

**PARASSEXUALIDADE E PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM *Aspergillus*
*niger***

RENATO BONATELLI JUNIOR

Orientador: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

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

**PIRACICABA
ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL
FEVEREIRO - 1981**

A

Meus pais, RENATO e AMABILE

Meus irmãos, ANA, J.CELSO e J.BATISTA

Minha esposa, MIRIAN

Meu filho, GUILHERME

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Quero registrar o meu agradecimento às pessoas e instituições que contribuíram para a realização deste trabalho, e em especial:

- 1. Ao Prof. João Lúcio de Azevedo, pela amizade, orientação, incentivo e desprendimento.*
- 2. Aos meus colegas do Setor de Genética de Microrganismos do Deptº de Genética e Evolução da UNICAMP, Drs. Ivanhoé R. Baracho, Claudio Luiz Messias e Yoko B. Rosato, pelo seu apoio, incentivo, auxílio e pelas discussões.*
- 3. Ao Diretor do Instituto de Biologia da UNICAMP, Prof. Walter A. Hadler, pelas facilidades concedidas durante a elaboração desta tese.*
- 4. Ao Chefe do Departamento de Genética e Evolução, Dr. William J. da Silva, pelas facilidades concedidas.*
- 5. Aos meus colegas do Curso de Pós-Graduação do Deptº de Genética da ESALQ/USP e, em especial, à Profa. Aline A. Pizzirani-Kleiner, pelas discussões e incentivo.*
- 6. Pelo auxílio na parte estatística, ao Prof. Aquiles E. Piedrabuena.*
- 7. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Ci*

entífico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de pós-graduação e bolsa de Pesquisador Científico, bem como, pelo auxílio através do Projeto Integrado de Genética SIP 04/053.

- 8. À minha esposa Mirian, pela compreensão e carinho com que me auxiliou neste trabalho.*
- 9. Aos técnicos do Setor de Genética de Microrganismos da UNICAMP:*

" CURRICULUM VITAE "

Renato Bonatelli Junior, natural de Londrina - PR., licenciou-se em História Natural pela extinta Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade Federal do Paraná em 1972.

Iniciou a carreira docente no Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP em julho de 1975 na qualidade de Auxiliar de Ensino MS-1.

Ingressou no curso de pós-graduação de Genética e Melhoramento de Plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" em 1973, obtendo o grau de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas em 1977.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. RESUMO	01
2. INTRODUÇÃO	03
3. REVISÃO DA LITERATURA	05
3.1. O fungo <i>Aspergillus niger</i>	05
3.2. O ciclo parassexual em fungos	07
3.3. Técnicas genéticas no melhoramento de fungos produtores de metabólitos de interesse indus- trial	10
3.3.1. Mutantes auxotróficos	11
3.3.2. Heterocários e mistura de linhagens .	12
3.3.3. Diplóides	14
3.3.4. Recombinantes	15
3.3.4.1. Sexuais	15
3.3.4.2. Parassexuais	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Linhagens utilizadas	17
4.2. Meios de cultura e soluções usadas	18
4.2.1. Meios de cultura	18
4.2.2. Soluções	19
4.3. Suplementos adicionados aos meios de cultura.	21
4.3.1. Ao meio mínimo - MM	22
4.3.2. Ao meio de fermentação - MF	22

	<u>Página</u>
4.4. Esterilização e temperatura de incubação . . .	22
4.5. Reversão de marcas auxotróficas	22
4.6. Técnicas genéticas	23
4.6.1. Obtenção de heterocários	23
4.6.2. Isolamento de colônias prototróficas .	24
4.6.3. Haploidização de colônias prototróficas	24
4.7. Avaliação da produção de ácido cítrico em li- nhagens de <i>Aspergillus niger</i>	25
4.7.1. Fermentação em meio de DOELGER e PRESCOTT (1934)	25
4.7.2. Determinação da quantidade de ácido cí- trico	25
4.7.2.1. Titulação do meio de fermenta- ção	25
4.7.2.2. Determinação do ácido cítrico- Método de MARIER e BOULET (1958)	26
4.7.2.3. Cálculo da concentração de áci- do cítrico no meio de fermenta- ção	26
4.8. Técnicas citológicas	27
4.8.1. Medida do diâmetro de conídios	27
4.8.2. Contagem do número de núcleos em coní- dios	27
4.9. Análises estatísticas	28
4.9.1. Prova de KRUSKAL-WALLIS (SIEGEL, 1956) .	28
4.9.2. Prova de KOLMOGOROV-SMIRNOV (SIEGEL , 1956).	29

	<u>Página</u>
5. RESULTADOS	31
5.1. Parassexualidade	31
5.1.1. Obtenção de colônias prototróficas	31
5.1.2. Caracterização das colônias prototrófi- cas	31
5.1.3. Segregação das linhagens prototróficas.	32
5.2. Produção de ácido cítrico	33
5.2.1. Das reversões dos mutantes auxotróficos	33
5.2.2. Dos diplóides	33
5.2.3. Dos segregantes de diplóides	34
5.2.3.1. Diplóide <u>nic₁//pab₁fwn₁</u>	34
5.2.3.2. Diplóide <u>pur₁//pir₁olv₁</u>	34
5.2.3.3. Diplóide 1 <u>tia₁fwn₃//pir₁olv₁</u> .	34
6. DISCUSSÃO	65
6.1. Parassexualidade	65
6.1.1. Obtenção de colônias prototróficas	65
6.1.2. Caracterização das colônias prototrófi- cas	67
6.1.3. Segregação das linhagens prototróficas.	68
6.1.4. Discussão geral com respeito à parasse- xualidade na linhagem 10v10 de <i>A. niger</i>	70
6.1.5. Sugestões para estudos posteriores	72
6.2. Produção de ácido cítrico	73
6.2.1. Das reversões dos mutantes auxotróficos	73
6.2.2. Dos diplóides e seus segregantes	74

	<u>Página</u>
6.2.3. Sugestões de estudos posteriores	76
7. CONCLUSÕES	78
8. SUMMARY	80
9. LITERATURA CITADA	82

LISTA DAS TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Uso de heterocários, mistura de linhagens, diplóides e segregantes sexuais e parassexuais no melhoramento da produção de metabólitos em linhagens de fungos utilizados em indústria . . .	13
2 - Frequência de colônias prototróficas em cruzamentos de linhagens de <i>Aspergillus niger</i> . . .	36
3 - Diâmetro de conídios e crescimento em Benlate das colônias prototróficas comparadas com as linhagens parentais	37
4 - Número de núcleos em conídios de linhagens prototróficas e mutantes de <i>Aspergillus niger</i> . . .	38
5 - Característica morfológica (coloração de conídios) e auxotrofias dos segregantes isolados do diplóide <u>nic₁//pab₁fwn₁</u>	39
Análise mitótica do diplóide <u>nic₁//pab₁fwn₁</u> . . .	
7 - Característica morfológica (coloração de conídios) e auxotrofias dos segregantes isolados do diplóide <u>pur₁//pir₁olv₁</u>	41
8 - Análise mitótica do diplóide <u>pur₁//pir₁olv₁</u> . . .	42
9 - Característica morfológica (coloração de conídios) e auxotrofias dos segregantes isolados do diplóide 1 <u>tia₁fwn₃//pir₁olv₁</u>	44

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
10 - Característica morfológica (coloração de confídios) e auxotrofias dos segregantes isolados do diplóide 2 <u>tia₁fwn₃</u> // <u>pir₁olv₁</u>	45
11 - Produção de ácido cítrico de mutantes auxotróficos e suas reversões comparadas com a linhagem parental 10v10	46
12 - Análise da variância dos dados da Tabela 11	47
13 - Teste de médias dos dados da Tabela 11	48
14 - Produção de ácido cítrico da linhagem auxotrófica <u>nic₁</u> e de suas reversões espontâneas (E) e induzidas (I) por luz ultravioleta (UV) comparadas com a linhagem parental 10v10	49
15 - Análise da variância dos dados da Tabela 14	50
16 - Teste de médias dos dados da Tabela 14	51
17 - Produção de ácido cítrico dos diplóides <u>nic₁</u> // <u>pañ₁fwn₁</u> comparada com as linhagens parentais	52
18 - Produção de ácido cítrico de diplóides <u>pur₁</u> // <u>pir₁olv₁</u> comparada com a das linhagens parentais	53
19 - Produção de ácido cítrico das linhagens parentais dos segregantes da Tabela 5	54
20 - Produção de ácido cítrico dos segregantes obtidos do diplóide <u>nic₁</u> // <u>pañ₁fwn₁</u> citados na Tabela 5	55

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
21 - Prova de KOLMOGOROV-SMIRNOV com as distribuições dos dados da Figura 3	57
22 - Teste dos dados das Tabelas 19 e 20 de acordo com o procedimento da prova de KRUSKAL-WALLIS .	58
23 - Produção de ácido cítrico dos segregantes citados na Tabela 7 obtidos do diplóide <u>pur₁//pir₁olv₁</u> comparada com as linhagens parentais . . .	59
24 - Análise da variância dos dados da Tabela 23 . .	60
25 - Teste de médias dos dados da Tabela 23	61
26 - Produção de ácido cítrico de diplóides <u>tia₁fwn₃//pir₁olv₁</u> e segregantes (S) comparados com linhagens parentais	62
27 - Análise da variância dos dados da Tabela 26 . .	63
28 - Teste de médias dos dados da Tabela 26	64

LISTA DAS FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Genealogia das linhagens de <i>Aspergillus niger</i> ..	17
2 - Representação gráfica do diâmetro médio de conídios das linhagens parentais e histograma dos diâmetros dos segregantes	43
3 - Representação gráfica da produção de ácido cítrico das linhagens parentais e segregantes	56

1. RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo o estudo de aspectos relacionados com a parassexualidade e a produção de ácido cítrico na linhagem 10v10 de *Aspergillus niger*.

Com relação à parassexualidade foi constatado que para a obtenção de colônias prototróficas, após o cruzamento de linhagens auxotróficas pelo método de ROPER (1952), existe a necessidade de se aumentar a quantidade de meio completo de 2% para 4% na mistura utilizada para obtenção de micélio heterocariótico.

As colônias prototróficas isoladas puderam ser classificadas em dois tipos: com setores (CS) e ausência de setores (AS). O tipo CS foi discriminado do tipo AS por ter diâmetro de conídios maior que as parentais auxotróficas, e por segregar as marcas genéticas envolvidas no cruzamento, enquanto que as colônias AS, na maioria dos casos, têm diâmetro de conídios semelhante às parentais. Colônias do tipo CS e as linhagens auxotróficas mostraram menor frequência de conídios binucleados que a linhagem parental 10v10, com a diferença que a variação nas primeiras foi de 20% a 27%, e nas segundas houve maior amplitude de variação. As colônias CS segregaram todas ou, no mínimo, uma das marcas genéticas, o que

permitiu a sua separação em dois outros tipos, *CS I* e *CS II*, respectivamente. O Benlate, com concentrações que variaram de 1,5 até 4 µg/ml de meio completo, revelou-se agente eficiente na haploidização das linhagens *CS*, onde a ocorrência es pontânea do fenômeno é rara.

Nos estudos conduzidos sobre a produção de ácido cítrico, as reversões obtidas dos mutantes auxotróficos sugerem a existência de fenômenos pleiotrópicos, o que não foi observado no estudo da produção dos diplóides obtidos entre linhagens de baixa produção.

Não houve aumento na produção de ácido cítrico em relação à linhagem 10v10 pela diploidização, havendo nos diplóides de um dos cruzamentos menor variação na produção, o que pode ser explorado no melhoramento genético da linhagem. Os segregantes obtidos evidenciaram alelismo dos genes envolvidos na produção de ácido cítrico da linhagem 10v10, e confirmaram a ausência de marcadores genéticos observada nas linhagens do tipo *CS II*.

2. INTRODUÇÃO

O fungo filamentoso *Aspergillus niger* é utilizado na produção industrial de ácido cítrico, metabólito empregado principalmente nas indústrias de alimentos, refrigerantes e farmacêutica. A produção anual de ácido cítrico foi estimada em cerca de 90.000 toneladas por LOCKWOOD (1975).

O Brasil tem sido tradicionalmente um importador de ácido cítrico com os dados abaixo:

ANO	TONELADAS	VALOR EM US\$ (x 1000)
1974	2.349	2.062
1975	1.925	2.484
1976	1.736	2.358

Muitos estudos do ponto de vista genético têm sido conduzidos em várias das espécies de microrganismos utilizadas na produção de metabólitos de interesse para o homem desde que, segundo CALAM (1972), as indústrias constataram que não estavam havendo ganhos na produtividade com o uso apenas da técnica de mutação e seleção. Este interesse pode ser avaliado pelo grande número de trabalhos disponíveis nos últimos 10 anos sobre o assunto.

No caso do *A. niger*, existem poucos relatos de estudos que utilizaram técnicas genéticas aplicadas ao melhoramento de linhagens que acumulam o ácido cítrico em larga escala, bem como, de estudos conduzidos considerando o ciclo parassexual nesta espécie.

Levando em conta estes aspectos, o presente trabalho tem como objetivos estudar: I) o ciclo parassexual na linhagem industrial 10v10 de *A. niger* e II) aspectos genéticos da produção de ácido cítrico, considerando a obtenção de revertentes de mutantes auxotróficos, o efeito da diploidia e a avaliação dos segregantes dos diplóides.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. O fungo *Aspergillus niger*

O fungo *Aspergillus niger* é considerado por RAPER e FENNEL (1965) como organismo tipo do grupo niger. Este grupo é constituído de várias espécies bastante heterogêneas nas quais estão incluídos os fungos saprofíticos mais comuns. É descrito, quando cultivado em meio de Czapek sólido, como evidenciando duas séries de esterigmas; colônias (conídios) com coloração negro carvão a olho nú; conídios globosos com aspecto rugoso, sem equinulações verdadeiras medindo aproximadamente 5 µm de diâmetro na maturidade.

Os conídios segundo YUILL (1950) e SHCHERBAKOVA e RESVAYA (1978), são uninucleados porém, BARACHO e COELHO (1978 a, 1978 b), estudando 34 isolados, inclusive a linhagem do presente trabalho, encontraram conídios binucleados variando de 17 a 80% do total de conídios analisados. A proporção de conídios binucleados pode ser influenciada por condições ambientais (BARACHO e COELHO, op. cit.), bem como, pela natureza genética da linhagem pois, CHANG *et alii* (1974) observaram aumento na proporção de conídios binucleados em diplóides (87 a 92%) em relação às linhagens haplóides parentais (60 a 65%).

Medidas do diâmetro de conídios efetuadas com intuito de separar linhagens diplóides e haplóides foram realizadas desde os trabalhos pioneiros de PONTECORVO (1952) e PONTECORVO *et alii* (1953a), onde as linhagens diplóides apresentavam diâmetro 1,1 a 1,3 vezes maior que o das linhagens haplóides. Estas apresentaram de 3,58 a 4,59 μm , o que foi confirmado por LHOAS (1976, 1968), CHANG *et alii* (1974), SHCHERBAKOVA e RESVAYA (1978), BALL *et alii* (1978) e DAS e ROY (1978). Contudo, ROSIM *et alii* (1978) estudando haplóides, heterocá - rios e diplóides concluíram que o diâmetro de conídios não é critério confiável para a caracterização de diplóides.

Do ponto de vista genético, existem poucos trabalhos conduzidos e, às pesquisas iniciais de PONTECORVO (1952) e PONTECORVO *et alii* (1953a), que evidenciaram a presença do ciclo parassexual, seguiram-se as de LHOAS (1961, 1967, 1968) e VAN TUYL (1977) que sugerem a ocorrência de 6 grupos de ligação, com permuta mitótica ocorrendo com frequência 2,5 vezes maior que em *Aspergillus nidulans*. O uso do ciclo parassexual é a única forma de análise genética disponível atualmente devido à falta de evidenciação ou à não-existência do ciclo sexual, o que enquadra o *A. niger* como Deuteromiceto.

Em todos os trabalhos ficou evidenciada a facilidade no isolamento de diplóides usando-se as técnicas usuais de obtenção de heterocários forçados (ROPER, 1952), com a frequência dos diplóides oscilando, nos diversos trabalhos, desde 1 até $4,6 \times 10^{-6}$ conídios. Segundo CHANG *et alii* (1974), a presença de conídios heterocarióticos em heterocários obtidos entre linhagens binucleadas, com frequência calculada de 1×10^{-4} , interferiria no isolamento de diplóides. Porém relatos de dificuldade no isolamento de diplóides existem no trabalho de BONATELLI JR. (1977) com mutantes obtidos da linhagem 10v10 de *A. niger*.

PRASAD (1970) analisando, em mutantes com alteração da coloração de conídios, complementação gênica em hete

rocários, sugere que existem vários genes não-alélicos que influenciam a coloração de conídios do *A. niger*, tendo constatado, confirmando dados de PONTECORVO *et alii* (1953a), a existência de não-autonomia quanto à coloração em algumas combinações de mutantes. .

3.2. O ciclo parassexual em fungos

O ciclo parassexual, descrito no *Aspergillus nidulans* em 1952, por PONTECORVO e ROPER, é a alternativa de recombinação tradicionalmente estudada em espécies de fungos classificados como Deuteromicetos.

Segundo PONTECORVO (1956) a sequência de eventos, fusão de núcleos haplóides, permuta mitótica e haploidização constituem o ciclo parassexual. A fusão de núcleos haplóides deve ser fenômeno passível de ocorrer na natureza, com evidências nos trabalhos de NGA *et alii* (1975) em *A. niger*. O aparecimento de diplóides somáticos, por fusão de núcleos haplóides, caracteriza fase importante do ciclo parassexual porém, a origem dos diplóides pode também ser devida a falhas no processo mitótico ou meiótico.

Nos estudos normalmente conduzidos em condições de laboratório o objetivo primordial é a obtenção de diplóides heterozigotos de genótipo conhecido, os quais, são utilizados na análise genética, ao contrário dos diplóides homozigotos que podem ser originados de fusões de núcleos ocorridas espontaneamente nos processos de divisão nuclear.

Os processos iniciais para formação dos diplóides somáticos são: anastomose de hifas e heterocarioese, que foram objeto de revisões por CATEN e JINKS (1966), DAVIS (1966) e TINLINE e McNEILL (1969). Como consequência da proximidade dos núcleos diferentes no mesmo citoplasma (Heterocarioese) e

xiste a possibilidade de ocorrer a fusão de núcleos ou Cario-gamia, originando o diplóide somático heterozigoto. A frequên-
cia normalmente é baixa - 1 diplóide por 10^5 a 10^7 conídios
coletados de heterocários - mas, pode ser aumentada por agen-
tes físicos, como a luz ultra-violeta (ISHITANI e SAKAGUCHI ,
1956) ou agentes químicos, como a colchicina (SHCHERBAKOVA e
RESVAYA, 1978), cânfora (PONTECORVO *et alii*, 1953a, 1953b ;
ROPER, 1966). Em *A. niger*, PONTECORVO *et alii* (1953a), julga-
ram que o tratamento com cânfora era desnecessário devido à
alta frequência de diplóides obtidos espontaneamente.

Os diplóides somáticos assim obtidos assemelham-
se às linhagens selvagens com relação às características mor-
fológicas e nutricionais, porém, devem ser observados outros
critérios para confirmação da condição diplóide, tais como :
a) conteúdo de DNA dos núcleos, b) contagem do número de cro-
mossomos, c) segregação de marcas genéticas em heterozigose ,
d) volume celular e nuclear, e) sensibilidade à luz ultravio-
leta, f) mutabilidade, g) número de núcleos em conídios, h)
sensibilidade ao fungicida Benlate, i) forma e diâmetro da ve-
sícula dos conidióforos, etc. Os critérios podem fornecer boas
evidências da condição diplóide da linhagem isolada.

A condição diplóide permite a formação de re -
combinantes que surgem por: I) permuta mitótica e/ou II) não-
disjunção mitótica, eventos seguidos ou não pela haploidiza -
ção.

A permuta mitótica descrita por STERN (1936)
em *Drosophila*, foi estudada em *A. nidulans* por ROPER e
PRITCHARD (1951) e PONTECORVO e KAUFER (1958), que concluíram
que o fenômeno: 1) é raro, ocorrendo uma permuta em 500 mito-
ses; 2) ocorre no estágio de 4 fios; 3) forma produtos recí -
procos, e 4) permite a formação de núcleos homozigotos para a-
lelos ligados e distais em relação ao ponto de permuta. Isto
ocorre com os marcadores proximais e marcas genéticas em
ou-tros cromossomos continuando em heterozigose. Neste tipo
de

análise podem ser estabelecidas a ordem dos genes e posição do centrômero num braço cromossômico, mas, segundo ROPER (1966) existem limitações que são: 1) não há idéia da associação dos genes em relação a outros grupos de ligação, o que existe na haploidização; 2) há necessidade de marcas seletivas distais que devem ser recessivas ou semi-dominantes e, 3) não há avaliação rápida das frequências de recombinação como nas análises meióticas.

A ocorrência de segregantes haplóides, diplóides e aneuplóides são devidas às perdas sucessivas de cromossomos (não-disjunção), que originariam diversos estados aneuploides instáveis como os hiperdiplóides ($2n+1$) e os hiperhaplóides ($n+1$), de acordo com KAFER (1960, 1961).

Excessões à sequência de eventos do ciclo parassexual foram evidenciadas em *Acremonium chrysogenum* (*Cephalosporium acremonium*) (NÜESCH *et alii*, 1973; BALL e HAMLIN, 1978) e em *Penicillium patulum* (CALAM *et alii*, 1973). Em *A. chrysogenum* na seleção de diplóides são obtidas 2 classes de colônias prototróficas. Na primeira classe as colônias obtidas são estáveis não segregando nenhuma das marcas genéticas envolvidas no cruzamento, mesmo com o uso de pFA (p-fluorofenilalanina) ou raios gama. Na segunda, os prototróficos são instáveis, segregando pelo menos uma das marcas genéticas envolvidas no cruzamento. Esta segunda classe ocorre em apenas alguns cruzamentos. Os resultados foram confirmados e ampliados com a utilização da técnica de fusão de protoplastos, pois puderam ser isolados, com o uso de meios seletivos, colônias recombinantes sem que fosse constatada a presença de diplóides. Estes dados sugerem que o estado diplóide é transitório, como na meiose, com segregação cromossômica e permuta mitótica ocorrendo em alta frequência. Em *P. patulum*, foi constatada a formação de prototróficos estáveis com raros segregantes haplóides. A interpretação destes resultados é difícil devido à ausência de critérios inequívocos para estabelecer a natureza

haplóide ou diplóide das linhagens estudadas.

A ocorrência do ciclo parassexual foi verificada em diversos gêneros de fungos filamentosos, incluindo cerca de 41 espécies (AZEVEDO, 1976; MESSIAS, 1979), com 8 espécies do gênero *Aspergillus*.

Além da sua importância como fonte de variabilidade, o ciclo parassexual favorece certos estudos de ordem genética, como se segue: I) Mapeamento genético em fungos imperfeitos (AZEVEDO, 1972, 1976); II) Interações gênicas alélicas ou não, sendo o estado diplóide importante modelo para o estudo de regulação gênica em eucariotos (revisão em SMITH e PATEMAN, 1977); III) Instabilidade genética (AZEVEDO, 1972, 1976); IV) Melhoramento de características de interesse econômico (SERMONTI, 1969; BONATELLI JR., 1977; MESSIAS, 1979) e V) Estudos da origem e relações genéticas entre raças fisiológicas de fungos fitopatogênicos (BUXTON, 1956, 1962; AZEVEDO, 1976).

3.3. Técnicas genéticas no melhoramento de fungos produtores de metabólitos de interesse industrial.

O uso da mutação induzida no melhoramento de microrganismos produtores de metabólitos de interesse comercial, segundo DEMAIN (1973), foi o evento responsável pelo estado atual da indústria de fermentações. O uso intensivo da técnica foi iniciado com os trabalhos conduzidos em 1945 com *Penicillium chrysogenum* e dos raios X como mutagênico, que culminaram na obtenção da linhagem X-1612 com produção superando 2 vezes a da linhagem parental. Existem relatos anteriores de KRESLING e STERN (1935), citados por DAS (1972), que obtiveram mutantes de *A. niger* com produção de ácido cítrico aumentada após o uso de agentes mutagênicos.

O uso do ciclo parassexual foi sugerido por PONTECORVO *et alii* (1953a) após a constatação de sua ocorrência em *A. niger* (PONTECORVO, 1952) e em *P. chrysogenum* (PONTECORVO e SERMONTI, 1953). Porém, a facilidade de trabalho com os agentes mutagênicos e os resultados obtidos com a seleção de mutantes mais produtivos protelaram o uso do ciclo parassexual até o final da década de 60 quando, segundo CALAM (1972), foi atingido um platô com relação aos ganhos devidos às novas mutações induzidas, sendo então, iniciados programas que utilizaram processos de recombinação, inclusive o ciclo parassexual, visando superar o impasse.

Apresentaremos os trabalhos relevantes com relação à aplicação de processos de recombinação em fungos, iniciando pelos estudos conduzidos com os mutantes auxotróficos que são essenciais para estudos de recombinação em microrganismos.

3.3.1. Mutantes auxotróficos

As mutações que condicionam auxotrofia podem determinar ganho, perda ou não-alteração na produção dos metabólitos (revisões em SERMONTI, 1969; DEMAIN, 1973; HOPWOOD e MERRICK, 1977). Em *A. niger* diversos trabalhos consideraram este aspecto com poucos resultados relatando ganho, os quais são as evidências de MUSILKOVA e FENCL (1970) com mutante deficiente para arginina e, BONATELLI JR. (1977) com mutante deficiente para tiamina. Resultados de diminuição ou não-alteração da produção incluem os trabalhos de MUSILKOVA e FENCL (1970), CHANG e TERRY (1973), BONATELLI JR. (1977), SHCHERBAKOVA e RESVAYA (1978) e DAS e ROY (1978).

Melhor entendimento da interferência das mutações para auxotrofia na produção de metabólitos está contida

nos trabalhos de POLSINELLI *et alii* (1963) que relatam, em trabalho com *Streptomyces antibioticus*, que a queda significativa na produção de actinomicina ocorre somente com deficiência na síntese de aminoácidos encontrados na molécula do antibiótico. Porém, em *P. chrysogenum* (MACDONALD *et alii*, 1963) e em *A. niger* (BONATELLI JR., 1977) há perda em relação à produção de, respectivamente, penicilina e ácido cítrico, em mutantes deficientes para a síntese de adenina, a qual aparentemente não está relacionada com a síntese dos metabólitos citados. Outra abordagem pode ser obtida com o isolamento de reversões dos mutantes deficientes nutricionais, como fizeram MACDONALD *et alii* (op.cit.), com mutante deficiente para tiosulfato. Num total de 11 revertentes, 5 tinham produção igual à linhagem parental, e 6 igual ao mutante deficiente, sugerindo reversão verdadeira e devida a gene(s) supressor(es), respectivamente.

Estes resultados indicam que a avaliação dos efeitos da auxotrofia na produção de substâncias de interesse comercial é complexo, merecendo melhores estudos; pois pode abrir novos caminhos no melhoramento de linhagens, tendo em vista o uso cada vez maior de técnicas de recombinação que utilizam com frequência mutantes com deficiência nutricional.

Em seguida, apresentaremos os dados referentes ao uso de heterocáries, mistura de linhagens, diplóides e segregantes, cujos resultados obtidos estão sumariados na Tabela 1.

3.3.2. Heterocáries e mistura de linhagens

Em todos os casos citados não foi evidenciado ganho na produção e, sim manutenção ou produção intermediária às linhagens paternas, com uma referência de queda na produ

TABELA 1 - Uso de heterocários, mistura de linhagens, diplóides e segregantes sexuais e parassexuais no melhoramento da produção de metabólitos em linhagens de fungos utilizados em indústria.

MÉTODOS							
ESPÉCIE	PRODUTO	AUTOR (ES)	MISTURA LINHAGENS	HETEROCÁRIOS	DIPLÓIDES	SEGREGANTES SEXUAIS	PARASSEXUAIS
<i>P. chrysogenum</i>	penicilina	ELANDER, 1966 (apud SERMONTI, 1969)	-	<	>	-	<
		SERMONTI (1969)	-	produção sob controle nuclear	<.,.>	-	-
		MACDONALD <i>et alii</i> (1963); MACDONALD (1965)	-	"	<.,.	-	<.,.
		BALL (1973)	-	-	<.,.>	-	<.,.>
<i>C. acremonium</i> (<i>A. chrysogenum</i>)	cefalosporina C	BALL e HAMLIN (1978)	-	-	-	-	<.,.>
<i>Emericellopsis sp.</i>	sinematina	FANTINI (1962)	-	"	"	<.,.>	-
<i>A. fonsecaeus</i>	ácido glucônico	CIEGLER e RAPER (1957)	--	" ou intermediária	-	-	-
<i>A. foetidus</i>	glicoamilase	CHANG e TERRY (1973)	--	<.,.	<.,.	-	-
<i>A. nidulans</i>	penicilina	MACDONALD (1973) DITCHEBURN <i>et alii</i> (1976)	-	produção sob controle nuclear	mutações dominantes, recessivas e semi-dominantes	<.,.>	-
		FERRICK (1975a, 1975b)	-	-	-	<.,.> ação gênica aditiva	-
<i>A. niger</i>	amiloglicosidase	BALL <i>et alii</i> (1978)	-	-	Intermediária	-	<.,.
	ácido cítrico	YUILL (1951)	" ou intermediária	-	-	-	-
		CIEGLER e RAPER (1957)	-	" ou intermediária	-	-	-
		CHANG e TERRY (1973)	-	produção sob controle nuclear	-	-	-
		TAVARES e AZEVEDO (1974)	-	-	-	efeitos heteróticos	-
		BONATELLI JR. (1978)	-	-	-	(maior estabilidade)	-
		BARACHO <i>et alii</i> (1978)	<.,. ou intermediária	-	-	-	-
DAS e ROY (1978)	-	-	-	<.,.>	-	-	
		SHCHERBAKOVA e RESVAYA (1978)	-	-	<.,.	-	-

Notação: em relação à linhagem parental com produção mais elevada do metabólito.

<.,.> respectivamente, menor, igual ou maior produção.

em relação às linhagens parentais, produção intermediária.

., não foi estudado.

ção (ELANDER, 1966 apud SERMONTI, 1969), podendo ser notada ainda a pouca utilização destes métodos para o estudo da produção de metabólitos. Observação pode ser feita com o teste de heterocário que mostra o maior envolvimento de genes nucleares e/ou herança citoplasmática na produção dos metabólitos (SERMONTI, 1969; CHANG e TERRY, 1973).

3.3.3. Diplóides

Neste item estão incluídos diplóides que com relação aos genes envolvidos na produção, podem ser heterozigotos ou homozigotos.

Com relação aos primeiros, que consideramos como os sintetizados entre linhagens divergentes por muitos passos de tratamentos com mutagênicos ou entre linhagens isoladas independentemente após tratamento com mutagênico para obtenção de mutantes com produção elevada ou entre linhagens com diferentes origens, houve ganho na produção nos trabalhos de SERMONTI (1969), BALL (1973) e TAVARES e AZEVEDO (1974) e, mesmo nestes trabalhos, em apenas alguns cruzamentos. Isto foi interpretado como devido, na maior parte dos casos, à natureza recessiva das mutações que aumentam a produção (denominadas positivas) presentes nas linhagens estudadas. Outra observação foi feita por MACDONALD (1966) que obteve duas classes de diplóides, com produção de penicilina entre 3000-3500 U/ml e de 300-1200 U/ml, isolados do cruzamento entre linhagens divergentes. A ocorrência da classe de produção menor foi interpretada como devido à ocorrência de mutação dominante condicionando baixa produção, pois uma das linhagens parentais deu origem espontaneamente a mutante com queda acentuada na produção. Uma hipótese alternativa seria que os diplóides com produção elevada tem origem dos de menor produção por segregação, pois os últimos podem produzir

segregantes com produção elevada (MACDONALD, op. cit.).

No caso dos diplóides homozigotos, que consideramos como os obtidos do cruzamento de mutantes auxotróficos obtidos de uma única linhagem parental, apenas em 2 trabalhos foi constatado ganho significativo na produção (ELANDER, 1966 apud SERMONTI, 1969; DAS e ROY, 1978), sendo que, nos demais casos a produção foi semelhante ou inferior às linhagens parentais. Porém, certas características encontradas nos diplóides podem ser úteis, como foi o caso da maior estabilidade do diplóide obtido por TAVARES e AZEVEDO (1974) constatada por BONATELLI JR. (1978), o que lhe conferia vantagem em relação à linhagem parental, resultando em maior produção de ácido cítrico com ajustes efetuados nas condições ambientais. Este diplóide não segrega as marcas genéticas das linhagens parentais apresentando diâmetro de conídios semelhante à linhagem parental 10v10 (BONATELLI JR., dados não publicados).

3.3.4. Recombinantes

3.3.4.1. Sexuais

Nos casos em que houve possibilidade do uso do ciclo sexual para obtenção de recombinantes foram observados ganhos de até 50% em espécies do gênero *Emericellopsis* (FANTINI, 1962). No fungo *A. nidulans* este método foi eficiente na obtenção de linhagens melhoradas para a produção de penicilina. Foram obtidos ganhos rápidos com a fixação de diferentes combinações gênicas e/ou alélicas, o que é indicação de que muitos genes estão envolvidos na produção. Houve também evidências de ação gênica aditiva predominante com rápido esgotamento da variabilidade genética disponível (MERRICK, 1975a, 1975b).

3.3.4.2. Parassexuais

No primeiro trabalho procurando determinar a herança das mutações positivas para produção de penicilina, MAcDONALD et alii (1965) constataram em *P. chrysogenum* a ocorrência de segregação preferencial dos genomas parentais, o que impediu a análise proposta. Superando este problema com o uso de uma única linhagem parental [Q-176] e de pFA (p-fluorofenilalaninal) como agente haploidizante, BALL (1973) estabeleceu 3 grupos de ligação em *P. chrysogenum*, verificando que a combinação nos segregantes, de mutações diferentes, ocasionava aumento na produção. No mesmo fungo, ELANDER (1966, apud SERMONTI, 1969) verificou que não houve ganho na produção dos segregantes estudados que, inclusive, produziam menos que o heterocário e o diplóide do qual foram obtidos.

BALL e HAMLIN (1978) estudando segregantes do cruzamento entre linhagens de *A. chrysogenum*, constataram que 1 dos segregantes tinha produção superior em 40% à da linhagem parental mais produtiva.

BALL *et alii* (1978) trabalhando com linhagem de *A. niger* produtora de amiloglicosidase, obtiveram, do diplóide sintetizado entre mutantes com menor e maior produção, segregantes, os quais facilitavam a recuperação da enzima, pois o meio de cultura após a fermentação tinha menor viscosidade e, conseqüentemente, maior rapidez na filtração. Relataram também, que não foi possível obter esta característica com o uso de mutagênicos.

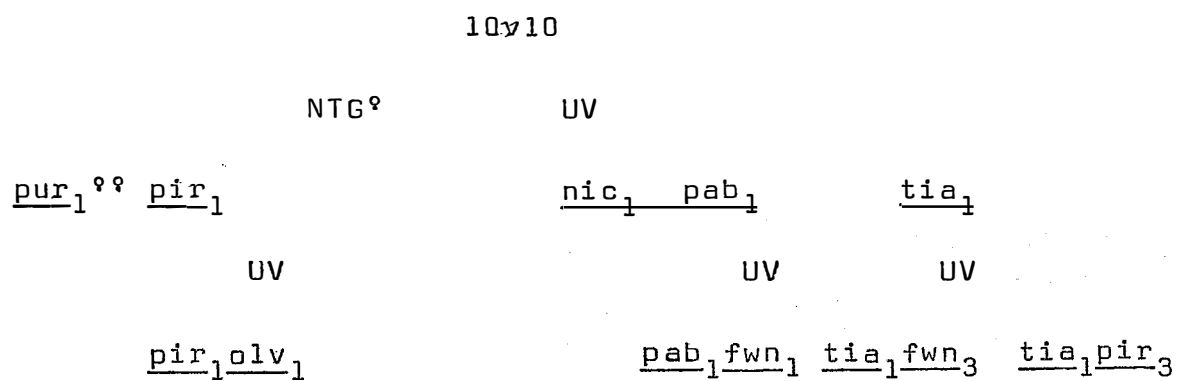
O trabalho acima evidencia, como o trabalho de BONATELLI JR. (1978), que o melhoramento de outras características desejáveis do ponto de vista econômico, que não a produção, pode ser obtido pelo uso do ciclo parassexual.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens utilizadas

A Figura 1 resume a genealogia das linhagens utilizadas no presente trabalho.

FIGURA 1 - Genealogia das linhagens de *Aspergillus niger*



^o , indicam os mutagênicos usados na obtenção dos mutantes ,

NTG - N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina

UV - luz ultravioleta de lâmpada germicida

?? , indicam os símbolos usados para os mutantes,

fwn - conídios de coloração marrom-claro,

olv - conídios de coloração oliva,

nic - deficiência nutricional para ácido nicotínico,

pab - deficiência nutricional para ácido p-aminobenzóico,

pir - deficiência nutricional para piridoxina,

pur - deficiência nutricional para purinas (adenina ou guanina),

tia - deficiência nutricional para tiamina.

Todas as linhagens foram derivadas da linhagem 10v10 de *A. niger*, que é utilizada na produção de ácido cítrico em escala comercial pelo método de fermentação em superfície. A linhagem 10v10 foi gentilmente cedida pelo Dr. ENRIQUE DUPRAT, da Fermenta - Produtos Químicos Amália S.A. (Para maiores detalhes ver BONATELLI JR., 1977).

4.2. Meios de cultura e soluções usadas

4.2.1. Meios de cultura (a quantidade dos compostos usados está expressa em gramas por litro de água destilada ao menos que esteja especificado de outra maneira).

a) Meio Mínimo - MM (PONTECORVO *et alii*, 1953b).

Nitrato de Sódio 6,0; Fosfato dihidrogenado de Potássio 1,5; Cloreto de Potássio 0,5; Sulfato de Magnésio $.7H_2O$ 0,5; Glicose 10; Sulfato de Ferro e Sulfato de Zinco, traços.

O pH do meio foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1N; quando desejado sólido foram adicionadas 15 g de ágar DIFCO por litro de meio.

b) Meio completo - MC (PONTECORVO *et alii*, 1953b).

A um litro de MM foram adicionados:

Peptona 2,0; Caseína hidrolizada 1,5; Extrato de levedura 0,5; Solução de vitaminas 1,0 ml (ítem 4.2.2.a) e Solução de hidrolizado de ácido nucleico de leveduras 2,5 ml (ítem 4.2.2.b).

O pH do meio foi ajustado para 6,8 NaOH 4% ou HCl 1N; quando desejado sólido foram adicionadas 15 g de ágar em rama por litro de meio.

c) Meio de Fermentação - MF (DOELGER e PRESCOTT, 1934).

Sacarose 140,0; Nitrato de Amonia 2,23; Fosfato Monohidrogenado de Potássio 1,0 e Sulfato de Magnésio . 7 H₂O 0,23.

O volume do meio é completado para 1 litro com água deionizada. O pH foi ajustado para 2,0 com HCl 1N. Foram preparados erlenmeyers de 125 ml com 25 ml de meio e este rilizados com pressão de 1/2 atmosfera e temperatura de 111°C por 30 minutos.

4.2.2. Soluções

a) De Vitaminas (a quantidade dos compostos es tá expressa em mg por 100 ml de água destilada).

Biotina 0,2; Ácido p-aminobenzóico 10; Tiamina 50; Piridoxina 50; Ácido Nicotínico 100 e Riboflavina 100.

A solução foi esterilizada em vapor fluente e guardada em frasco escuro no refrigerados, sobre clorofórmio.

b) De Hidrolizado de Ácido Nucleico de Leveduras.

4 g de Ácido Nucleico de Leveduras são utilizadas, sendo 2 g misturadas com 15 ml de NaOH 1N e 2 g com 15ml de HCl 1N. As misturas foram aquecidas a 100°C por 20 minutos, juntadas e o pH ajustado para 6,0. A mistura resultante é filtrada, o volume completado para 40 ml e, guardada em refrigerador, sobre clorofórmio.

c) Salina

8,5 g de cloreto de sódio são misturadas com 1 litro de água destilada. Foram preparados frascos com 9 ml e esterilizados.

d) Tween 80

1 ml de Tween 80 foi misturado com 1 litro de água destilada, a solução resultante foi distribuída 2,5 ml por tubo de ensaio e esterilizada.

e) MM com 2% ou 4% de MC

Ao meio mínimo (MM) foi adicionado meio completo (MC) numa proporção de 2% ou 4%. As soluções resultantes foram distribuídas 2,5 ml por tubo de ensaio e esterilizadas.

f) Estoque de Ácido Cítrico

1 g de ácido cítrico foi adicionada a 250 ml de água destilada. A solução obtida foi agitada até a completa

dissolução do ácido e conservada em refrigerador.

g) Albumina 5%

5 ml de clara de ovo foram misturadas a 95 ml de água destilada esterilizada, agitada até a obtenção de solução homogênea e, conservada no refrigerador.

h) Fixadora

Foram misturados álcool absoluto, ácido lático e ácido acético glacial na proporção de 6:1:1, em volume, respectivamente. A solução obtida foi mantida à temperatura ambiente.

i) Tampão Fosfato

Em 1 litro de água destilada foram adicionados Fosfato Dihidrogenado de Potássio 0,6 g e, Fosfato Monohidrogenado de Sódio 2,8 g. Conservada no refrigerador.

j) Corante *Giemsa*

Foi dissolvida 1 g de *Giemsa* à quente, em 54 ml de glicerina. Após resfriamento, foram acrescentados 84 ml de metanol P.A. A solução obtida foi filtrada, novamente aquecida e, conservada em frasco escuro à temperatura ambiente. No momento do uso foi feita diluição de 18 gotas do corante em 10 ml de tampão fosfato [ítem 4.2.2.i].

4.3. Suplementos adicionados aos meios de cultura

4.3.1. Ao meio mínimo - MM

Composto	Concentração final no meio
Ácido Nicotínico	0,05 µg/ml
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	0,7 µg/ml
Adenina	70 µg/ml
Piridoxina	0,05 µg/ml
Tiamina	0,05 µg/ml

4.3.2. Ao meio de fermentação - MF

Composto	Concentração final no meio
Ácido Nicotínico	5 µg/ml
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	5 µg/ml
Adenina	25 µg/ml
Piridoxina	5 µg/ml
Tiamina	5 µg/ml

4.4. Esterilização e temperatura de incubação

Todos os meios de cultura e soluções utilizadas (exceto quando especificado de maneira diversa) foram esterilizados em autoclave à temperatura de 120°C e com pressão de 1 atmosfera por 15 minutos.

Os experimentos foram conduzidos em estufas com temperatura regulada a 28°C.

4.5. Reversão de marcas auxotróficas

Conídios das linhagens selecionadas para o experimento foram coletados em solução de tween 80 de colônias com 6-8 dias, seu número estimado em lâmina hematimétrica e, a concentração ajustada por diluição em salina para semear 10^5 - 10^6 conídios por placa.

Uma das linhagens - nic₁ - teve parte da suspensão de conídios submetida a tratamento com luz ultravioleta (UV) por tempo suficiente para ser obtida sobrevivência de 1-5% a fim de serem estudadas reversões induzidas (BONATELLI JR., 1977).

4.6. Técnicas genéticas

As técnicas genéticas utilizadas estão baseadas nos relatos de PONTECORVO *et alii* (1953b) para trabalhos que utilizam o ciclo parassexual e seguem, como referências principais, a obtenção de heterocários, diplóides e segregantes dos diplóides.

4.6.1. Obtenção de heterocários

Conídios de linhagens diferentes quanto à morfologia e/ou deficiências nutricionais foram misturados em tubos de ensaio contendo MM líquido com MC líquido na proporção de 2% ou 4% (item 4.2.2.e). Após 2-4 dias de incubação, a película desenvolvida na superfície do líquido é transferida para placas de Petri contendo MM sólido. Este último passo permite a evidenciação do micélio heterocariótico formado como setores de crescimento vigoroso.

4.6.2. Isolamento de colônias prototróficas

Conídios foram coletados de setores heterocarióticos em solução de tween 80 e semeados em placas de Petri contendo MM sólido. Foram utilizadas concentrações de 10^4 - 10^6 conídios por placa, sendo o número de conídios estimado em lâmina hematimétrica. As placas foram incubadas por 3-5 dias. As colônias crescendo isoladas com coloração de conídios e morfologia uniformes foram selecionadas, e seus conídios transferidos para MM sólido por inoculação em estrias. Após 2-4 dias foi observado o crescimento que, no critério seletivo adotado, deveria ser uniforme ao longo das estrias, com a coloração de conídios e a morfologia das colônias semelhantes à colônia original (10v10).

Depois da seleção procedida como descrito acima, foram efetuadas medidas do diâmetro de conídios e teste de crescimento em Benlate (item 4.6.3.1).

4.6.3. Haploidização de colônias prototróficas

O agente haploidizante usado foi o fungicida Benlate (metil-1- (butilcarbamoil)-2-benzimidazol carbamato) nas concentrações de 1 a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de MC (HASTIE, 1970). Além de poder haploidizar as linhagens prototróficas, evidenciando setores, a presença do fungicida no meio de cultura retarda o seu crescimento tornando irregulares as bordas das colônias. Esta observação foi usada como critério adicional na caracterização das colônias prototróficas.

Os setores obtidos foram purificados por inoculação em estria e, em seguida, pela obtenção de colônias isoladas. Foram estocados em tubos de ensaio contendo meio completo sólido inclinado. Foram também classificados quanto à

morfologia (coloração de conídios), auxotrofias e, em alguns casos, quanto à ploidia, por medida de diâmetro de conídios.

4.7. Avaliação da produção de ácido cítrico das linhagens de *A. niger*.

4.7.1. Fermentação em meio de DOELGER e PRESCOTT (1934)

Foram preparadas as suspensões de conídios em solução de tween 80 à partir de linhagens desenvolvidas por 7 dias em tubos de ensaio contendo meio completo inclinado. Das suspensões foram coletados 0,2 ml para serem inoculados em erlenmeyers contendo meio de fermentação.

No caso dos mutantes auxotróficos o composto requerido foi adicionado de acordo com o item 4.3.2. Nas linhagens prototróficas foi adicionada a mesma quantidade em volume de água destilada esterilizada para compensar a diluição do meio de fermentação.

O período de fermentação foi de 7 dias a 28°C. O meio de fermentação resultante foi filtrado através de papel de filtro e estocado em frasco com tampa de baquelite no congelador (-16°C) por período de, no máximo, uma semana.

4.7.2. Determinação da quantidade de ácido cítrico

4.7.2.1. Titulação do meio de fermentação

Foi retirada uma alíquota de 1 ml do meio de fermentação que foi titulada com solução de NaOH 0,1 N, usando como indicador 2 gotas de solução alcoólica de fenolftaleín

na 1% (peso por volume). A solução básica utilizada foi previamente padronizada com Biftalato de Potássio 0,1 N.

4.7.2.2. Determinação do ácido cítrico Método de MARIER e BOULET (1958).

Aliquotas dos meios de fermentação foram convenientemente diluídas para que a concentração final do ácido cítrico oscilasse entre 200 - 400 µg/ml. Das diluições foram retiradas amostras de 1 ml que seguiram pelo procedimento abaixo:

- 1) Adição de 1,3 ml de piridina, seguida de agitação,
- 2) Adição de 5,7 ml de anidrido acético, com agitação, e
- 3) Colocação imediata em banho-maria regulado a 32°C por 30 minutos.

As soluções padrão com 200, 300 e 400 µg de ácido cítrico em 1 ml e o branco - 1 ml de água destilada - seguem o mesmo procedimento. As leituras foram feitas em colorímetro marca FUJI EP-412 com filtro de 472 nm.

4.7.2.3. Cálculo da concentração de ácido cítrico no meio de fermentação.

Devido às correlações encontradas entre a titulação (ácidos totais) do meio de fermentação e a quantidade de ácido cítrico produzida pelas linhagens em estudo, tanto pela FERMENTA (DUPRAT, comunicação pessoal ; BONATELLI JR., 1978) como por BONATELLI JR. (1977), foi decidido expressar, no pre

sente trabalho, a concentração de ácido cítrico pelo volume total de NaOH 0,1 N utilizado para neutralizar a amostra do meio de fermentação (ítem 4.7.2.1). A adoção desta maneira de expressar não quer indicar que toda a acidez medida seja devida ao ácido cítrico mas, que o valor do volume total da base utilizada representa convenientemente a quantidade do ácido que interessa ao estudo.

4.8. Técnicas citológicas

4.8.1. Medida do diâmetro de conídios

Conídios foram coletados de colônias que cresceram em MC sólido por 7 dias. Os conídios coletados foram colocados em lâmina com 1 gota de lisol (lisoform bruto diluído 1:10 em água destilada) e, medidos com auxílio de ocular micrométrica (10x) em microscópio com objetiva de aumento 40x.

4.8.2. Contagem do número de núcleos em conídios

Conídios de linhagens com 1-2 dias de crescimento em MC sólido foram coletados, colocados em lamínula com uma gota de solução de albumina 5% (ítem 4.2.2.g). Foram, em seguida, misturados com a albumina e espalhados na superfície da lamínula com auxílio de alça de platina esterilizada. Após a secagem, foram colocados durante 10 minutos em solução fixadora (ítem 4.2.2.h). Foram, então, hidratados em soluções alcoólicas 95%, 70% e 50% e, em água destilada. Foi feita então hidrólise com HCl 1N durante 5 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, em banho-maria regulado a 60°C por 6 minutos.

A seguir, foram lavados em tampão fosfato (item 4.2.2.i) por 5 vezes, corados por 15-20 minutos em *Giemsa* (item 4.2.2.j), lavados novamente em tampão fosfato e, finalmente, observados em microscópio. O número de núcleos foi estimado num mínimo de 100 e no máximo 180 conídios. Esta técnica foi citada em PAES DE BARROS (1977).

4.9. Análises estatísticas

Estão discriminados apenas os testes não-paramétricos utilizados. Os paramétricos são encontrados em PIMENTEL GOMES (1966).

4.9.1. Prova de KRUSKAL-WALLIS (SIEGEL, 1956).

São atribuídos postos a cada uma das N observações das amostras a serem comparadas, sendo que, à menor das observações atribui-se o posto 1, à seguinte o posto 2, ... e à maior, o posto N . Em seguida determina-se a soma dos postos de cada amostra. Com os valores obtidos, usando-se a fórmula abaixo, podemos saber se as amostras são diferentes ou não:

Fórmula para o cálculo de H

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \cdot \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1)$$

aonde: k = número de amostras

n_j = número de casos na amostra j

$N = n_j$, número de observações em todas as amostras combinadas

R_j = soma dos postos na amostra

$\sum_{j=1}^k$ = indica o somatório de todas as K amostras.

Ocorrendo empate entre as observações das amostras o valor H é corrigido pela fórmula abaixo:

$$H_c = \frac{H}{1 - \frac{\sum T}{N^3 - N}}$$

aonde: H_c = valor corrigido de H ,

$T = t^3 - t$ (t , sendo o número de observações empatadas em um grupo de escores empatados)

$N = N_j$ (ver fórmula anterior)

$\sum T$ = somatório de todos os grupos de empates.

O valor de H quando o tamanho das amostras não é muito pequeno, i.e, menor que 5 casos nos diversos grupos, tem distribuição semelhante ao qui-quadrado com $GL = k - 1$.

4.9.2. Prova de KOLMOGOROV-SMIRNOV (SIEGEL, 1956)

Esta prova nos informa se duas amostras foram extraídas da mesma população (ou de populações com mesma distribuição), sendo sensível a qualquer diferença nas distribuições - diferenças de locação (tendência central), na dispersão, na assimetria, etc.

Método

1) Construimos uma distribuição de frequência cumulativa para cada amostra de observações, utilizando os mesmos intervalos para ambas as distribuições. Não é necessário que o número de casos seja igual nas amostras.

2) Para cada intervalo subtraímos uma função da outra.

3) A prova testa o maior desses desvios constatados.

Fórmula para cálculo da diferença significativa

$$\underline{D} = 1,36 \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$$

onde: \underline{D} = diferença significativa.

n_1 = número de casos na amostra 1.

n_2 = número de casos na amostra 2.

1,36 = valor da Tabela para cálculo da significância a nível de 5%.

O valor de \underline{D} é testado contra o valor obtido de acordo com o item 3 de Método.

5. RESULTADOS

5.1. Parassexualidade

5.1.1. Obtenção de colônias prototróficas

Na Tabela 2 estão resumidos os resultados obtidos nos cruzamentos efetuados de acordo com os itens 4.6.1. e 4.6.2. Como pode ser verificado apenas o procedimento usando 4% de meio completo foi eficiente e, portanto, foi utilizado nos demais cruzamentos.

5.1.2. Caracterização das colônias prototróficas

A caracterização das colônias foi feita inicialmente pelos critérios de diâmetro de conídios (item 4.8.1.) e crescimento em Meio Completo contendo 2 µg/ml de Benlate (item 4.6.3). Os resultados obtidos estão na Tabela 3. Foram constatados 2 tipos de colônias prototróficas, *CS* (com setores) e *AS* (ausência de setores), de acordo com os dados obtidos no teste em Benlate e na medida do diâmetro de conídios.

No cruzamento 3x5 foram obtidos os 2 tipos de colônias.

As colônias prototróficas usadas no presente trabalho, que evidenciaram segregação em Benlate, posteriormente tiveram o número de núcleos em conídios estimado de acordo com o ítem 4.8.2. Os dados estão na Tabela 4, junto com os resultados obtidos com as linhagens parentais, inclusive a 10v10.

5.1.3. Segregação das linhagens prototróficas

As linhagens prototróficas, que pelos critérios citados nos ítems anteriores puderam ser discriminadas inequivocamente das linhagens parentais - tipo *CS*, foram denominadas diplóides, e destas segregantes foram obtidos após o tratamento com Benlate (ítem 4.6.3) para estudar a heterozigose das marcas genéticas envolvidas nos cruzamentos.

As Tabelas 5 e 6 resumem as observações feitas nos segregantes do diplóide nic₁//pab₁fwn₁. Os resultados indicam ligação entre os genes fwn₁ e nic₁.

Os segregantes do diplóide pur₁//pir₁olv₁ estão discriminados nas Tabelas 7 e 8 e, na Figura 2. Pode ser verificado que não há ligação entre as marcas genéticas e, que o diâmetro dos conídios dos segregantes é semelhante ao constatado para as linhagens parentais.

Na Tabela 9 estão os segregantes do diplóide 1 do cruzamento tia₁fwn₃//pir₁olv₁ e, na Tabela 10, os segregantes do diplóide 2 do mesmo cruzamento. Pode ser evidenciado que o diplóide 1 só segregou para o gene fwn₃ e, o diplóide 2 segregou os genes fwn₃, tia₁ e pir₁. Não houve evidências de ligação entre os genes considerados.

5.2. Produção de ácido cítrico

As linhagens utilizadas no presente trabalho foram ensaiadas quanto à produção de ácido cítrico de acordo com os itens 4.7.1 e 4.7.2 e seus sub-ítems.

5.2.1. Das reversões dos mutantes auxotróficos

Os revertentes estudados foram isolados dos mutantes auxotróficos de acordo com o ítem 4.5.

Nas Tabelas 11, 12 e 13, estão os resultados obtidos com os revertentes espontâneos dos mutantes pur₁ - purR₁ e purR₂, e pir₁ - pirR₁ a pirR₄ comparados com as linhagens auxotróficas e a linhagem 10v10. Pode ser notado que existem revertentes com produção igual ou menor que a linhagem 10v10, e outros com produção intermediária entre as linhagens parentais auxotróficas e prototróficas.

Nas Tabelas 14, 15 e 16, estão os resultados obtidos com as reversões espontâneas - E₁ e E₂, e induzidas - I₁ a I₁₁ - com luz ultravioleta do mutante nic₁ comparadas com a linhagem auxotrófica e a linhagem parental 10v10. Neste caso os revertentes espontâneos não diferem das linhagens parentais, enquanto que os induzidos foram iguais às parentais, caso dos revertentes I₁ a I₄ e I₆, I₇ e I₁₀ com a linhagem 10v10 e de todos, menos I₃, com nic₁. Três dos revertentes - I₈, I₉ e I₁₁ - produziram menos que a 10v10.

5.2.2. Dos diplóides

Os diplóides caracterizados de acordo com os

procedimentos relatados em 5.1.2, foram ensaiados quanto à produção de ácido cítrico, com os resultados discriminados nas Tabelas 17, 18, 23 e 27. Os diplóides obtidos não produziram mais ácido cítrico que as parentais auxotróficas, exceto os obtidos do cruzamento entre tia₁fwn₃ e pir₁olv₁, que diferem significativamente da linhagem pir₁olv₁. Os obtidos do cruzamento entre pur₁ e pir₁olv₁ diferem significativamente da linhagem 10v10, o que não ocorre com os obtidos nos demais cruzamentos.

5.2.3. Dos segregantes de diplóides

5.2.3.1. Diplóide nic₁//pab₁fwn₁

Os resultados obtidos com os segregantes estão discriminados nas Tabelas de 19 a 22 e Figura 3, comparados com as linhagens parentais. Como pode ser observado não há diferença significativa entre os segregantes e as linhagens parentais, com os segregantes prototróficos produzindo mais ácido cítrico que os auxotróficos.

5.2.3.2. Diplóide pur₁//pir₁olv₁

Nas Tabelas 23 a 25 estão os dados obtidos com os segregantes comparados com as linhagens parentais. Os segregantes são semelhantes estatisticamente quanto à quantidade de ácido cítrico acumulada, às linhagens auxotróficas e ao diplóide que lhes deu origem, diferindo da linhagem 10v10.

5.2.3.3. Diplóide 1 tia₁fwn₃//pir₁olv₁

Os resultados obtidos, com a comparação com as linhagens parentais, estão sumariados nas Tabelas 26 a 28. Os segregantes testados são diferentes significativamente da linhagem pir₁olv₁.

TABELA 2 - Frequência de colônias prototróficas em cruzamentos de linhagens de *Aspergillus niger*.

LINHAGENS NO CRUZAMENTO *	MÉTODO	COLÔNIAS PROTOTRÓFICAS (POR 10 ⁶ CONÍDIOS)
<u>nic</u> ₁ x <u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁	I **	9
	II	0
<u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₂ x <u>tia</u> ₁ <u>fwn</u> ₃	I	30
	II	0
<u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁ x <u>tia</u> ₁ <u>fwn</u> ₃	I	81
	II	0
<u>nic</u> ₁ x <u>tia</u> ₁ <u>pir</u> ₃	I	1 ***
	II	0

* , para símbolos das linhagens ver FIGURA 1.

** , métodos I - MM + 4% de MC

II - MM + 2% de MC (item 4.2.2.e)

*** , obtida apenas uma colônia prototrófica e a suspensão de conídios não foi contada.

TABELA 3 - Diâmetro de conídios e crescimento em Benlate das colônias prototróficas comparadas com as linhagens parentais.

LINHAGENS *	CRESCIMENTO BENLATE (2 µg/ml)**	DIÂMETRO (µm)	RELAÇÃO DIÂMETRO PROTÓRFICAS / PARENTAIS
1. <u>nic</u> ₁	AS	4,29	
2. <u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁	AS	4,23	
3. <u>pir</u> ₁ <u>olv</u> ₁	AS	4,13	
4. <u>tia</u> ₁ <u>pir</u> ₃	AS	3,81	
5. <u>tia</u> ₁ <u>fwn</u> ₃	AS	4,26	
6. <u>pur</u> ₁	AS	3,69	
7. cruzamento 1x2	CS	5,03	1,17 - 1,19
8. cruzamento 1x3	a ^{***} AS	3,98	0,93 - 0,96
	b AS	4,46	1,04 - 1,08
	c AS	4,22	0,98 - 1,02
9. cruzamento 1x4	CS	4,70	1,09 - 1,23
10. cruzamento 2x3	a AS	3,98	
	b AS	3,98	0,94 - 0,96
	c AS	3,98	
11. cruzamento 2x4	a AS	4,22	0,99 - 1,11
	b AS	4,46	1,05 - 1,17
	c AS	3,98	0,94 - 1,04
12. cruzamento 3x4	a AS	4,71	1,14 - 1,24
	b AS	3,98	0,96 - 1,04
	c AS	3,72	0,90 - 0,98
13. cruzamento 3x5	a CS	5,31	1,25 - 1,29
	b AS	4,30	1,01 - 1,04
14. cruzamento 3x6	CS	4,81	1,16 - 1,31

* , para símbolo das linhagens ver FIGURA 1.

, AS, significa colônias sem setores e crescimento com bordas regulares e,

CS, significa colônias com setores e crescimento com bordas irregulares.

c, indicam 3 colônias isoladas independentemente.

TABELA 4 - Número de núcleos em conídios de linhagens prototróficas e mutantes de *Aspergillus niger*.

LINHAGENS	CONÍDIOS			
	DIÂMETRO (μ m)	NÚMERO DE NÚCLEOS		
		1	2	3
10v10	5,35	33,11**	65,57	1,32
<u>nic</u> ₁	4,29	56,63	42,71	0,66
<u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁	4,23	76,10	23,90	-
<u>pur</u> ₁	3,69	90,20	9,80	-
<u>pir</u> ₁ <u>olv</u> ₁	4,13	84,06	15,94	-
<u>tia</u> ₁ <u>fwn</u> ₃	4,26	68,99	31,01	-
<u>nic</u> ₁ // <u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁ **	5,03	78,32	20,28	1,40
<u>pur</u> ₁ // <u>pir</u> ₁ <u>olv</u> ₁	4,81	77,02	21,74	1,24
<u>tia</u> ₁ <u>fwn</u> ₃ // <u>pir</u> ₁ <u>olv</u> ₁	5,31	71,59	27,27	1,14

* representado em porcentagem de conídios com 1, 2 ou 3 núcleos.

** a notação indica linhagens parentais cruzadas para obtenção das linhagens prototróficas.

TABELA 5 - Característica morfológica. (coloração de conídios) e auxotrofias dos segregantes isolados do diplóide nic₁//pab₁fwn₁.

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS	AUXOTROFIA		SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS	AUXOTROFIA		SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS	AUXOTROFIA	
		pab*	nic*			pab	nic			pab	nic
1	fwn*	-	+	21	fwn	-	+	41	fwn	+	+
2	fwn	+	+	22	fwn	+	+	42	fwn	+	+
3	fwn	+	+	23	fwn	+	+	43	fwn	-	+
4	fwn	/**	/	24	fwn	+	+	44	fwn	+	+
5	fwn	/	/	25	fwn	+	+	45	fwn	-	+
6	fwn	-	+	26	fwn	+	+	46	fwn	+	+
7	fwn	+	+	27	fwn	+	+	47	fwn	+	+
8	fwn	-	+	28	preta	+	-	48	fwn	-	+
9	fwn	-	+	29	fwn	+	+	49	fwn	-	+
10	fwn	+	+	30	fwn	+	+	50	fwn	-	+
11	fwn	+	+	31	fwn	+	+	51	fwn	-	+
12	fwn	+	+	32	preta	-	-	52	fwn	+	+
13	fwn	-	+	33	fwn	+	+	53	fwn	+	+
14	fwn	+	+	34	fwn	-	+	54	fwn	+	+
15	fwn	/	/	35	fwn	-	+	55	fwn	+	+
16	fwn	-	+	36	fwn	+	+	56	fwn	+	+
17	fwn	-	+	37	fwn	-	+	57	fwn	-	+
18	fwn	-	+	38	preta	-	-	58	fwn	+	+
19	fwn	+	+	39	fwn	-	+	59	fwn	-	+
20	fwn	+	+	40	fwn	+	+	60	fwn	+	+

*. para símbolos de coloração de conídios e auxotrofias ver FIGURA 1.

Os sinais + e - significam, respectivamente, prototrofia e auxotrofia para as marcas genéticas ensaiadas.

** Segregantes perdidos.

TABELA 6 - Análise mitótica do diplóide nic₁//pab₁fwn₁.

MARCADOR		MARCADOR	
		<u>nic</u>	
		+	-
<u>pab</u>	+	33	1
	-	21	2
		<u>fwn</u>	
		+	-
<u>pab</u>	+	1	33
	-	2	21
		<u>fwn</u>	
		+	-
<u>nic</u>	+	0	54
	-	3	0

Observação: Os segregantes analisados, num total de 57, estão discriminados na Tabela 5.

TABELA 7 - Característica morfológica (coloração de conídios) e auxotrofias dos segregantes isolados do diplóide $pur_1//pir_1olv_1$.

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS	AUXOTROFIAS *	
		<u>pir</u>	<u>pur</u>
1	preta	+	+
2	oliva	-	+
3	oliva	+	+
4 **	oliva	-	+
5	preta	+	+
6	oliva	+	+
7	oliva	+	+
8	preta	+	+
9	oliva	-	+
10	oliva	+	+
11	oliva	+	+
12	oliva	-	+
13	preta	+	+
14	preta	-	-

* , para símbolos das auxotrofias ver FIGURA 1. Os sinais + e - significam, respectivamente, prototrofia e auxotrofia para as marcas genéticas ensaiadas.

** , o segregante nº 4 durante a análise genética originou, espontaneamente, outro segregante com conídios marrons que apresentava a mesma deficiência nutricional (auxotrofia) do original.

TABELA 8 - Análise mitótica do diplóide pur₁//pir₁olv₁

MARCADOR		MARCADOR	
		<u>pur</u>	
		+	-
<u>pir</u>	+	9	0
	-	4	1
			<u>olv</u>
		+	-
<u>pir</u>	+	4	5
	-	1	4
			<u>olv</u>
		+	-
<u>pur</u>	+	4	9
	-	1	0

Observação: Os segregantes analisados, num total de 14, estão discriminados na Tabela 7.

figura 2

REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO DIÂMETRO MÉDIO DE CONÍDIOS DAS LINHAGENS PARENTAIS E HISTOGRAMA DOS DIÂMETROS DOS SEGREGANTES

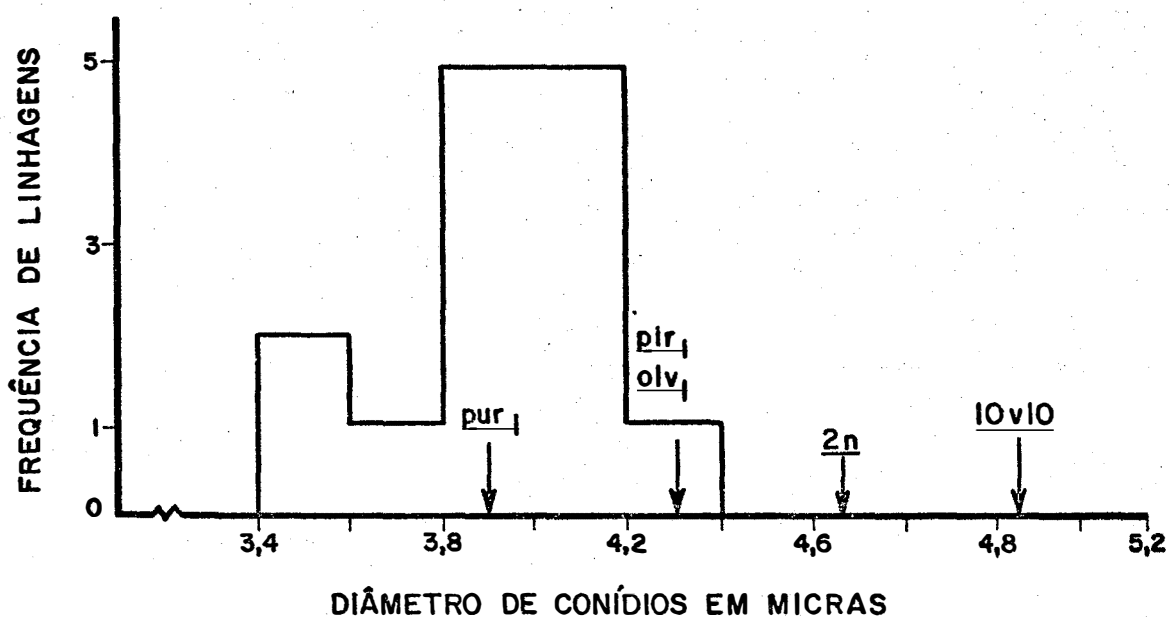


TABELA 9 - Característica morfológica (coloração de conídios) e auxotrofias dos segregantes isolados do diplóide 1 (tia₁fwn₃//pir₁olv₁)

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS	AUXOTROFIAS *		SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS	AUXOTROFIAS	
		<u>pir</u>	<u>tia</u>			<u>pir</u>	<u>tia</u>
1	fwn	+	+	16	fwn	+	+
2	fwn	+	+	17	fwn	+	+
3	fwn	+	+	18	fwn	+	+
4	fwn	+	+	19	fwn	+	+
5	fwn	+	+	20	fwn	+	+
6	fwn	+	+	21	fwn	+	+
7	fwn	+	+	22	fwn	+	+
8	fwn	+	+	23	fwn	+	+
9	fwn	+	+	24	fwn	+	+
10	fwn	+	+	25	fwn	+	+
11	fwn	+	+	26	fwn	+	+
12	fwn	+	+	27	fwn	+	+
13	fwn	+	+	28	fwn	+	+
14	fwn	+	+	29	fwn	+	+
15	fwn	+	+	30	fwn	+	+

* , Para significado dos símbolos de coloração de conídios e auxotrofias ver FIGURA 1. Os sinais + e - significam, respectivamente, prototrofia e auxotrofia para as marcas genéticas ensaiadas.

TABELA 10 - Característica morfológica (coloração de conídios) e auxotrofias dos segregantes isolados do diplóide 2 [tia₁fwn₃//pir₁olv₁]

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS *	AUXOTROFIAS *	
		<u>pir</u>	<u>tia</u>
1	fwn	+	+
2	fwn	-	+
3	fwn	+	+
4	fwn	+	+
5	fwn	+	+
6	fwn	+	+
7	fwn	+	-
8	fwn	+	-
9	fwn	+	-
10	fwn	+	+
11	fwn	+	+
12	fwn	+	+
13	fwn	+	+

*, para significado dos símbolos de coloração de conídios e auxotrofias ver FIGURA 1. Os sinais + e -, significam, respectivamente, prototrofia e auxotrofia para as marcas genéticas ensaiadas.

TABELA 11 - Produção de ácido cítrico de mutantes auxotrófi -
cos e suas reversões comparadas com a linhagem pa
rental 10v10

LINHAGENS	REPETIÇÕES	
	I	II
10v10	9,6 ***	9,3
<u>pur</u> ₁ *	0,3	0,6
<u>pir</u> ₁	0,4	0,5
<u>purR</u> ₁ **	11,8	6,1
<u>purR</u> ₂	4,7	6,4
<u>pirR</u> ₁	6,8	8,9
<u>pirR</u> ₂	4,1	3,8
<u>pirR</u> ₃	0,6	0,4
<u>pirR</u> ₄	0,4	0,6

* , para significado dos símbolos das linhagens parentais ver FIGURA 1.

** , símbolos indicam reversões dos mutantes pur₁ - purR e pir₁ - pirR.

*** , produção de ácido cítrico expressa em ml de NaOH 0,1 N (item 4.7.2.31).

TABELA 12 - Análise da variância dos dados da Tabela 11.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	8	241,670	30,20875	13,543 **
RESÍDUO	9	20,075	2,23055	
TOTAL	17			

** , diferença significativa ao nível de 1%.

TABELA 13 - Teste de médias dos dados da Tabela 11.

LINHAGENS	MÉDIAS
10v10	9,45 a *
<u>pur</u> ₁	8,95 a b
<u>pir</u> ₁	7,85 b c
<u>pur</u> ₂	5,55 b c d
<u>pir</u> ₂	3,95 d e
<u>pir</u> ₃	0,50 e
<u>pir</u> ₄	0,50 e
<u>pur</u> ₁	0,45 e
<u>pir</u> ₁	0,45 e

* , linhagens com a mesma letra não diferem significativamente a nível de 5% pelo teste de DUNCAN (PIMENTEL GOMES 1966).

TABELA 14 - Produção de ácido cítrico da linhagem auxotrófica nic₁ e de suas reversões espontâneas (E) e induzidas (I) por luz ultravioleta (UV) comparadas com a linhagem parental 10v10

LINHAGENS	REPETIÇÕES	
	I	II
10v10	18,1*	12,6
<u>nic₁</u>	8,7	9,9
E ₁	14,9	10,2
E ₂	18,8	10,6
I ₁	20,0	13,9
I ₂	8,4	8,9
I ₃	16,3	17,8
I ₄	17,9	13,5
I ₆	10,1	9,0
I ₇	12,5	13,5
I ₈	5,2	6,6
I ₉	6,4	8,8
I ₁₀	9,1	14,5
I ₁₁	6,7	4,9

* , produção de ácido cítrico expressa em ml de NaOH 0,1 N (ítem 4.7.2.3).

TABELA 15 - Análise da variância dos dados da Tabela 14

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	13	403,75	31,0577	3,9098*
RESÍDUO	14	111,21	7,9436	

* , significativo ao nível de 5%.

TABELA 16 - Teste de médias dos dados da Tabela 14.

LINHAGENS	MÉDIAS
I ₃	17,05 a [*]
I ₁	16,95 a b
I ₄	15,70 a b c
10v10	15,35 a b c d
E ₂	14,70 a b c d e
I ₇	13,00 a b c d e f
E ₁	12,55 a b c d e f g
I ₁₀	11,80 a b c d e f g
I ₆	9,55 b c d e f g
<u>nic</u> ₁	9,30 b c d e f g
I ₂	8,65 d e f g
I ₉	7,60 f g
I ₈	5,90 g
I ₁₁	5,80 g

* , linhagens com a mesma letra não diferem significativamente a nível de 5% pelo teste de DUNCAN (PIMENTEL GOMES , 1966).

TABELA 17 - Produção de ácido cítrico dos diplóides nic₁//pab₁fwn₁, comparada com as linhagens parentais.

LINHAGENS*	REPETIÇÕES			PRODUÇÃO MÉDIA	AMPLITUDE TOTAL
	I	II	III		
10v10	13,0**	13,9	9,4	12,1	4,5
<u>pab₁fwn₁</u>	9,1	11,7	9,9	10,2	2,6
<u>nic₁</u>	10,0	8,8	10,2	9,7	1,4
<u>npf 1</u> ***	7,7	12,1	10,6	10,1	4,4
<u>npf 7</u>	15,7	14,4	13,5	14,5	2,2
<u>npf 9</u>	11,8	16,1	11,2	13,0	4,9
<u>npf 12</u>	14,8	13,0	13,0	13,6	1,8
<u>npf 16</u>	12,1	15,4	13,3	13,6	3,3
<u>npf 27</u>	10,2	10,4	16,8	12,5	6,6
<u>npf 28</u>	13,3	9,8	12,1	11,7	3,5
<u>npf 29</u>	11,5	17,1	12,7	13,8	5,6
<u>npf 35</u>	15,0	14,1	9,5	12,9	5,5
<u>npf 47</u>	9,7	12,6	11,9	11,4	2,9
<u>npf 48</u>	12,8	12,8	9,9	11,8	2,9
<u>npf 50</u>	10,5	12,9	13,0	12,1	2,5
<u>npf 60</u>	9,6	11,7	11,4	10,9	2,1
<u>npf 61</u>	10,5	11,1	11,5	11,0	1,0

* , para símbolos das linhagens ver FIGURA 1.

** , produção de ácido cítrico expressa em ml de NaOH 0,1 N (ítem 4.7.2.3).

*** , notação indicando diplóide; os números indicam diferentes isolados.

Observação: os dados foram comparados pela Prova de KRUSKAL-WALLIS com $H_c = 21,072$ ^{ns} a 5% comparado com o valor da tabela de qui-quadrado com 16 GL, que é igual a 26,30.

TABELA 18 - Produção de ácido cítrico de diplóides pur₁//
pir₁olv₁ comparada com a das linhagens parentais

LINHAGENS	REPETIÇÃO			PRODUÇÃO MÉDIA
	I	II	III	
<u>pop₁</u> *	0,3	0,4	0,3	0,33 ***
pop ₂	0,3	0,3	0,3	0,30
<u>pur₁</u> **	0,5	0,4	0,4	0,43
<u>pir₁olv₁</u>	0,3	0,4	0,3	0,33

* notação indicando diplóides; os numeros indicam diferentes diplóides.

** para símbolos das linhagens ver FIGURA 1.

*** produção de ácido cítrico expressa em ml de NaOH 0,1N (item 4.7.2.3).

TABELA 19 - Produção de ácido cítrico das linhagens parentais dos segregantes da Tabela 5.

REPETIÇÕES	LINHAGENS	
	<u>nic₁</u>	<u>pab₁fwn₁</u>
1	10,7*	9,0
2	6,2	18,7
3	12,4	8,6
4	8,6	5,1
5	11,5	4,8
6	10,8	11,4
7	9,3	8,0
8	10,0	8,2
9	11,0	10,7
10	10,0	8,1
11	11,9	5,8
12	8,2	9,8
13	5,5	6,5
14	10,2	10,0
15	5,8	8,6
16	9,7	11,3
17	8,2	9,3
18	- **	17,2

* produção de ácido cítrico expressa em ml de NaOH 0,1 N (item 4.7.2.3)

** ,frasco de fermentação perdido.

TABELA 20 - Produção de ácido cítrico dos segregantes obtidos do diplóide nic₁//pab₁fwn₁ citados na Tabela 5.

SEGREGANTE Nº	PRODUÇÃO	SEGREGANTE Nº	PRODUÇÃO	SEGREGANTE Nº	PRODUÇÃO
1	5,0*	21	11,4	41	9,0
2	10,5	22	9,3	42	-**
3	8,9	23	8,4	43	8,7
4	17,6	24	6,2	44	11,7
5	9,5	25	13,8	45	-
6	18,0	26	10,0	46	16,7
7	10,1	27	10,3	47	5,3
8	5,0	28	7,4	48	-
9	9,3	29	13,2	49	6,6
10	10,6	30	10,2	50	6,0
11	9,6	31	10,3	51	-
12	13,5	32	8,5	52	-
13	11,7	33	12,6	53	13,2
14	10,7	34	6,0	54	7,7
15	8,0	35	8,0	55	7,2
16	11,1	36	6,0	56	16,7
17	8,4	37	10,0	57	7,9
18	9,5	38	7,5	58	-
19	9,2	39	6,4	59	-
20	10,2	40	9,0	60	-

* , produção de ácido cítrico expressa em ml de NaOH 0,1 N (ítem 4.7.2.31).

** , frascos de fermentação perdidos.

figura 3
REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO
DAS LINHAGENS PARENTAIS E SEGREGANTES

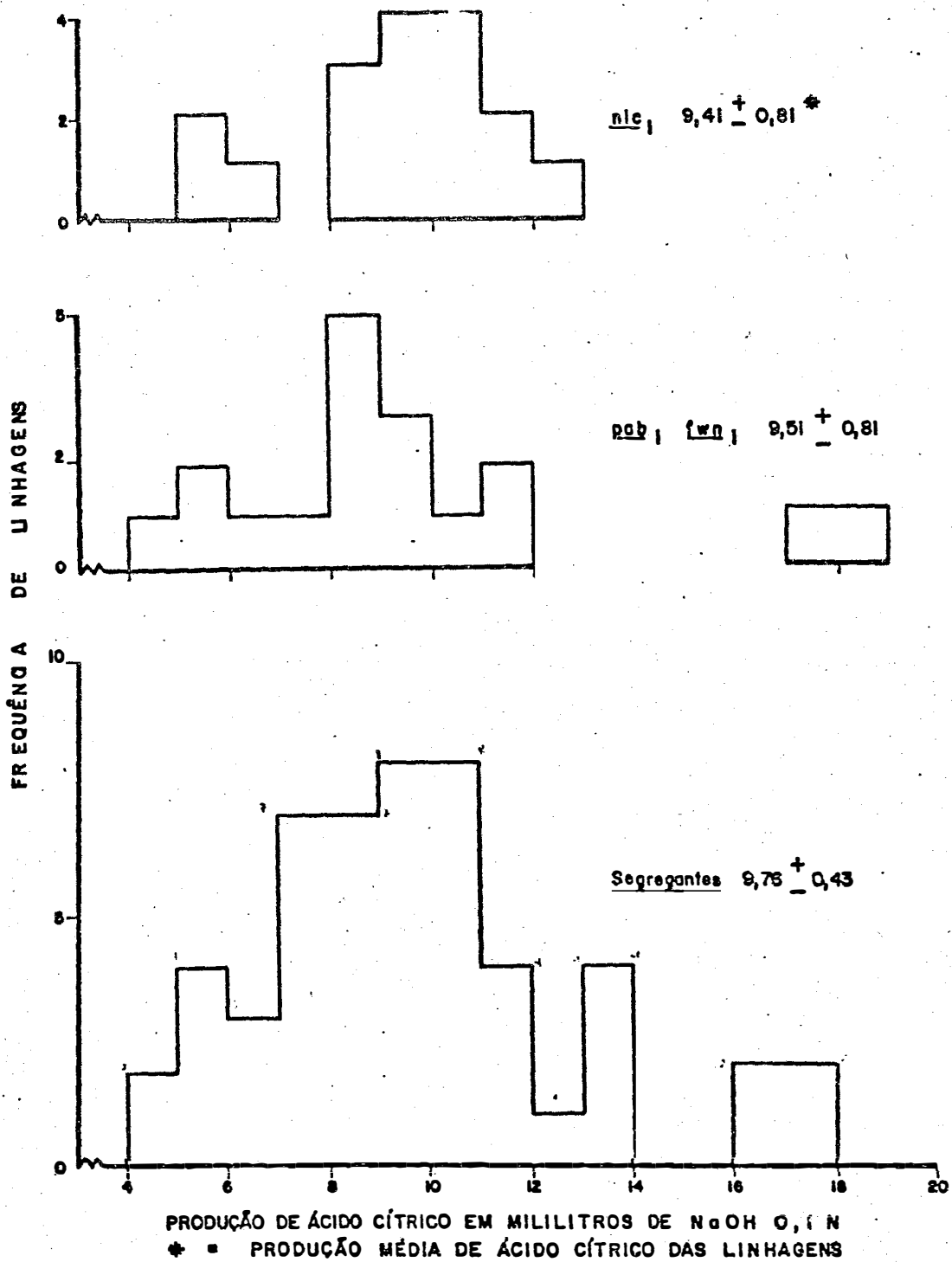


TABELA 21 - Prova de KOLMOGOROV-SMIRNOV com as distribuições dos dados da FIGURA 3.

LINHAGENS					
LINHAGENS	<u>nic</u> ₁	<u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁		SEGREGANTES	
<u>nic</u> ₁	-	0,4599	0,2027 ^{ns}	0,3799	0,1539 ^{ns}
<u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁			-	0,3719	0,1262 ^{ns}
SEGREGANTES					-

Os valores discriminados são, em ordem: 1º) calculado (item 4.9.2) e 2º) máxima diferença entre as distribuições.

ns , diferença não significativa a nível de 5%.

Observação: foi feito teste entre a distribuição de segregantes auxotróficos contra distribuição de segregantes prototróficos sendo obtido o resultado 0,3953 0,3517^{ns}.

TABELA 22 - Teste dos dados das Tabelas 19 e 20 de acordo com o procedimento da prova de KRUSKAL-WALLIS.

LINHAGENS	LINHAGENS			
	<u>nic</u> ₁	<u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁	SEGREGANTES PROTOTRÓFICOS	SEGREGANTES AUXOTRÓFICOS
<u>nic</u> ₁	-	0,6538 ^{ns}	0,7025 ^{ns}	2,337 ^{ns}
<u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁		-	2,1990 ^{ns}	0,271 ^{ns}
SEGREGANTES PROTOTRÓFICOS			-	6,361 [*]
SEGREGANTES AUXOTRÓFICOS				-

* , diferença significativa ao nível de 2%.

TABELA 23 - Produção de ácido cítrico dos segregantes citados na Tabela 7 obtidos dos diplóides $\underline{\text{pur}}_1 // \underline{\text{pir}}_1 \underline{\text{olv}}_1$ comparada com as linhagens parentais.

LINHAGENS	REPETIÇÕES	
	I	II
10v10	18,1 *	12,6
$\underline{\text{S}}_5$	2,4	0,8
$\underline{\text{S}}_{13}$	1,9	1,3
$\underline{\text{S}}_8$	1,1	0,2
$\underline{\text{S}}_{15}$	0,6	0,3
$\underline{\text{S}}_6$	0,4	0,3
$\underline{\text{pur}}_1$	0,4	0,3
$\underline{\text{pir}}_1 \underline{\text{olv}}_1$	0,4	0,3
$\underline{\text{S}}_4$	0,3	0,3
$\underline{\text{S}}_3$	0,4	0,2
$\underline{\text{S}}_1$	0,3	0,3
$\underline{\text{pur}}_1 // \underline{\text{pir}}_1 \underline{\text{olv}}_1$	0,3	0,3
$\underline{\text{S}}_{14}$	0,3	0,2
$\underline{\text{S}}_{12}$	0,2	0,2
$\underline{\text{S}}_{10}$	0,2	0,2
$\underline{\text{S}}_{11}$	0,2	0,2
$\underline{\text{S}}_9$	0,2	0,2
$\underline{\text{S}}_7$	0,2	0,2
$\underline{\text{S}}_2$	0,2	0,2

*, produção de ácido cítrico expressa em ml de NaOH 0,1 N (item 4.7.2.3).

TABELA 24 - Análise da variância dos dados da Tabela 23.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	18	427,223	23,735	27,503*
RESÍDUO	19	17,255	0,863	
TOTAL	37			

*, significativo ao nível de 5%.

TABELA 25 - Teste de médias dos dados da Tabela 23.

LINHAGENS	MÉDIAS
10v10	15,35 a*
<u>S</u> ₅	1,60 b
<u>S</u> ₁₃	1,60 b
<u>S</u> ₈	0,65 b
<u>S</u> ₁₅	0,45 b
<u>S</u> ₆	0,35 b
<u>pur</u> ₁	0,35 b
<u>pir</u> ₁ <u>olv</u> ₁	0,35 b
<u>S</u> ₄	0,30 b
<u>S</u> ₃	0,30 b
<u>S</u> ₁	0,30 b
<u>pur</u> ₁ // <u>pir</u> ₁ <u>olv</u> ₁	0,30 b
<u>S</u> ₁₄	0,25 b
<u>S</u> ₁₂	0,20 b
<u>S</u> ₁₀	0,20 b
<u>S</u> ₁₁	0,20 b
<u>S</u> ₉	0,20 b
<u>S</u> ₇	0,20 b
<u>S</u> ₂	0,20 b

* , linhagens com a mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de DUNCAN (PIMENTEL GOMES, 1966).

TABELA 26 - Produção de ácido cítrico de diplóides tia₁fwn₃//
pir₁olv₁ e segregantes (S) comparados com linha-
gens parentais.

LINHAGENS	REPETIÇÕES	
	I	II
10v10	5,2***	10,6
<u>tia₁fwn₃</u>	6,9	8,8
<u>pir₁olv₁</u>	0,3	0,4
<u>tfpo</u> 4*	6,0	11,5
<u>tfpo</u> 5	7,4	15,0
<u>tfpo</u> 6	9,5	10,4
<u>tfpo</u> 3	5,9	10,6
<u>tfpo</u> 1	5,5	9,4
<u>S51</u> **	5,7	7,6
<u>S61</u>	8,0	7,9
<u>S81</u>	6,2	10,5
<u>S111</u>	4,1	4,7
<u>S121</u>	5,1	6,4

* , notação indicando diplóide; os números indicam diferentes diplóides.

** , notação indicando segregantes; todos os segregantes fo-
ram isolados do mesmo diplóide tfpo 1, e os números que
precedem 1 indicam a ordem de isolamento dos setores.

*** , produção de ácido cítrico expressa em ml de NaOH 0,1 N.

TABELA 27 - Análise da variância dos dados da Tabela 26.

PONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
BLOCOS	1	56,130	56,130	17,383**
TRATAMENTOS	11	173,850	15,805	4,895*
RESÍDUO	11	35,520	3,229	
TOTAL	23			

* e ** , diferenças significativas ao nível de 5% e 1%, respectivamente.

TABELA 28 - Teste das médias dos dados da Tabela 26.

LINHAGENS	MÉDIAS
<u>tfpo</u> 5	11,20 a *
<u>tfpo</u> 6	9,95 a b
<u>tfpo</u> 4	8,75 a b c
<u>S81</u>	8,35 a b c
<u>tfpo</u> 3	8,25 a b c
<u>S61</u>	7,95 a b c
10v10	7,90 a b c
<u>tia₁fwn₃</u>	7,85 a b c
<u>tfpo</u> 1	7,45 a b c
<u>S51</u>	6,65 b c
<u>S121</u>	5,75 b c
<u>S111</u>	4,40 c
<u>pir₁olv₁</u>	0,35 d

* ,linhagens com a mesma letra nao diferem significativamente a 5% pelo teste de DUNCAN (PIMENTEL GOMES, 1966).

6. DISCUSSÃO

6.1. Parassexualidade

6.1.1. Obtenção de colônias prototróficas

O método de ROPER (1952) utiliza-se da complementação das marcas genéticas recessivas para o isolamento de diplóides em fungos filamentosos. Esta característica estabelece critérios seletivos fáceis de serem usados, como são os casos da prototrofia e o da característica morfológica, principalmente a coloração de conídios. Estes critérios permitem que, após a semeadura em meio mínimo (MM) de grande número de conídios provenientes de heterocários, haja rápida evidência das colônias que possam ser diplóides. Estas, são melhor caracterizadas posteriormente, com o uso dos critérios indicados no item 3.2.

Nos cruzamentos efetuados no presente trabalho pelo método de ROPER (1952), foram obtidas colônias prototróficas, e nos casos específicos, com complementação das mutações que alteram a coloração de conídios, após modificação da mistura que foi usada na obtenção de micélio heterocariótico

com o aumento na quantidade de meio completo (MC) adicionada ao MM. Estes dados confirmam a observação de BONATELLI JR, (1977), que não conseguiu isolar colônias prototróficas cruzando mutantes da linhagem 10v10 usando MM com 2% de MC, e a utilidade do método descrito por ROPER (1952), usado anteriormente em outras linhagens de *A. niger* por vários pesquisadores (ver item 3.1).

Os resultados sugerem que há necessidade de maior quantidade de MC para que haja formação de heterocários com fusão efetiva de hifas, permitindo com isto que haja formação de linhagens prototróficas por fusão de núcleos.

A frequência de linhagens prototróficas variou conforme o cruzamento, e em todos os casos, foi superior aos dados relatados na literatura. Considerando a maior frequência relatada - 4,6 diplóides por 10^{-6} conídios provenientes de heterocários - os dados obtidos superam-na em, no mínimo 1,9 e, no máximo, 17 vezes. Esta constatação na linhagem 10v10 pode ser explicada por: I) ocorrência de maior número de fusões de núcleos nos cruzamentos estudados, originando consequentemente, maior número de conídios prototróficos, II) fusão precoce de núcleos, formando pela multiplicação do produto da fusão, grande número de conídios prototróficos, que podem ser considerados como produtos de eventos independentes. Esta hipótese pode ser reforçada pela observação de que dos heterocários de alguns cruzamentos - por exemplo, pur₁ x pir₁olv₁ - apareceram setores que mostraram serem diplóides, e III) pela reunião das duas hipóteses anteriores.

A contagem de colônias heterocarióticas poderia aumentar o número de colônias prototróficas, segundo CHANG *et alii* (1974), porém, quando ocorreram no presente trabalho, puderam ser discriminadas quer seja pela segregação de núcleos diferentes, quer seja pelo crescimento restrito e irregular das colônias em MM.

6.1.2. Caracterização das colônias prototróficas

Os critérios usados permitiram separar as linhagens prototróficas obtidas em 2 tipos: I) tipo *CS* e II) tipo *AS*, de acordo com os resultados contidos nas Tabelas 3 e 4.

O tipo *CS* com a formação de setores em meio completo contendo Benlate, evidenciou heterozigose das marcas genéticas envolvidas no cruzamento feito para sua obtenção. O mesmo não ocorreu com o tipo *AS*, inclusive com o uso de concentrações de Benlate variando de 2 até 7 µg/ml de MC e, de Cloroneb e da luz ultravioleta que são também agentes recombinogênicos. Estas observações foram complementadas com os estudos de segregação efetuados posteriormente (item 5.1.3).

As medidas de diâmetro de conídios mostraram que as linhagens do tipo *CS* têm, em todos os casos, diâmetro de conídios maior que as linhagens parentais, exceto a 10v10. As colônias do tipo *AS* por sua vez têm, na maioria dos casos, diâmetro de conídios semelhante ao das parentais, com exceções observadas nas linhagens b do cruzamento 2 x 4 e a do cruzamento 3 x 4.

As linhagens *CS* estudadas mostraram ainda, menor porcentagem de conídios binucleados em relação à linhagem 10v10, apresentando como esta conídios uni, bi e trinucleados. Como consta da Tabela 4, as linhagens auxotróficas têm também menor número de binucleados, porém, a porcentagem é bastante variável ao contrário da encontrada nas linhagens *CS*, que situou-se entre 20 e 27%. Estes resultados podem explicar o diâmetro de conídios encontrado na linhagem 10v10, pois ROSIM *et alii* [1978] observaram que em linhagens de *A. niger*, os conídios binucleados são maiores que os uninucleados. No caso das linhagens do tipo *CS* a causa do maior diâme

tro de conídios parece ser a duplicação do genoma.

Um estudo a ser conduzido seria a determinação do número de núcleos em conídios das linhagens *AS*, para ampliar os critérios que podem ser utilizados para discriminar os tipos de colônias isoladas nos cruzamentos efetuados. Este trabalho poderia esclarecer se as linhagens *AS* com maior diâmetro de conídios são similares à 10v10, ou se são diplóides estáveis, semelhantes aos descritos por DAS e ILCZUK (1978).

Os dados obtidos com as colônias do tipo *CS* são diferentes dos relatados por CHANG *et alii* (1974), que observaram que as linhagens prototróficas isoladas têm maior diâmetro de conídios e número de conídios binucleados que as parentais. Pelos resultados disponíveis no presente trabalho estas linhagens poderiam ser similares à 10v10. As do tipo *CS*, com menor número de conídios binucleados, são semelhantes às linhagens prototróficas isoladas em outros fungos filamentosos, como foi o caso de *Aspergillus flavus* (PAPA, 1973; MESSIAS, 1977), *Aspergillus sp.* (PEREIRA, 1978) e *Metarhizium anisopliae* (MESSIAS, 1979).

Para melhor discussão faltam dados de segregação das linhagens obtidas por CHANG *et alii* (1974), que poderiam enquadrá-las, inclusive como do tipo *AS* com maior diâmetro de conídios.

6.1.3. Segregação das linhagens prototróficas

As linhagens do tipo *CS* obtidas foram utilizadas para estudos de segregação, visando determinar a presença e relações de ligação ou independência das marcas genéticas envolvidas nos cruzamentos.

Os segregantes foram obtidos com o uso de Benlate, pois as linhagens *CS* estudadas revelaram-se bastante

estáveis com uma estimativa de 1 setor espontâneo por 16 colônias cultivadas em MC. Estes dados são semelhantes aos relatados em *A. niger* por DAS e ILCZUK (1978), que tiveram dificuldades para obter segregantes de linhagens diplóides e, os de CHANG *et alii* (1974), que não relataram segregantes de linhagens prototróficas. Em outras espécies os resultados são semelhantes aos obtidos em *Metarhizium anisopliae* (MESSIAS, 1979) e, diferem dos encontrados em *Aspergillus nidulans* (PONTECORVO *et alii*, 1953) e *Aspergillus sp.* (PEREIRA, 1978).

Os segregantes da linhagem *CS* nic₁//pab₁fwn₁ mostraram que as marcas genéticas envolvidas no cruzamento estavam presentes em heterozigose e, este foi também o caso da linhagem *CS* pur₁//pir₁olv₁, como esta resumido nas Tabelas 5 e 7, respectivamente. Os dados da Tabela 9, por sua vez, evidenciam que na linhagem *CS* 1 tia₁fwn₃//pir₁olv₁ apenas o gene fwn₃ estava presente em heterozigose, enquanto que, na linhagem *CS* 2, os dados da Tabela 10 indicam que há heterozigose para todas as marcas, exceto olv₁.

Com relação às segregações pode ainda ser dito que houve evidência de ligação entre os genes nic₁ e fwn₁ (Tabela 6), sugerindo que estes genes estejam no mesmo grupo de ligação como o constatado por LHOAS (1967) em linhagem não utilizada em indústria de *A. niger*.

No caso da linhagem *CS* pur₁//pir₁olv₁ (Tabela 7), um dos segregantes originou espontaneamente um outro "segregante" com coloração de conídios marrom-claro. Seria interessante observar a frequência de aparecimento deste derivativo, pois a ocorrência pode ser interpretada tanto como mutação espontânea, como pela presença de duplicação na região em que está contido o gene fwn. Como a origem da linhagem 10v10 é desconhecida, seria de interesse saber se a linhagem estudada apresenta aberrações cromossômicas.

A utilidade do Benlate como agente haploidizan-

te parece evidente pelos resultados relatados e os que constam da Figura 2, na qual todos os segregantes têm diâmetro de conídios semelhante às linhagens parentais pur₁ e pir₁olv₁. Os resultados são reforçados pela constatação de UMBUZEIRO e BONATELLI JR. (dados não publicados), que encontraram apenas um segregante, num total de 29, com diâmetro de conídios semelhante à linhagem CS nic₁//pab₁fwn₁. No conjunto estes dados confirmam os relatos obtidos por HASTIE (1970) em *Aspergillus nidulans*, BALL (1973) em *Penicillium chrysogenum* e UPSHALL *et alii* (1976) em *A. terreus*.

6.1.4. Discussão geral com respeito à parassexualidade na linhagem 10v10 de *A. niger*.

Os dados disponíveis, apesar das limitações, sugerem que a situação observada nesta linhagem de *A. niger*, seja similar à descrita em *Acremonium chrysogenum* por BALL e HAMLIN (1978) e em *Penicillium patulum* por CALAM *et alii* (1973).

Nos trabalhos citados foram descritos 2 tipos de colônias prototróficas: O tipo I, chamado de prototróficas estáveis, é similar ao tipo *AS* descrito neste trabalho, e o tipo II, chamado de prototróficas instáveis, é similar ao tipo *CS*. Um problema apontado pelos pesquisadores foi a dificuldade de discriminação entre linhagens haplóides e diplóides, por não disporem de critério rápido, como é o caso do diâmetro de conídios. No presente trabalho este critério parece ser válido pelos resultados obtidos no estudo dos segregantes da linhagem pur₁//pir₁olv₁ discutido anteriormente (item 6.1.3). Com esta informação podemos separar as linhagens obtidas em 3 tipos:

- a) tipo *CS* I, que seriam diplóides heterozigotos totais - caso das linhagens *CS* nic₁//

pa_b₁fwn₁ e pur₁//pir₁olv₁,

b) tipo *CS* II, que seriam diplóides heterozigotos parciais - caso das linhagens *CS* tia₁fwn₃//
pir₁olv₁ e,

c) tipo *AS*, que seriam haplóides - ver Tabela 3 para relação. Este tipo poderia ser desdobrado por resultados a serem obtidos com a estimativa de número de núcleos em conídios.

Em *A. niger* existem resultados que poderiam ser considerados semelhantes e que estão contidos nos trabalhos de LHOAS (1967), CHANG *et alii* (1974) e DAS e ILCZUK (1978). No 1º existe relato sobre a dificuldade de manutenção de linhagens diplóides, que não segregavam os genes marcadores utilizados, o que poderia ser interpretado como o isolamento de linhagens *CS* II ou *AS*. No 2º, pela ausência de relatos da segregação dos diplóides, que poderia ser explicado pela seleção de linhagens *AS* e, finalmente, no 3º, pela descrição de linhagens diplóides estáveis, por não segregarem espontaneamente após cerca de 4 meses de sub-culturas, o que as enquadraria como *AS*.

Ainda em *A. niger*, UMBUZEIRO e BONATELLI JR. (dados não publicados) obtiveram colônias *CS* II, segregando pa_b₁ e fwn₁ e colônias *AS*, após o cruzamento das linhagens pa_b₁fwn₁ e pir₁olv₁.

Em *Aspergillus nidulans*, PONTECORVO *et alii* (1953b), descreveram um diplóide que não segregava a marca panto (deficiência para ácido pantotênico) e, outro, que após algumas sub-culturas não mais segregava a marca lys (deficiência para lisina). O primeiro relato pode ser encarado como similar ao proposto para , com a ressalva que o modelo do ciclo parassexual derivou de estudos conduzidos em *A. nidulans*. O 2º, deve ser considerado como um problema impor-

tante, apesar da estabilidade constatada para as linhagens *CS*.

Quanto ao mecanismo que originaria estes tipos de linhagens prototróficas, pode ser especulada a ocorrência de alta frequência de recombinação mitótica, restrita à fase em que os núcleos diplóides estão no micélio heterocariótico, pois as linhagens isoladas mostraram-se bastante estáveis. Neste aspecto deve ser considerado que em 57 segregantes da linhagem nic₁/pab₁fwn₁ não foi observada nenhuma permuta mitótica entre os genes ligados nic₁ e fwn₁ (Tabela 6), que pode também ser interpretado como ligação absoluta.

6.1.5. Sugestões para Estudos Posteriores

Como sugestões para avaliação do proposto no item anterior relacionamos:

- 1) Estudo qualitativo e quantitativo de colônias prototróficas formadas em vários cruzamentos envolvendo diferentes linhagens de *A. niger*.
- 2) Medidas da quantidade de DNA por núcleo e do diâmetro do núcleo para verificar a ploidia das linhagens usadas e obtidas,
- 3) Obtenção de mutantes triplos com, inclusive, marcas genéticas não seletivas, e o uso da técnica de fusão de protoplastos associada com meios seletivos apropriados, como o feito por BALL e HAMLIN (1978), para verificar se existe a formação de todos os tipos possíveis de recombinantes, e

4) Estudo de isoenzimas para estudar a formação de recombinantes de outros segmentos do genoma, como também dos que têm genes marcadores.

6.2. Produção de ácido cítrico

6.2.1. Das reversões dos mutantes auxotróficos

Os resultados obtidos constantes das Tabelas de 11 a 16, nos permitem sugerir que haja efeito pleiotrópico das mutações que condicionam auxotrofia. Estes dados sugerem também, a existência de reversões verdadeiras e devidas a genes supressores pois houve, em alguns casos, revertentes com produção semelhante à linhagem 10v10 - reversão verdadeira e, outros, com produção semelhante ao mutante auxotrófico. Uma outra classe de revertentes situou-se em posição intermediária quanto à produção. Os dados são semelhantes aos relatados em *Penicillium chrysogenum* por MACDONALD *et alii* (1963).

Se este raciocínio for correto e, considerando as conclusões de POLSINELLI *et alii* (1963), estas mutações estão alterando direta ou indiretamente a biossíntese de ácido cítrico. Pode-se especular, seguindo o mesmo raciocínio, que estudos com relação à biossíntese de ácido cítrico possam ser conduzidos com estes mutantes. Outra possibilidade seria a ocorrência de revertentes com produção maior que a linhagem 10v10, o que não foi constatado no presente trabalho. Um ponto a considerar seria o estudo de reversões das linhagens portadoras do gene tia₁ que produzem cerca de 30% mais ácido cítrico que a linhagem 10v10. Em trabalhos preliminares foi observado que estas linhagens são do tipo leaky (com crescimento residual) o que impediu o isolamento de revertentes (BONATELLI JR., dados não publicados).

6.2.2. Dos diplóides e seus segregantes

De acordo com os resultados das Tabelas 17, 18 e 28, não foram obtidos diplóides com produção superior à linhagem 10v10 em qualquer dos cruzamentos efetuados. Estes resultados confirmam as observações de todos os autores que trabalharam com diplóides homocigotos com relação aos genes envolvidos na produção de ácido cítrico em *A. niger*, exceto DAS e ROY (1978), que isolaram um diplóide homocigoto produzindo significativamente mais que a linhagem parental prototrófica. O tipo de observação feita por DAS e ROY (op. cit.) também é relatada em *P. chrysogenum* por ELANDER (1966, apud SERMONTI, 1969) com relação à produção de penicilina. Esta ocorrência é frequente quando são cruzadas linhagens originando diplóides heterocigotos para os genes envolvidos na produção (item 3.3.3).

Outro dado a ser considerado, é a menor amplitude de variação observada nos diplóides nic₁//pab₁fwn₁, os quais foram isolados todos de um único heterocário. Esta observação sugere homeostasia com relação à produção em linhagens do tipo *CS*, o que poderia ser utilizado no melhoramento genético da linhagem em estudo. Esta homeostasia foi também observada em linhagens *AS* obtida por TAVARES e AZEVEDO (1974) por BONATELLI JR. (1978). Esta característica em linhagens *AS* pode ter aparecido por recombinação entre fatores originalmente presentes nas linhagens de diferentes origens que foram cruzadas.

Com relação aos segregantes obtidos do diplóide nic₁//pab₁fwn₁ os resultados das Tabelas de 19 a 22 e Figura 3, indicam que a média de produção e a distribuição constatadas não diferem significativamente das linhagens parentais. Isto indica que existe uma homogeneidade dos genes que condicionam produção elevada, pois não houve o aparecimento

de recombinantes com conseqüente transgressão na distribuição. Esta afirmativa é reforçada por não existir diferença significativa entre as produções médias e as distribuições das linhagens parentais auxotróficas, bem como, pela sua origem comum. Com relação à segregação de diplóides homozigotos para os genes envolvidos na produção, ELANDER (1966, apud SERMONTI, 1969) em *P. chrysogenum*, constatou que os segregantes parassexuais produziram sempre menos penicilina que o diplóide original.

Diferença com relação à produção foi observada entre os segregantes prototróficos e auxotróficos, mas não quanto à distribuição (ver Tabelas 21 e 22). Isto reforça o observado com relação às reversões de marcas auxotróficas que sugeriram efeito pleiotrópico das mesmas, conforme discussão no item 6.2.1.

Nos diplóides pop (pur₁//pir₁olv₁), de acordo com os dados das Tabelas 18, 23 e 25, a produção foi semelhante às parentais auxotróficas, sendo porém, significativamente diferente da linhagem 10v10. Considerando os resultados obtidos com as reversões das auxotrofias, poderíamos esperar que os diplóides, por apresentarem complementação das marcas genéticas recessivas, mostrariam produção similar à linhagem parental prototrófica. O resultado deveria ser semelhante ao observado com os diplóides nic₁//pab₁fwn₁, e o relatado por vários autores que estudaram complementação em diplóides de *A. niger* (CHANG e TERRY, 1973; DAS e ROY, 1978; SHCHERBAKOVA e RESVAYA, 1978). Isto não ocorreu, inclusive com os segregantes obtidos, os quais, mesmo sendo em alguns casos prototróficos, produziram ácido cítrico em quantidade semelhante às parentais auxotróficas. Por estes resultados poderíamos supor a existência de outro(s) gene(s) que determina(m) baixa produção, o que contradiz o observado no estudo das reversões. Este é um ponto que necessita maiores estudos pois a origem de derivativos com baixa produção é frequente

em linhagens industriais de *A.niger*, assim como em outros fungos utilizados em indústria (BONATELLI JR., 1977).

No diplóide $t_{fpo} 1 \text{ } \underline{tia_1 fwn_3} // \underline{pir_1 olv_1}$ e seus segregantes a produção foi similar à linhagem 10v10, como está relatado nas Tabelas 26 a 28. Como o cruzamento envolveu linhagens com produção alta ($\underline{tia_1 fwn_3}$) e baixa ($\underline{pir_1 olv_1}$), poderíamos propor dominância da característica alta produção. Esta sugestão poderia ser explicada pela complementação da marca $\underline{pir_1}$, para a qual existem evidências de efeito pleiotrópico na produção, porém, esta consideração contradiria os resultados obtidos com o diplóide \underline{pop} , que mostrou complementação com relação à marca $\underline{pir_1}$, mas têm produção de ácido cítrico baixa.

A ocorrência de mutações dominantes condicionando maior produção de metabólitos foi descrita por MACDONALD (1973) com relação à penicilina em *A.nidulans* e, nos demais casos relatados, os fatores envolvidos são recessivos ou, com efeitos aditivos (SERMONTI, 1969; BURNETT, 1975; MERRICK, 1975a, 1975b).

6.2.3. Sugestões de estudos posteriores

Um aspecto que pode ser utilizado, após melhor caracterização, é o uso da alta frequência de recombinação evidenciada em alguns cruzamentos, o que facilitaria a obtenção de recombinantes entre linhagens com características desejáveis. Este aspecto foi explorado por BALL e HAMLIN (1978) em *Ascremonium chrysogenum*, com obtenção de segregante com ganho na produção.

Outra proposição seria estudar a produção de ácido cítrico dos segregantes do diplóide $2 \text{ } \underline{tia_1 fwn_3} // \underline{pir_1 olv_1}$ para esclarecer o papel do gene $\underline{pir_1}$, e se existem outros fa

tores envolvidos na característica baixa produção.

Seria também aconselhável a utilização de linhagens com origens diferentes para estudos quantitativos, como já está sendo feito em nossos laboratórios, bem como, o uso de diferentes mutantes com produção aumentada ou diminuída, para estudo das possíveis interações gênicas, à semelhança dos trabalhos desenvolvidos com relação à produção de penicilina por BALL (1973) em *P. chrysogenum* e por MACDONALD e HOLT (1976) em *Aspergillus nidulans*.

7. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

a) Para obtenção de linhagens prototróficas na linhagem 10v10 de *A. niger* há necessidade de aumento na quantidade de meio completo da mistura utilizada para obtenção de micélio heterocariótico.

b) As linhagens prototróficas isoladas puderam ser separadas em 2 tipos, *CS* e *AS*, de acordo com o diâmetro de conídios, segregação em Benlate e número de conídios binucleados. As linhagens do tipo *CS* foram consideradas como diplóides que apresentam ou heterozigose para todos os marcadores envolvidos no cruzamento - tipo *CS* I ou, no mínimo, heterozigose para um dos marcadores - tipo *CS* II. As linhagens do tipo *AS*, na maioria dos casos, foram consideradas como haplóides, necessitando estudos posteriores para melhor caracterização.

c) Reversões isoladas dos mutantes auxotróficos indicaram efeito pleiotrópico das marcas pur₁, pir₁ e nic₁ na produção de ácido cítrico da linhagem estudada, sendo que, com relação às duas primeiras foram obtidas evidências contraditórias quando do estudo dos diplóides e segregantes.

d1 Os diplóides obtidos e seus segregantes não aumentaram a produção de ácido cítrico, quando comparados com a linhagem 10v10. Os diplóides apresentaram, em alguns casos, menor variação na produção, o que pode ser explorado no melhoramento genético da linhagem. O estudo da produção dos segregantes, em um dos cruzamentos, confirmou a ausência de marcadores genéticos nas linhagens do tipo *CS II*.

B. SUMMARY

From our results we can draw the following conclusions:

a) In order to obtain prototrophic strains of the 10v10 strain of *A. niger* it is necessary to increase the quantity of complete medium in the mixture used to obtain a heterokaryotic mycellium.

b) The isolated prototrophic strains could be separated into 2 types, *CS* and *AS*, according to the conidium diameter, the segregation on Benlate, and the number of binucleated conidia. The *CS* strains were considered diploid if they were either heterozygous for all the markers involved in the crossing (type *CS* I) or heterozygous for at least one of the markers (type *CS* II). In most case the *AS* strains were considered haploids, requiring further study for better characterization.

c) Isolated reversals of the auxotrophic mutants indicated a pleiotropic effect of the markers pur₁, pir₁, and nic₁ in the citric acid yield in the strain studied although in relation to the first two markers contradictory evidence was obtained in the study of the diploids and segregation products.

d1 The diploids and their segregation products did not increase the citric acid yield when compared to the 10v10 strain. In some cases the diploids showed a smaller variation in yield, which could be exploited in the genetic improvement of the strain. The study of the citric acid yield of the segregation products, in one of the crossings, confirmed the absence of genetic markers in the *CS* II line.

9. LITERATURA CITADA

- AZEVEDO, J.L., 1972. O ciclo parassexual em fungos. *Revista de Microbiologia*, 3: 157-168.
- AZEVEDO, J.L., 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, 2: 3-15.
- BALL, C., 1973. Improvement of penicillin productivity in *Penicillium chrysogenum* by recombination. *IN*: VANEK, Z. , Z. HOSTALEK e J. CUDLIN. (Eds.) Genetics of Industrial Microorganisms, vol. II. Amsterdam, Elsevier Publishing Co., p. 227-237.
- BALL, C. e P. F. HAMLIN, 1978. The genetics of *Acremonium chrysogenum*. *Revista Brasileira de Genética*, 1: 83-96.
- BALL, C., A. J. LAWRENCE, J.M. BUTLER e K. B. MORRISON, 1978. Improvement in Amyloglucosidase 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, 1978a. Proporção de conídios binucleados em *Aspergillus niger*. *Ciência e Cultura*, 30: 605-608.

- BARACHO, I. R. e W. R. COELHO, 1978. Influência da idade e origem da colônia, na proporção de conídios binucleados em *Aspergillus niger*. *Revista de Microbiologia*, 9: 1-3.
- BARACHO, I. R., R. T. ROSIM e R. F. BRAZ, 1978. Produção de ácido cítrico em combinações de linhagens de *Aspergillus niger*. *Ciência e Cultura*, 30: 522 (Abstract).
- BONATELLI JR., R., 1977. Estabilidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, ESALQ/USP. 126 p. (Tese de Mestrado).
- BONATELLI JR., R., 1978. Melhoramento de *Aspergillus niger* para produção de ácido cítrico. *Ciência e Cultura, Simpósios II*: 123-127.
- BURNETT, J. H., 1975. Mycogenetics. London, John Wiley e Sons. 375 p.
- BUXTON, E. W., 1956. Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Journal of General Microbiology*, 15: 133-139.
- BUXTON, E. W., 1962. Parasexual recombination in the banana wilt *Fusarium*. *Transactions of the British Mycological Society*, 45: 274-279.
- CALAM, C. T., 1972. Genetics and development of industrial strains. *Process Biochemistry*, 7: 29-31.
- CALAM, C. T., L. B. DAGLISH e W. S. GAITSKELL, 1973. Hybridisation experiments with *Penicillium patulum* and *Fusarium moniliforme*. IN: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLİN (Eds.). Genetics of Industrial Microorganisms, vol.

II. Amsterdam, Elsevier Publishing Co., p. 265-282.

CATEN, C. E. e J. L. JINKS, 1966. Heterokaryosis: its significance in wild homothalic ascomycetes and fungi imperfect. *Transactions of the British Mycological Society*, 49: 81-93.

CHANG, L. T. e C. A. TERRY, 1973. Intergenic complementation of glucoamylase and citric acid production in two species of *Aspergillus*. *Applied Microbiology*, 25: 890-895.

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.

CIEGLER, A. e K. RAPER, 1957. Application of heterokaryons of *Aspergillus* to commercial-type fermentations. *Applied Microbiology*, 5: 106-110.

DAS, A., 1972. Strain selection in citric acid fermentation - review. *Current Science*, 41: 593-596.

DAS, A. e Z. ILCZUK, 1978. Spontaneous segregation of a heterozygous diploid of *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica*, 23: 362-365.

DAS, A. e P. ROY, 1978. Improved production of citric acid by a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 24: 622-625.

DAVIS, R. H., 1966. Mechanisms of inheritance. 2-Heterokaryosis. IN: AINSWORTH, G. C. e A. S. SÜSSMAN (Eds.). *The Fungi*, vol. II. New York, Academic Press, 805 p.

DEMAIN, A.L., 1973. The marriage of genetics and industrial

- microbiology - after a long engagement, a bright future .
 IN: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CODLIN. (Eds.). Genetics
 of Industrial Microorganisms, vol. I. Amsterdam, Elsevier
 Publishing Co., p. 19-32.
- DITCHEBURN, P., G. HOLT e K. D. MACDONALD, 1976. The genetic
 location of mutations increasing penicillin yield in
Aspergillus nidulans. IN: MACDONALD, K. D. (Ed.). Proceed-
 ings of the 2nd International Symposium on the Genetics
 of Industrial Microorganisms. New York, Academic Press, p.
 213-227.
- DOELGER, W. P. e S. C. PRESCOTT, 1934. Citric acid fermenta-
 tion. *Industrial and Engeneering Chemistry*, 26: 1142-1149.
- ELANDER, R. P., 1966. Potential applications of concepts of
 microbial genetics in antibiotic producing microorganisms.
 Induced Mutations and their utilization, Abh. deutch Akad.
 Wiss., Berlin. *Apud*: SERMONTI, G., 1969. Genetics of
 antibiotic - producing microorganisms. John Wiley e Sons ,
 Ltd., London. 389 p.
- FANTINI, A. A., 1962. Genetics and antibiotic production of
Emeticellopsis species. *Genetics*, 47: 161-177.
- HASTIE, A. C., 1970 - Benlate-induced instability of *Asper-*
gillus diploids. *Nature*, 226: 77.
- HOPWOOD, D. A. e M. J. MERRICK, 1977. Genetics of antibiotic
 production. *Bacteriological Review*, 41: 595-635.
- ISHITANI, G. e K. SAKAGUCHI, 1956. Hereditary variation and
 genetic recombination in Koji - Moulds (*Aspergillus oryzae*
 and *A. sojae*). V. Heterokaryosis. *Journal of General and*
Applied Microbiology, 2: 345-400.

- KAFER, E., 1960. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 186: 619-620.
- KAFER, W., 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46: 1581-1609.
- KRESLING, E. K. e E. A. STERN, 1935. *Proc. Inst. Sci. Res. Food Ind.*, 3: 5 . *Apud*: DAS, A., 1972. Strain selection in citric acid fermentation - a review. *Current Science*, 41: 593-596.
- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment of *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 *Aspergillus niger* on medium containing *p*-fluorophenylalanine. *Genetical Research*, 12: 305-315.
- LOCKWOOD, L. B., 1975. Organic acid production. *IN*: SMITH , J. E. e D. R. BERRY (Eds.). *The Filamentous fungi*, vol . I. Edward Arnold Ltd., London. p. 140-157.
- MACDONALD, K. D., 1966. Differences in diploids synthesized between the same parental strains of *Penicillium chrysogenum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 32: 431-441.
- MACDONALD, K. D., 1973. Genetics of penicillin production in

- Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans*. IN: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN (Eds.). *Genetics of Industrial Microorganisms*, vol. I. Elsevier Publishing Co., Amsterdam, p. 255-264.
- MACDONALD, K. D. e G. HOLT, 1976. Genetics of biosynthesis and overproduction of penicillium. *Science Progress*, 63: 547-573.
- MACDONALD, K. D., J. M. HUTCHINSON e W. A. GILLET, 1963 . Isolation of auxotrophs of *Penicillium chrysogenum* and their penicillin yields. *Journal of General Microbiology*, 33: 365-374.
- MACDONALD, K. D., J. M. HUTCHINSON and W. A. GILLET, 1965 . Heterozygous diploid of *Penicillium chrysogenum* and their segregation patterns. *Netherlands, Genetica*, 36: 378-397.
- MARIER, J. R. e M. BOULET, 1958. Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method. *Journal Dairy Science*, 41: 1683-1692.
- MERRICK, M. J., 1975a. Hybridization and selection for increased penicillin titre in wild-type strains of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 91:278-286.
- MERRICK, M. J., 1975b. The inheritance of penicillin titre in crosses between lines of *Aspergillus nidulans* selected for increased productivity. *Journal of General Microbiology*, 91: 287-294.
- MESSIAS, C. L., 1977. Parassexualidade e produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus*, Link. Piracicaba, ESALQ/USP. 75 p. (Tese de Doutorado).

MUSILKOVA, M. e Z. FENCL, 1970. Isolation of auxotrophic mutants of *Aspergillus niger* by ethylmethanesulphonate treatment. *Folia Microbiologica*, 15: 34-39.

NGA, B. H., SIEW-POH TEO e G. LIM, 1975. The occurrence in nature of a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, 88: 364-366.

NUESCH, J., H. J. TREICHLER e M. LIERSCH, 1973. The biosynthesis of cephalosporin C. *IN*: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN (Eds.). *Genetics of Industrial Microorganisms*, vol. II. Amsterdam, Elsevier Publishing Co., p. 309-334.

PAES DE BARROS, J., 1977. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP. 81 p. (Tese de Mestrado).

PAPA, K. E., 1973. The parasexual cycle in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 68: 1201-1205.

PEREIRA, J.O., 1978. Ocorrência do ciclo parassexual em uma espécie do gênero *Aspergillus*. Piracicaba, ESALQ/USP 108 p. (Tese de Mestrado).

PIMENTEL GOMES, F. P., 1966. Curso de Estatística Experimental. Gráfica Benetti Ltda., São Paulo. 430 p.

POLSINELLI, M., A. ALBERTINI, G. CASSANI e O. CIFERRI, 1963. Relation of biochemical mutations to actinomycin synthesis in *Streptomyces antibioticus*. *Journal of General Microbiology*, 33: 238-246.

PONTECORVO, G., 1952. Non-random distribution of multiple mitotic crossing-over among nuclei of heterozygous diploid *Aspergillus*. *Nature*, 170: 204-205.

- PONTECORVO, G., 1956. The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology*, 10: 393-400.
- PONTECORVO, G. e J. A. ROPER, 1952. Genetic analysis without sexual reproduction by means of poliploidy in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 6: vii.
- PONTECORVO, G. e G. SERMONTI, 1953. Recombination without sexual reproduction in *Penicillium chrysogenum*. *Nature*, 172: 126-127.
- PONTECORVO, G. e E. KAFFER, 1958. Genetic analysis based on mitotic recombination. *Advances in Genetics*, 9: 71-104.
- 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. HEMMONS, K. D. MACDONALD e A. W. J. BUFTON, 1953b. The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.
- PRASAD, I., 1970. Genetic analysis of the coloured mutants of *Aspergillus niger*. Netherlands, *Genetica*, 41: 388-398.
- RAPER, K. B. e D. I. FENNELL, 1965. The genus *Aspergillus* Baltimore, Williams e Wilkins Co., 686 p.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8: 14-15.
- ROPER, J. A., 1966. The parasexual cycle. IN: Ainsworth, G. C. e A. S. SUSSMAN (Eds.). *The Fungi*, vol. II. New York, Academic Press, p. 589-617.

- ROPER, J. A. e R. H. PRITCHARD, 1955. Recovery of complementary products of mitotic crossing-over. *Nature*, 175: 639.
- ROSIM, R. T., O. GARCIA JR. e I. R. BARACHO, 1978. Tamanho de conídios e núcleos em linhagens haplóides e diplóides de *Aspergillus niger*. *Ciência e Cultura*, 30: 487-492.
- SERMONTI, G., 1969. Genetics of antibiotic-producing microorganisms. John Wiley e Sons Ltd., London, 398 p.
- SHCHERBAKOVA, E. Ya. e M. N. RESVAYA, 1978. Formation of diploids in *Aspergillus niger* and their biosynthesis of citric acid. *Microbiologia*, 47: 859-864.
- SIEGEL, S., 1956. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. New York, McGraw Hill Book Co.
- SMITH, J. E. e J. A. PATEMAN, Eds., 1977. Genetics and Physiology of *Aspergillus*. London, Academic Press Inc. Ltd. 552 p.
- STERN, C., 1936. Somatic crossing-over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 21: 625-730.
- TAVARES, F. C. A. e J. L. AZEVEDO, 1974. Genetical improvement of *Aspergillus niger* for citric acid production. 2nd International Symposium in Genetics of Industrial Microorganisms, 2: 86 (Abstract).
- TINLINE, R. D. e B. H. McNEILL, 1969. Parasexuality in plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 7: 147-170.
- UPSHALL, A., B. GIDDINGS e I. D. MORTIMORE, 1976. The use of Benlate for distinguishing between haploid and diploid

strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus* .
Journal of General Microbiology, 100: 413-418.

VAN TUYLL, J. M., 1977. Genetics of fungal resistance to
systemic fungicides. Netherland *Mededelingen Landbouwhogeshool*
Wageningen, 136 p.

YUILL, E., 1950. The number of nuclei in conidia of *Aspergilli*.
Transactions of the British Mycological Society, 33: 324-
331.

YUILL, J. L., 1951. Fermentations with mixed strains of
Aspergillus niger. *Biochemical Journal*, 49: xix.