, visto que um pequeno número destes setores foram analisados, não tendo sido no entanto identificado nenhum setor recombinante, sendo todos prototróficos. Sugere-se também que um maior número de mutantes sejam obtidos a fim de que mais cruzamentos sejam efetuados.

5.6. Fusão de protoplastos

Tendo em vista a não obtenção de diplóides interespecíficos entre as linhagens ATCC 10864 de *A. niger* e ATCC 22342 de *A. awamori* através do ciclo parassexual, tentativamente utilizou-se a técnica de isolamento e fusão de protoplastos. Inicialmente, se fez a obtenção dos protoplastos, e estimou-se o seu número em câmara de Neubauer, para ambas as linhagens (Tabela 29). As suspensões de protoplastos foram semeadas ("pour plate") em MCKCl e MC com o objetivo de estimar o número de protoplastos regenerados, através da diferença do número de colônias crescidas em MC KCl, no qual se desenvolvem protoplastos, conídios e hifas, e no MC onde protoplastos são incapazes de crescerem. Através dessa determinação, no-

tou-se grande diferença entre o número de protoplastos estimada em câmara de Neubauer e o número de protoplastos realmente capazes de se regenerarem. Nos protoplastos, adicionalmente, se determinou a frequência de reversão a fim de se ter certeza sobre a estabilidade dos marcadores genéticos e, em todos eles, obteve-se frequência menor que 1 (Tabela 17).

Após procedimento de fusão, a semeadura em MC KCl demonstrou $6,0 \times 10^5$ colônias/ml enquanto que em MM KCl, obteve-se $5,0 \times 10^{-1}$ colônias/ml (Tabela 30). A eficiência do método aqui empregado foi muito baixa, o que nos levou a considerar a influência de alguns fatores no processo. Um dos aspectos seria o número de protoplastos utilizados para a fusão, que foi relativamente pequeno. Um segundo fator se refere ao pequeno número de colônias obtidas em MC KCl, visto que cerca de 10^6 protoplastos de cada linhagem foram misturados. Este seria talvez devido a baixa capacidade de regeneração como já mencionado acima. Um terceiro aspecto a considerar se refere ao agente fusogênico utilizado, PEG, que no caso estaria exercendo um efeito tóxico maior sobre uma das linhagens, na ATCC 10864 de *A. niger*. No MC KCl esta linhagem parece estar sofrendo algum tipo de seleção contrária, pois das colônias crescidas, 92,86% foram colônias da linhagem ATCC 22342 (pro/arg) met mor₂. As hipóteses aqui levantadas poderão ser avaliadas melhorando o rendimento na obtenção e na regeneração de proto

plastos e aperfeiçoando as técnicas para a fusão. Para a manutenção da integridade dos protoplastos, estabilizadores osmóticos são utilizados, sendo a natureza e a concentração de estabilizador fatores importantes que influenciam a obtenção dos mesmos (PEBERDY, 1979). Desta forma sugere-se o uso de outros estabilizadores osmóticos, tais como Sorbitol, Manitol, $MgCl_2$, $CaCl_2$, para tentativamente aumentar a eficiência de protoplastização. Sugere-se ainda o emprego de outras linhagens mutantes; a utilização do mesmo mutante mas resistente ao PEG (AZEVEDO, J.L., comunicação pessoal) ou também o emprego de outros métodos para fusão como os de eletrofusão (ZIMMERMANN e VIENKEN, 1982). O aperfeiçoamento desta metodologia levaria ao produto de fusão entre *A. awamori* e *A. niger* de um modo mais eficiente do que aquele aqui obtido, se tornando em uma alternativa para estudos genéticos e de melhoramento da produção de enzimas amilolíticas nessas espécies.

6. CONCLUSÕES

A caracterização citológica e genética das linhagens amilolíticas ATCC 22342 e ATCC 11382 de *A. awamori* e ATCC 22343 e ATCC 10864 de *A. niger*, permitiu concluir:

a) As linhagens estudadas possuem variação quanto as frequências dos tipos de conídios uni, bi, tri ou tetranucleados, sendo que as linhagens ATCC 11382 e ATCC 10864 formam somente conídios uni e binucleados.

b) Cada uma das linhagens apresenta um perfil eletroforético distinto para esterases.

c) Entre as linhagens ocorre variação quanto as sobrevivências aos mutagênicos radiação gama e luz ultravioleta, as quais podem ser correlacionadas com o número de núcleos presentes nos conídios.

d) As linhagens ATCC 22342 de *A. awamori* e ATCC 22343 de *A. niger* são heterocarióticas para prolina ou arginina. A heterocariose, no entanto, pode ser separada pela sele

ção de colônias prototróficas, auxotróficas e proto/auxotróficas. Possivelmente, a mutação pro^{-} ou arg^{-} esteja na passagem glutamato para semialdeído γ glutamato da via metabólica da síntese desses dois aminoácidos.

e) A utilização da técnica do isolamento de mutantes auxotróficos por enriquecimento pelo método da filtração, em *A. awamori*, permitiu um aumento de 0,075% para 3,076% em relação ao método do isolamento total de mutantes.

f) A produção de enzimas amilolíticas é variável entre as linhagens, sendo que a ATCC 22342 e ATCC 22343 são as mais promissoras. A produção dessas enzimas não é, possivelmente reprimida pela glicose.

g) Na formação de heterocários, há incompatibilidade entre as linhagens de *A. niger* e compatibilidade entre a linhagem ATCC 22343 de *A. niger* e ATCC 22342 de *A. awamori*.

h) Ocorre formação de diplóides entre linhagens da mesma espécie e entre as duas linhagens citadas acima (g) de *A. niger* e *A. awamori*. A instabilidade dos diplóides é aumentada com pFA e a porcentagem de conídios com mais de um núcleo é reduzida em relação as linhagens que lhes originaram.

i) É possível a formação de heterocários e diplóides em *A. awamori*.

j) É possível a fusão de protoplastos entre *A. awamori* e *A. niger*, tendo sido obtido produtos de fusão em baixa frequência, necessitando portanto um aperfeiçoamento das técnicas para esse fim.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, M.R. e C.S. DEPPE, 1977. Selection for conditional lethals: a general negative selection system for *Schizophyllum commune*. *Genetical Research*, 29:93-96.
- AUNSTRUP, K., 1977. Production of industrial enzymes. In: *Biotechnology and fungal differentiation* (Eds. J. Meyrath & J.D. Builock). pp.151-171. London, UK: Academic Press.
- AZEVEDO, J.L., 1972. O ciclo parassexual em fungos. *Revista de Microbiologia*, 3:157-168.
- 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., 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologia*, 2:3-15.

- AZEVEDO, J.C. e R. BONATELLI JR., 1982. Genetics of the overproduction of organic acids. *In: Overproduction of Microbial Products* (V. Krumphanzil *et alii*, ed.). New York, Academic Press, p.439-450.
- AZEVEDO, J.L., E.P. SANT'ANA e R. BONATELLI JR., 1977. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4 oxathin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 48:163-172.
- 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.
- BAL, J.; E. BARTNIK, B. GORYLUK e N.J. PIENIAZEK, 1975. An easy way of obtaining *Aspergillus nidulans* haploids in the parasexual cycle using N-glycosyl polifungin. *Genetical Research*, 25:249-252.
- BALL, C., 1971. Haploidization analysis in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of General Microbiology*, 66:63-69.
- 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.

- BAL, C. e P.F. HAMLYN, 1978. The genetics of *Acremonium chrysogenum*. *Revista Brasileira de Genética*, 1:83-96.
- BAL, C., A.J. LAWRENCE, J.M. BUTLER e K.B. MORRISON, 1978. Improvement in Amyloglucidase production following genetic recombination of *Aspergillus niger* strains. *European Journal of Applied Microbiology and Bio-technology*, 5:95-102.
- BARACHO, I.R. e W.R. COELHO, 1978. Proporção de conídios binucleados em *Aspergillus niger*. *Ciência e Cultura*, 30:605-608.
- BEADLE, G.W. e E.L. TATUM, 1945. *Neurospora*. II- Methods of producing and detecting mutations concerned with nutritional requirements. *American Journal of Botany*, 32:678-686.
- BERTOLDI, M. e CATEN, 1975. Isolation and haploidization of heterozygous diploid strain in a species of *Humicola* sp. *Journal of General Microbiology*, 91:63-73.

- BOONE, D.M., J.F. STAUFFER, STAHMANN, M.A. e G.W. KEITT, 1956.
Venturia inaequalis (CKe). Wint. VII. Induction of
mutants for studies on genetics nutrition and pathogenecity.
American Journal of Botany, 43:198-204.
- BRADLEY, S.G., 1962. Parasexual phenomena in microorganisms.
Annual Review of Microbiology, 16:35-52.
- CASE, B.L. e J.A. ROPER, 1975. Genetic imbalance and mitotic
nonconformity in *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News
Letter*, 13:8-11.
- CATALOGUE OF STRAINS. I. The American type culture collection,
1980. H.D. Hatt, M.J. Gantt e J. Piper (eds.). American
Type Culture Collection, Maryland, USA. 648p.
- CATEN, C.E. e J.L. JINKS, 1966. Heterokaryosis: Its
significance in mild homotalic ascomycetes and fungi
imperfecti. *Transation of the British Mycological
Society*, 49:81-93.
- CATCHESIDE, D.G., 1954. Isolation of nutritional mutants of
Neurospora crassa by filtration enrichment. *Journal of
General Microbiology*, 11:34-36.

- CHANG, L.T., C. TERRY e R.W. TUVESON, 1974. The influence of heterokaryotic conidia on the selective recovery of somatic diploids in *Aspergillus niger*. *Mycologia*, 66:67-72.
- CLUTTERBUCK, A.J. e J.A. ROPER, 1966. A direct determination of nuclear distribution in heterokaryons of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 7:185-194.
- COOK, K.A., 1974. Regulation of aromatic metabolism in fungi. Selection of mutants of the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* with nystatin. *Journal of General Microbiology*, 85:29-36.
- CUNHA, P.R., 1970. A study of aspects of heterokaryosis in *Aspergillus nidulans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 68(1).
- DAY, P.R. e G.E. ANDERSON, 1961. Two linkage groups in *Coprinus lagopus*. *Genetical Research*, 2:414-423.
- DAY, A.W. e J.K. JONES, 1968. The production and characteristics of diploids in *Ustilago violacea*. *Genetical Research*, 11:63-81.
- DONKERSLOOT, J.A. e R.I. MATELES, 1968. Enrichment of auxotrophic mutants of *Aspergillus flavus* by tritium suicide. *Journal of Bacteriology*, 96:1551-1555.
- FERENCZY, L., M. SÍPICZKI e M. SZEGEDI, 1975. Enrichment of fungal mutants by selective cell-wall lysis. *Nature*, 253:46-47.

- FINCHAM, J.R.S., P.R. DAY e A. RADFORD, 1979. Fungal Genetics. Oxford, Blakwell Scientific Publications. 636p.
- FOGARTY, W.M. e C.T. KELLY, 1980. Amylases, amyloglucosidases and related glucanases. In: Rose, A.H. (ed.). *"Microbial Enzymes and Bioconversion"*. Academic Press, Inc., London.
- FORBES, E., 1959. Use of mitotic segregation for assigning gene to linkage groups in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 13:67-80.
- FRIES, N., 1947. Experiments with different methods of isolating physiological mutations of filamentous fungi. *Nature*, 159:199.
- FUNGARO, M.H.P. e A.A. PIZZIRANI-KLEINER, 1983. Avaliação da irradiação gama na obtenção de mutantes em fungos produtores de amiloglicosidase. Anais da 10^a Reunião Anual de Genética de Microrganismos e 2^o Simpósio de Enologia e Viticultura. Caxias do Sul, 17 a 19 de janeiro.
- GARDNER, J.F., L.V. JAMES e S.D. RUBBÓ, 1956. Production of citric acid by mutants of *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, 14:228-237.
- GROSSI, C., 1980. Aspectos genéticos da resistência ao cloroneb em uma linhagem mutante de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP. 140p. (Tese de Doutorado).

- HAMLIN, P.F., R.E. BRADSHAW; F.M. MELLON; C.M. SANTIAGO;
J.M. WILSON; J.F. PEBERDY, 1981. Efficient protoplast
isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme and
Microbial Technology*, 3:321-325.
- HASTIE, A.C., 1970. Benlate - induced instability of
Aspergillus diploids. *Nature*, 226:77.
- IKEDA, Y.; K. NAKAMUKA, K., UCHIDA e G. ISHITANI, 1957. Two
attempts upon improving an industrial strain of *Aspergillus
oryzae* through somatic recombination and polyploidization.
Journal of General and Applied Microbiology, 3:93-101.
- ISHITANI, G. e K. SAKAGUCHI, 1956. Hereditary variation and
genetic recombination in Koji-moulds (*Aspergillus oryzae*
and *A. sojae*). V. Heterocaryosis. *Journal of General and
Applied Microbiology*, 2:345-400.
- ISHITANI, G., Y. IKEDA e K. SAKAGUCHI, 1956. Hereditary
variation and genetic recombination in Koji-molds
(*Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*). VI. Genetic
recombination in heterozygous diploids. *Journal of
General and Applied Microbiology*, 2:401-430.
- KÄFER, E., 1961. The process of spontaneous recombination
in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*,
46:1581-1609.

- 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 GEORGOPOULOS, S.G., 1975. Fungicides causing mitotic segregation in *Aspergillus* diploids. *Mutation Research*, 5:29.
- 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.
- LEIN, J., H.K., MITCHELL e M.B. MITCHELL, 1948. A method for selection of biochemical mutants of *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 34:435-442.
- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment *Aspergillus niger* diploids with p-fluorophenylalanine. *Nature*, 190:744.
- LHOAS, P., 1967. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in *Aspergillus niger*. *Genetical Research*, 10:45-61.
- LHOAS, P., 1968. Growth rate and haploidization of *A. niger* on medium containing p-fluorophenylalanine. *Genetical Research*, 12:305-315.

- LINDEGREN, C.C. e G. LINDEGREN, 1941. X-ray and ultra-violet induced mutations in *Neurospora*: I. X-ray mutations; II. Ultra-violet mutation. *Journal of Heredity*, 32:405-435.
- LITTLEWOOD, B.S. e J.E. DAVIS, 1973. Enrichment for temperature-sensitive and auxotrophic mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by tritium suicide. *Mutation Research*, 17:315-322.
- MEGNET, R., 1965. Screening of auxotrophic mutants of *Schizosaccharomyces pombe* with 2-deoxyglucose. *Mutation Research*, 2:328-331.
- MELO CRUZ, M.R., 1977. Estudos genéticos e produção de proteína unicelular em leveduras do gênero *Torula*. Piracicaba, ESALQ/USP, 143p. (Tese de Mestrado).
- MESSIAS, C.L., 1977. Parassexualidade e produção de Aflatoxina em *Aspergillus flavus*, Link. Piracicaba, ESALQ/USP, 75p. (Tese de Mestrado).
- MESSIAS, C.L., 1979. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP. 73p. (Tese de Doutorado).

- MOAT, A.G.; N. JR., PETERS e A.M. SrB, 1959. Selection and isolation of auxotrophic yeast mutants with the aid of antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 7:673-677.
- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregation induced by pFA. *Aspergillus News Letter*, 2:10.
- NEVALAINEN, K.M.H. e E.T. PALVA, 1979. Improvement of amyloglucosidase production of *Aspergillus awamori* by mutagenic treatments. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 29:390-395.
- OLIVEIRA, F.M., 1982. Análise genética de setores melhorados de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP. 101p. (Tese de Doutorado).
- PACHECO SANT'ANA, E., 1974. Alteração na freqüência de recombinação mitótica e mutantes resistentes a fungicidas em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP. 116p. (Dissertação de Mestrado).
- PAPA, K.E., 1973. The parasexual cycle in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 65:1201-1205.
- PAPA, K.E., 1976. Linkege groups in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 68(1):159-165.

- PARK, Y.K. e M.S.S. SANTI, 1977. Induction of high amyloglicosidase producing mutant from *Aspergillus awamori*. *Journal of Fermentation Technology*, 55:193-195.
- PEBERDY, J.F., 1979. Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. *Annual Review of Microbiology*, 33:21-39.
- PEREIRA, J.O., 1978. Ocorrência do ciclo parassexual em uma espécie do gênero *Aspergillus*. Piracicaba, ESALQ/USP. 108p. (Tese de Mestrado).
- PIMENTEL, GOMES, F., 1973. Estatística Experimental. 5a. ed. Edit. Livraria Nobel S.A. São Paulo.
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A., 1981. Efeito do gene $binA_1$ na formação de conídios de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP. 141p. (Tese de Doutorado).
- PONTECORVO, G., 1949. Auxonographic techniques in biochemical genetics. *Journal of General Microbiology*, 3:122-126.
- PONTECORVO, G. e J.A. ROPER, 1952. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 6:viii.

- PONTECORVO, G., J.A. ROPER e E. FORBES, 1953a. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, 8:198-210.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONDS, K.D. McDONALD e W.J. BUFTON, 1953b. The genetic of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.
- RAPER, K.B. e D.I. FENNEL, 1965. The genus *Aspergillus*. Baltimore, Williams e Wilkens Co. 686p.
- REAUME, S.E. e E.L., TATUM, 1949. Spontaneous and nitrogen mustard induced nutritional deficiencies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry*, 22:331-338.
- ROBINOW, C.F. e C.E. CATEN, 1969. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science*, 5:403-431.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8:14-15.
- ROSIM, R.T., O. GARCIA JR. e I.R. BARACHO, 1977. Tamanho de conídios e núcleos em linhagens haplóides e diplóides de *Aspergillus niger*. *Ciência e Cultura*, 30:487-492.
- RUSSELL, P.J. e M.P. COHEN, 1976. Enrichment for auxotrophic and heat-sensitive mutants of *Neurospora crassa* by tritium suicide. *Mutation Research*, 34:359-366.

- SHANFIELD, B. e E. KÄFER, 1971. Chemical induction of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 67:209-219.
- SHCHERBAKOVA, E. Ya. e M.N. RESVAYA, 1978. Formation of diploids in *Aspergillus niger* and their biosynthesis of citric acid. *Microbiologia*, 47:859-864.
- SILVEIRA, W.D., 1983. Obtenção e Fusão de Protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP. 153p. (Tese de Mestrado).
- SILVEIRA, W.D. e J.L. AZEVEDO, 1984. Isolation of auxotrophic mutants of *Metarhizium anisopliae* by the filtration enrichment technique. *Revista Brasileira de Genética*, 7:1-8.
- SPICZKIC, M. e L. FERENCZY, 1978. Enzymic methods for enrichment of fungal mutants. I- Enrichment of *Schizosaccharomyces pombe* mutants. *Mutation Research*, 50:163-173.
- SMILEY, K.L., M.C. CADMUS, D.E. HENSLEY e A.A. LAGODA, 1964. High-potency amyloglucosidase producing mold of the *Aspergillus niger* group. *Applied Microbiology*, 12. p.455.
- SNOW, D.R., 1966. An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic "nystatin". *Nature*, 221, 206.

- TATUM, E.L., R.W. BARRATT; N. FRIES; D.M. BONNER, 1950.
Biochemical mutant strains of *Neurospora* produced by physical and chemical treatment. *American Journal of Botany*, 37:38-46.
- TINLINE, R.D., 1962. *Cochliobolus sativus*. V. Heterocaryosis and parasexuality. *Canadian Journal of Botany*, 40:425-437.
- TINLINE, R.D. e B.H. McNEILL, 1969. Parasexuality in plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 7:147-170.
- VALENT, G.U. e R. BONATELLI JR., 1982. Produção de amiloglicosidase por linhagem de *Aspergillus niger*. In: *Anais da 34^a Reunião Anual da SBPC*. Campinas. p.749.
- VALENT, G.U. e R. BONATELLI JR., 1983. Produção de amiloglicosidase em *Aspergillus niger*. *Anais da 10^a Reunião Anual de Genética de Microrganismos e 2^o Simpósio de Enologia e Viticultura*. Caxias do Sul, 17 a 19 de janeiro.
- VIALTA, A. e I.R. BARACHO, 1984. Análise da produção de lipídeos em uma linhagem heterocariótica de *Aspergillus awamori*. *Anais da XI Reunião Anual de Genética de Microrganismos*. Londrina, 9 a 17 de fevereiro.

- WEISS, R.L. e C.A. LEE, 1980. Isolation and characterization of *Neurospora crassa* mu-ants impaired in feedback control of ornithine synthesis. *Journal of Bacteriology*, 141:1305-1311.
- WOODWARD, V.W.; J.R. DEZEUW e A.M. SBR, 1954. The separation and isolation of particular biochemical mutants of *Neurospora* by differential germination of conidia followed by filtration and selective plating. *Proceeding of National Academy of Sciences*, 40:192-200.
- YOUNG, J.D.; J.W. GORMAN; J.A. GORMAN e R.M. BOCK, 1976. Indirect selection for auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* using the antibiotic netropsin. *Mutation Research*, 35:423-428.
- ZIMMERMANN, V. e J. VIENKEN, 1982. Electric field-induced cell to cell fusion. *The Journal of Membrana Biology*, 67:165-182.