

NUMERO E VIABILIDADE DE ASCOSPOROS EM CLEISTOTECIOS
HIBRIDOS E NAO HIBRIDOS DE *Aspergillus nidulans*

NEIVA MONTEIRO DE BARROS

Orientador: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

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

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Fevereiro - 1985

A

meus pais

Nelson e

Lourdes Cacilda

Minha Homenagem

AGRADECIMENTOS

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

Ao *Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo*, pela orientação, confiança e exemplo.

A *Profª Drª Aline Pizzirani-Kleiner*, pelas sugestões e incentivos.

Ao *Instituto de Genética da ESALQ/USP*, através de seu curso de mestrado e seu corpo docente, pela oportunidade e pelos conhecimentos transmitidos.

A *UCS*, através de seu Instituto de Biotecnologia, pela possibilidade de concluir este trabalho.

Ao *Pró-Reitor de Pós-Graduação e Pesquisa da UCS*, *Prof. Ary Nicodemo Trintin*, e a *Coordenadora do PICD/UCS*, *Profª Maria de Lourdes Pauletti*, pelos incentivos e pela concessão da bolsa de estudos através do convênio CAPES-PICD.

Ao *Diretor do Instituto de Biotecnologia*, *Prof. Dr. Juan Luis Carrau*, pela oportunidade, confiança e incentivos.

Aos funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP, e em particular *Antonio José Rocha Campos e Luiz Próspero*, pela eficiência nos serviços técnicos prestados.

Ao *Prof. Armando Andreazza*, pela orientação na execução das análises estatísticas.

Aos colegas, *Prof. Aldo José Pinheiro Dillon*, pelas sugestões e *Prof^a Lucy Corsetti Piazza*, pela ajuda nas correções do texto.

Aos amigos, *Natali Pasqual e Miriam Pasqual*, pelo auxílio na versão.

Ao colega *Gilberto Carnieli*, pela ajuda na confecção das figuras deste trabalho.

A amiga, *Leomar Telles Ferreira*, pelo serviço de datilografia, e também ao *Cláudio G. Rocha* (UNICAMP/Campinas).

A todos meus amigos e colegas da ESALQ e da UCS, pelo grande incentivo.

A meus pais, *Nelson Monteiro de Barros e Lourdes Cacilda da Costa de Barros* e a *Sr^ª Bene Cassano*, pelo carinho, apoio e compreensão.

A *Deus*, por tudo.

ÍNDICE

RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Produção de Cleistotécios.....	04
2.2. Fatores que influenciam na produção de cleistotécios.....	07
2.3. Viabilidade de Ascósporos.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Linhagens utilizadas.....	18
3.2. Meios de cultura e soluções.....	22
3.2.1. Meio mínimo.....	22
3.2.2. Meio completo.....	22
3.2.3. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo.....	23
3.2.4. Meio mínimo sólido mais 10% de meio completo.....	23
3.2.5. Meio de acetato de amônia.....	23

4.3. Diâmetro dos Cleistotécios, Número e Viabilidade de Ascósporos obtidos através de cruzamentos entre as linhagens.....	32
5. DISCUSSÃO.....	68
5.1. Produção de Cleistotécios a partir de linhagens individuais.....	68
5.2. Produção de Cleistotécios a partir de cruzamentos.....	70
5.3. Correlação entre o diâmetro do Cleistotécio e o Número de Ascósporos.....	74
5.4. Correlação entre o diâmetro do Cleistotécio e o Número de Ascósporos Viáveis.....	76
6. CONCLUSÕES.....	78
7. BIBLIOGRAFIA.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela

1. Linhagens e Variantes utilizados.....	20
2. Marcadores Genéticos e fenótipos das marcas utilizadas.....	21
3. Produção de Cleistotécios em Meio Mínimo, Meio Mínimo mais 10% de Meio Completo e Meio Completo.....	34
4. Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade de Ascósporos obtidos a partir da linhagem C.....	35
5. Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade de Ascósporos obtidos a partir da linhagem D.....	36
6. Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade de Ascósporos obtidos a partir da linhagem E.....	37
7. Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade de Ascósporos obtidos a partir da linhagem F.....	38

Tabela

8. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade de Ascósporos obtidos a partir da linhagem G.....	39
9. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade de Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem A x linhagem B.....	40
10. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem A x linhagem C.....	41
11. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem A x linhagem D.....	42
12. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem A x linhagem E.....	43
13. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem A x linhagem F.....	44

Tabela

14. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem B x linhagem C.....	45
15. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem B x linhagem D.....	46
16. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem B x linhagem E.....	47
17. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem B x linhagem F.....	48
18. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem B x linhagem G.....	49
19. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem C x linhagem D.....	50

Tabela

20. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem C x linhagem E.....	51
21. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem C x linhagem F.....	52
22. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem C x linhagem G.....	53
23. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem D x linhagem E.....	54
24. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem D x linhagem F.....	55
25. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem D x linhagem G.....	56

Tabela

26. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem E x linhagem F.....	57
27. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem E x linhagem G.....	58
28. Diâmetro dos Cleistotécios, número e viabilidade dos Ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem F x linhagem G.....	59
29. Tabela geral da análise da variância do diâmetro dos Cleistotécios, número de Ascósporos e número de Ascósporos viáveis; coeficiente de Regressão Linear entre diâmetro do Cleistotécio e número de Ascósporos, entre diâmetro do Cleistotécio e número de Ascósporos viáveis para Cleistotécios obtidos a partir de cada um dos vinte cruzamentos.....	60

Tabela

30. Síntese dos Resultados gerais dos cruzamentos com relação ao número de Cleistotécios híbri- dos e não híbridos.....	61
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura

1. Marcadores genéticos de *A. nidulans* utilizados.....19
- 2a. Histograma com os resultados gerais dos vinte cruzamentos - Diâmetro dos Cleistotécios e seus estados híbridos..... 62
- 2b. Histograma com os resultados gerais dos vinte cruzamentos - Diâmetro dos Cleistotécios e seus estados não híbridos..... 63
3. Representação gráfica dos dados obtidos a partir das equações de regressão linear para o número total de Cleistotécios híbridos, obtidos nos vinte cruzamentos, representando o diâmetro dos Cleistotécios e o número de Ascósporos do mesmo..... 64
4. Representação gráfica dos dados obtidos a partir das equações de regressão linear para o número de Cleistotécios híbridos obtidos nos vinte cruzamentos, representando o diâmetro dos Cleistotécios e o número de Ascósporos viáveis do mesmo..... 55

Figura

5. Representação gráfica dos dados obtidos a partir das equações de regressão linear para o número total de Cleistotécios não híbridos, obtidos nos vinte cruzamentos, representando o diâmetro dos Cleistotécios e o número de Ascósporos do mesmo..... 66
6. Representação gráfica dos dados obtidos a partir das equações de regressão linear para o número total de Cleistotécios não híbridos obtidos nos vinte cruzamentos, representando o diâmetro dos Cleistotécios e o número de Ascósporos via - veis do mesmo..... 67

NUMERO E VIABILIDADE DE ASCÓSPOROS EM CLEISTOTÉCIOS
HÍBRIDOS E NÃO HÍBRIDOS DE *Aspergillus nidulans*

Neiva Monteiro de Barros

ORIENTADOR: *Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo*

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo o estudo do número e viabilidade de ascósporos em cleistotécios híbridos e não híbridos de *A. nidulans*; verificou-se se havia ou não correlação entre o diâmetro do cleistotécio e o número de ascósporos e entre diâmetro do cleistotécio e número de ascósporos viáveis. Foi analisada também a produção de cleistotécios por linhagens individuais e em cruzamentos. Das sete linhagens, ensaiadas individualmente, cinco produziram cleistotécios com ascósporos viáveis. As linhagens foram cruzadas entre si, em todas as combinações possíveis, num total de vinte cruzamentos, sendo que um dos cruzamentos não foi realizado pelo fato das linhagens envolvidas possuírem requisitos nutricionais idênticos. De cada cruzamento foram isola -

dos doze cleistotécios, dando um total de duzentos e trinta e seis cleistotécios analisados, pois quatro apresentaram ascósporos inviáveis. Através do coeficiente de correlação , considerando o número total de cleistotécios, encontrou-se uma correlação entre diâmetro e número de ascósporos, tanto para cleistotécios híbridos, como para não híbridos. A correlação entre diâmetro de cleistotécio e número de ascósporos viáveis foi constatada somente para cleistotécios híbridos, sendo que para os não híbridos os resultados não foram significativos. Considerando cruzamentos individuais, alguns mostraram correlação, outros não, possivelmente pelo fato da amostragem em algumas análises ser pequena.

NUMBER AND VIABILITY OF ASCOSPORES IN HIBRID AND
SELFED CLEISTOTHECIA OF *Aspergillus nidulans*

Neiva Monteiro de Barros

ADVISER: *Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo*

SUMMARY

The present work was carried out aiming the study of the number and viability of ascospores in hybrid and selfed cleistothecia from *A. nidulans*, in order to check a possible correlation between size of the cleistothecia and the amount of ascospores viable. The production of cleistothecia through individual strains and in crossings were also analyzed. From seven strains tested individually, five produced cleistothecia with ascospores. Strains were crossed in all possible combinations giving a total of twenty crossings. Cleistothecia resulted from all crosses. Twelve cleistothecia were isolated from each cross. Through linear regression coefficient and considering the total amount of cleistothecia, a positive correlation between size and

number of ascospores was found, either for hybrid or selfed cleistothecia. A correlation between size and number of viable ascospores was found only in hybrid cleistothecia.

1. INTRODUÇÃO

Aspergillus nidulans é um fungo filamentososo que , desde sua introdução em estudos genéticos, tem contribuído para resolver inúmeros problemas de ordem básica e aplicada. Esse fungo permitiu o desenvolvimento de tópicos importantes da Genética, contribuindo para o conhecimento inicial da ultra-estrutura dos genes, da regulação gênica em eucariotos , instabilidade mitótica, transposição do material genético e complementação gênica, apenas para citar alguns deles. Foi também em *Aspergillus nidulans* que pela primeira vez foi descrita uma alternativa do sexo em fungos, o ciclo parassexual que, atualmente, já foi relatado em muitas outras espécies . Através do ciclo parassexual abriram-se perspectivas para o estudo genético em fungos imperfeitos e para o melhoramento genético de Deuteromicetos de importância industrial. Além desse ciclo parassexual, o *A. nidulans* possui ainda um ciclo sexual e sendo uma espécie homotática pode produzir corpos de frutificação, os cleistotécios, contendo ascos com oito ascósporos, a partir de uma única linhagem. A combinação de

uma linhagem através de heterocariose resulta na formação de cleistotécios que podem ser híbridos ou não híbridos, de acordo com a origem dos núcleos envolvidos no processo de formação desses cleistotécios. No setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética da ESALQ, USP, em Piracicaba, entre os diversos estudos com o *A. nidulans* foi desenvolvido um deles que demonstrou uma correlação entre o diâmetro dos corpos de frutificação e seu caráter híbrido ou não híbrido (BARACHO, 1968; BARACHO, VENCOSKY e AZEVEDO, 1970). Esses estudos mostraram que, em cruzamentos envolvendo várias linhagens de *A. nidulans* em geral, cleistotécios maiores correspondem a tipos híbridos e os menores aos tipos não híbridos. A descoberta foi importante, pois permitiu que o isolamento de cleistotécios híbridos, que são os desejáveis em uma análise genética de um cruzamento, fosse facilitado e o processo foi usado desde então como rotina em estudos de genética de *A. nidulans*. Um outro ponto levantado a partir desse trabalho foi a possível existência de uma heterose para explicar o diâmetro maior desses cleistotécios híbridos. Embora sendo um fungo haplóide, a condição heterocariótica permite uma aproximação com a heterose verdadeira (EMERSON, 1952). Entretanto, o trabalho de BARACHO, 1968, embora tenha demonstrado correlação entre diâmetro e caráter híbrido ou não híbrido, não se preocupou em determinar se

cleistotécios maiores apresentavam um número de ascósporos também maior que os menores, ou em outras palavras, se havia um heterose verdadeira ou simplesmente um fenômeno conhecido como "luxuriância". O presente trabalho foi então realizado com o intuito de estender as observações dos trabalhos anteriores, visando determinar uma possível correlação entre o diâmetro dos cleistotécios e número de ascósporos e também diâmetro dos cleistotécios com número de ascósporos viáveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A literatura sobre a frutificação e viabilidade de ascósporos em *Aspergillus nidulans* não é ampla, mas alguns fatores fisiológicos e ambientais que influenciam na formação de corpos de frutificação, já tem sido estudados (ZONNEVELD, 1971, 1972 a e b, 1973, 1974; SAXENA e SINHA, 1973).

A presente revisão vai se restringir aos seguintes aspectos: produção de cleistotécios, fatores que influenciam na produção de cleistotécios e viabilidade de ascósporos.

2.1. Produção de Cleistotécios

O ciclo sexual está concentrado em órgãos especializados, os corpos de frutificação (cleistotécios), os quais originam-se à partir de anastomose de hifas do mesmo micélio, ou fusão de hifas de linhagens, dando origem a heterocários, que após oito a dez dias de incubação produzem cleistotécios maduros.

Em *A. nidulans*, já foi observada uma certa variação na produção de cleistotécios, tanto em estudos micológicos (SMITH, 1957), como em estudos genéticos (MAHONEY e WILKIE, 1958). Em particular, a composição do meio, bem como outros fatores ambientais e fisiológicos, influenciam no crescimento e diferenciação sexual (ZONNEVELD, 1974).

Essas observações gerais tem mostrado que a produção de cleistotécios é incerta e periódica. Algumas linhagens são regularmente sexuais, enquanto outras produzem somente conídios. Ainda outras dão a forma imperfeita através de uma série de culturas e depois produzem cleistotécios abundantes (JINKS, 1954; SMITH, 1957). Herança extracromossômica já foi detectada relacionada com a produção de cleistotécios em *Aspergillus*. Transferências de determinantes citoplasmáticos por heterocariose indicaram que as diferenças ocorridas na produção de cleistotécios estavam sob um controle não cromossômico. MAHONEY e WILKIE (1958, 1962) relataram segregações não mendelianas de colônias cleistoteciais e acleistoteciais (alba) entre progênies sexuais de um número de linhagens homocarióticas de *A. nidulans*. Os resultados de um cruzamento sexual indicaram que uma única diferença gênica controla a proporção de colônias cleistoteciais para alba, recuperadas entre a progênie de ascósporos de uma linhagem homocariótica.

CROFT (1966) descreve a segregação de colônias cleistoteciais e acleistoteciais entre progênies sexuais e assexuais de um isolado de *A. nidulans*, sendo que a reversão de um tipo de colônia para o outro é baixa. Foi evidenciada a existência de um componente citoplasmático envolvido na herança dos dois estados. Além do *A. nidulans*, o citoplasma dos Ascomicetos ocupa um importante papel na determinação do fenótipo (JINKS, 1956, 1958), sendo inclusive possível a eliminação do estágio sexual de *A. glaucus* por modificações citoplasmáticas.

BARACHO (1968) e BARACHO, VENCOVSKY e AZEVEDO (1970), analisando a produção de cleistotécios por linhagens isoladas e em cruzamentos, verificaram a existência de uma variação na produção dos mesmos, atribuindo como causa desta variação a presença de fatores internos que se distribuem ao acaso, ou seja, de fatores citoplasmáticos complementares, que poderiam se dispersar durante o desenvolvimento do micélio, impedindo a formação de cleistotécios. Também através de cruzamentos entre sete linhagens de *A. nidulans*, os autores verificaram a existência de uma correlação entre o diâmetro do cleistotécio e sua condição híbrido e não híbrido, sendo que os cleistotécios híbridos são usualmente maiores que os não híbridos, indicando um vigor heterocariótico.

BARACHO e AZEVEDO (1971) realizaram cruzamentos

dialélicos entre seis linhagens de *A. nidulans*, com a finalidade de estabelecer valores da capacidade geral e específica de combinação na quantidade de cleistotécios formados. Os resultados obtidos mostraram que a variação genética expressada pela quantidade de cleistotécios produzidos em diferentes cruzamentos foi devida, não somente a efeitos gênicos aditivos, mas também a efeitos dominantes e possivelmente epistáticos.

BARACHO e AZEVEDO (1977) realizaram um estudo sobre o heterotalismo relativo, através de cruzamentos dialélicos entre seis diferentes linhagens de *Aspergillus nidulans*, sendo que em cada cruzamento foram determinadas as proporções de cleistotécios híbridos. Os resultados mostraram que o heterotalismo relativo não é um fenômeno comum a todos os cruzamentos e que a tendência ao cruzamento cariogâmico preferencial pode ser geral ou específica.

2.2. Fatores que influenciam na produção de cleistotécios

Existem uma série de fatores que influenciam na produção de cleistotécios, já constatados em estudos com *Aspergillus nidulans* e outros fungos.

CLUTTERBUCK (1969), em estudos de mutantes que afetam o desenvolvimento do aparelho conidial, encontrou dois tipos de mutantes defectivos na reprodução sexual: o tipo "stunted" que não forma células Hülle e cleistotécios e o ti

po "*medusa*", que não produz cleistotécios, embora tenha células Hülle normais.

HOUGHTON (1970) isolou vinte e quatro mutantes de *A. nidulans*, que crescem mais lentamente que os normais, com glicose como única fonte de carbono, e são incapazes de utilizar intermediários do ácido tricarboxílico. Esses mutantes não formaram cleistotécios após prolongada incubação sob condições de baixa tensão de oxigênio, embora pequenos aglomerados de células Hülle tenham sido produzidos.

MARTINELLI e CLUTTERBUCK (1971) realizaram um estudo quantitativo de mutantes para conidiação em *A. nidulans*. Um dos tipos de mutantes mostra uma mudança de conidiação para a produção de cleistotécios, que pode ser produzida experimentalmente em cultura sobre ágar, por restrição da suplementação de ar (PONTECORVO e col., 1953). O efeito da suplementação de ar também foi verificado por AZEVEDO (1966), através do procedimento de vedar com fita celulósica as placas de Petri, o que favorecia a produção de cleistotécios, possivelmente devido a uma anaerobiose parcial.

HOUGHTON (1971) investigou sobre as causas do comportamento característico de mutantes *sgp* (baixo crescimento cleistotecial) de *A. nidulans*. Os mutantes foram originalmente isolados por sua incapacidade de crescer em fontes de carbono não fermentáveis (NAGAI, YANAGISHIMA e NAGAI, 1961). Os

resultados das investigações indicam que os mutantes, embora tendo a capacidade enzimática para oxidar ácidos do ciclo tricarboxílico, são severamente enfraquecidos em sua capacidade de tomá-los do meio de crescimento; como consequência, não produzem cleistotécios, e os conídios mostram reduzida viabilidade.

BUTCHER, CROFT e GRINDLE (1972) realizaram uma avaliação da densidade cleistotecial e taxa de crescimento em cinco isolados selvagens, pertencentes a cinco grupos de compatibilidade, em vinte diferentes ambientes de laboratório. A correlação encontrada entre os componentes de interação genótipo X ambiente e os componentes genéticos aditivos para densidade cleistotecial puderam ser interpretados tomando por base que os efeitos genéticos aditivos e estabilidade estão sob um controle genético comum, ou, pelo menos, que existe uma associação de gens para essas duas facetas do fenótipo.

O α -1,3 - glucano tem sido mostrado como um constituinte estável das paredes de hifas, sendo o mesmo degradado quando cessa o crescimento vegetativo. Por uma série de processos, ZONNEVELD (1972 b, 1974) demonstrou uma correlação entre o conteúdo de α -1,3 - glucano e o número de cleistotécios formados. Com base nestes dados, ele sugeriu que α -1,3 - glucano serve como fonte de carbono endógena para a dife -

renciação sexual. Com a formação de quantidade suficiente de α -1,3 - glucano, e quando a glicose é exaurida, o fungo sintetiza a enzima α -1,3 - glucanase, que degrada o α -1,3 - glucano, suplementando assim a fonte de carbono e energia necessária para a frutificação (ZONNEVELD, 1971, 1972a, 1972b).

ZONNEVELD (1972b, 1974) também descreveu uma mutação denominada *mel*⁰B₂, originalmente isolada por MARTINELLI e BAINBRIDGE (1974), que afeta diretamente a síntese de α -1,3 - glucano e, conseqüentemente, determina a ausência de cleistotécios.

ZONNEVELD (1973) utilizando um análogo da glicose, a 2-deoxiglicose (2-DG) como fonte de carbono, verificou que o mesmo influencia primariamente a síntese de α -1,3 - glucano, e a inibição de α -1,3 - glucanase é ou o efeito secundário ou uma conseqüência de um distúrbio do metabolismo celular. O desenvolvimento de cleistotécios foi completamente bloqueado por adição de mais 40mg de 2-DG; com 30mg, somente aglomerados de células Hülle foram formados e com 10-20mg/placa, formaram-se cleistotécios maduros, mas em uma taxa menor do que em placas sem 2-DG. Os resultados indicaram que ambos, α -1,3 - glucano e α -1,3 - glucanase são indispensáveis para a frutificação em *Aspergillus*.

ZONNEVELD (1974) utilizou nove mutantes de *A. nidulans*, que se diferenciavam pela produção de cleistotécios ,

quando as linhagens cresciam em meios com diferentes níveis de glicose e de nitrato. O meio padrão usado consistia de 3% de glicose e 0,6% de nitrato para comparações com os resultados anteriores (ZONNEVELD, 1972 a, 1972 b e 1973) . Quando as quantidades de glicose foram aumentadas e as de nitrato reduzidas, maior quantidade de α -1,3- glucano foi produzida, e, conseqüentemente, ocorreu formação de cleistotécios. Com quantidades de glicose reduzidas, pouca quantidade de α -1,3 - glucano foi encontrada e não houve formação de cleistotécios.

Os efeitos de deficiência de manganês tem sido investigados em um grande número de sistemas bacterianos e de fungos (WEINBERG, 1964) .

BARNETT e LILLY (1966) verificaram a necessidade para manganês em um certo número de fungos, incluindo *Neocosmospora vasinfecta*, que depende de grandes quantidades dessa substância para sua frutificação. Em *Aspergillus oryzae*, a deficiência em manganês impede a esporulação assexual (HOFMANN, SCHECK e SAFFERT, 1950) .

ZONNEVELD (1975 a), durante um estudo do papel dos elementos traços no crescimento e diferenciação de *A. nidulans* notou que, embora o manganês não altere a taxa de crescimento significativamente, sua deficiência impede completamente o desenvolvimento de cleistotécios. Ocorre um

grande aumento no conteúdo de α -1,3 - glucano com o aumento das quantidades de manganês. Foi demonstrado também, que a diminuição da atividade de fosfoglucomutase pode ser relacionada com a baixa síntese de α -1,3 - glucano, e como consequência acarretar a ausência de cleistotécios (ZONNEVELD , 1975 b).

Em *Neurospora crassa* foram isolados mutantes, nos quais não ocorre a maturação dos peritécios (JOHNSON, 1976). Esse tipo de mutante, quando cruzado com seus parentais, sofre bloqueio em seu desenvolvimento sexual. Eventos tais como acumulação de melanina, produção de hifas salientes na parede peritecical externa e formação de esporos podem também ser bloqueados por essas mutações, em algum ponto do desenvolvimento peritecical. Esses resultados, também encontrados por JOHNSON (1978) sugerem que esses eventos são altamente integrados e regulados no desenvolvimento peritecical normal.

POLACHECK e ROSENBERG (1977) descreveram os efeitos de uma mutação *mel*⁰B₂ em *A. nidulans*, originalmente isolada por MARTINELLI e BAINBRIDGE (1974), que altera a composição da parede de *A. nidulans*, levando à perda da síntese de melanina. Além disso, essas linhagens não produziram α -1,3 - glucano, e, em consequência, não formaram cleistotécios. Foi encontrada uma correlação positiva entre o conteúdo de α -1,3 - glucano das hifas e a produção de melanina e

cleistotécios, sendo que a síntese de glucanos poderia ser o alvo primário da mutação e a ausência de glucano poderia resultar em ausência de melanina e cleistotécios. Esses resultados estão ligados aos estudos da função de α -1,3 - glucano (ZONNEVELD, 1972 b, 1974), que por uma variedade de considerações tem demonstrado uma correlação entre o conteúdo de α -1,3 - glucano e o número de cleistotécios formados em condições de esgotamento de nutrientes.

SAXENA e SINHA (1977) estudaram os efeitos de aeração e concentração de glicose em cultura submersa para investigar sua influência na frequência de cleistotécios. Como a glicose é a melhor fonte de carbono para o crescimento de *A. nidulans* (MARTINELLI, 1976), as culturas foram crescidas em várias concentrações de glicose. A diferenciação sexual foi gradualmente diminuída com o aumento da concentração de glicose.

DE LANGE e GRIFFITHS (1980) detectaram três classes de mutantes em *Neurospora crassa*: mutantes com bloqueio no desenvolvimento peritecial, mutantes com produção de peritécios normais, mas formação de ascos defectiva e mutantes com peritécios alterados, mas fertilidade aparentemente inalterada.

Em todos os mutantes isolados, previamente alterados no desenvolvimento de peritécios (WEIJER e VIGFUSSEN ,

1972; VIGFUSSEN e WEIJER, 1972; MYLK e THRELKELD, 1974 ; JOHNSON, 1978; GRIFFTHS e DE LANGE, 1978) o fenótipo normal foi expressado quando somente um dos parentais em um cruzamento sexual foi mutante.

KURTZ e CHAMPE (1981) identificaram, através de estudos, uma lacase associada com a formação de células Hülle e parede cleistotecial (lacase II). Os autores descrevem uma classe de mutantes (y^B) incapazes de completar o desenvolvimento sexual, sendo que são produzidas células Hülle em abundância, mas não há formação de cleistotécios. O fato do reparo desses defeitos ser feito pela adição de cobre sugere que a deficiência em cobre impede a síntese da enzima. LAW e TIMBERLAKE (1980) sugerem que a enzima não é sintetizada sob condições de deficiência de cobre ou que ela é rapidamente degradada. Uma correlação similar entre a morfogênese sexual e a atividade da fenoloxidase tem sido mostrada para o ascomiceto *Podospora anserina* (ESSER, 1968; ESSER e MINUTH, 1970).

Estudos, quanto ao papel das células Hülle no desenvolvimento dos corpos de frutificação, sugerem que, pelo fato delas serem lacase positivas, à semelhança dos primórdios cleistoteciais, elas possam tomar um papel mais direto na morfogênese cleistotecial. Sabe-se que as células Hülle não obtêm sua lacase dos primórdios, pois células Hülle de

certas linhagens mutantes que não produzem cleistotécios são lacase positivas, evidenciando a possibilidade de que o transporte enzimático seja das células Hülle para o primórdio (HERMANN, KURTZ e CHAMPE, 1983).

SERLUPI-CRESCENZI, KURTZ e CHAMPE (1983) realizaram um estudo com o mutante *arg* B12, demonstrando a importância da arginina para esporulação sexual e assexual de *A. nidulans*. Foi observado que a esterilidade sexual para *arg* B12 não é corrigida significativamente por concentrações intermediárias de arginina, sugerindo que a esterilidade não é devida a uma deficiência para arginina somente, mas sim por alguma perturbação metabólica.

KURTZ, CHANG e CHAMPE (1984) obtiveram a partir de um mutante *y*B35, uma série de revertentes, alterados ao nível de conidiação, número de cleistotécios, ou ambos. Os revertentes aparecem por mutações supressoras, sendo que algumas linhagens que produzem grande quantidade de cleistotécios, possuem dez vezes menos ascósporos do que as linhagens *y*B.

2.3. Viabilidade de Ascósporos

A literatura sobre a viabilidade de ascósporos em *A. nidulans* é escassa, sendo que a maioria dos estudos tem sido feitos com *Neurospora crassa*.

MAHONEY e WILKIE (1962) analisaram a viabilidade de conidiósporos e ascósporos de quatro linhagens selvagens de *A. nidulans*, sendo que a mesma ficou em torno de 85% a 100%.

Em *Neurospora*, o desenvolvimento de ascos é iniciado após a fase pré-meiótica S e cariogamia (IYENGAR e col., 1977). Portanto, mutantes que não produzem ascos, ou produzem ascos defectivos, podem ter um defeito meiótico. Tal comportamento tem sido detectado entre mutantes defectivos no reparo do DNA, como *uvs-3* e *uvs-6* (SCHROEDER, 1975) e *mei-3* (NEWMAYER, SCHROEDER e GALEAZZI, 1978).

BEADLE e CONRADT (1944), estudando as relações nucleares entre linhagens selvagens e linhagens mutantes notaram resultados satisfatórios com relação à viabilidade de ascósporos em todas as combinações ensaiadas, exceto àquelas envolvendo deficientes em ácido nicotínico. Esse mutante mostrou viabilidade de ascósporos bem reduzida.

A falha de maturação de ascósporos em *Neurospora* pode ser causada pela ausência de alguma parte do cromossomo haplóide complementar, como devido a rearranjos cromossômicos, ou não disjunção, ou pela presença de esporos "killer" (PERKINS e BARRY, 1977).

DE LANGE e GRIFFITHS (1980) detectaram um novo tipo de mutante, o *asc* (DL-711), o qual aparentemente não afe-

ta o cromossomo haplóide complementar, causando o aborto de todos os ascósporos em um certo número de ascos, sem afetar os ascos remanescentes.

O aborto de ascósporos do mutante recessivo *asc* (DL-711) não foi aparentemente devido a aneuploidia dos ascósporos inviáveis, mas preferentemente a um tipo desconhecido de inviabilidade de todos os ascósporos, em uma certa proporção de ascos. O alto grau de variação na expressão desse mutante pode ser explicado se existe uma quantidade limiar de uma determinada substância dentro de cada asco, necessária para a maturação dos ascósporos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens Utilizadas

A maioria das linhagens utilizadas neste trabalho são originárias dos estoques do Departamento de Genética da Universidade de Glasgow, Escócia, mantidas no Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra, sendo que as duas linhagens restantes são variantes deteriorados isolados por AZEVEDO e ROPER (1970). Essas linhagens e seus marcadores genéticos são mostrados na Tabela 1 e os símbolos dos genes mutantes e os respectivos fenótipos que eles determinam estão na Tabela 2. Na Figura 1 estão representados os grupos de ligação de *Aspergillus nidulans* com os marcadores genéticos utilizados, de acordo com CLUTTERBUCK (1974).

A denominação das linhagens que vem entre parênteses, foi dada por nós, para facilitar a exposição. Estas linhagens foram escolhidas com base em seus fenótipos, uma vez que elas apresentam características visuais que permitem distinguir umas das outras em cruzamentos, além de diferirem em seus requerimentos nutricionais, exceto as linhagens A e G.

GRUPO DE
LIGAÇÃO

MARCADORES GENÉTICOS

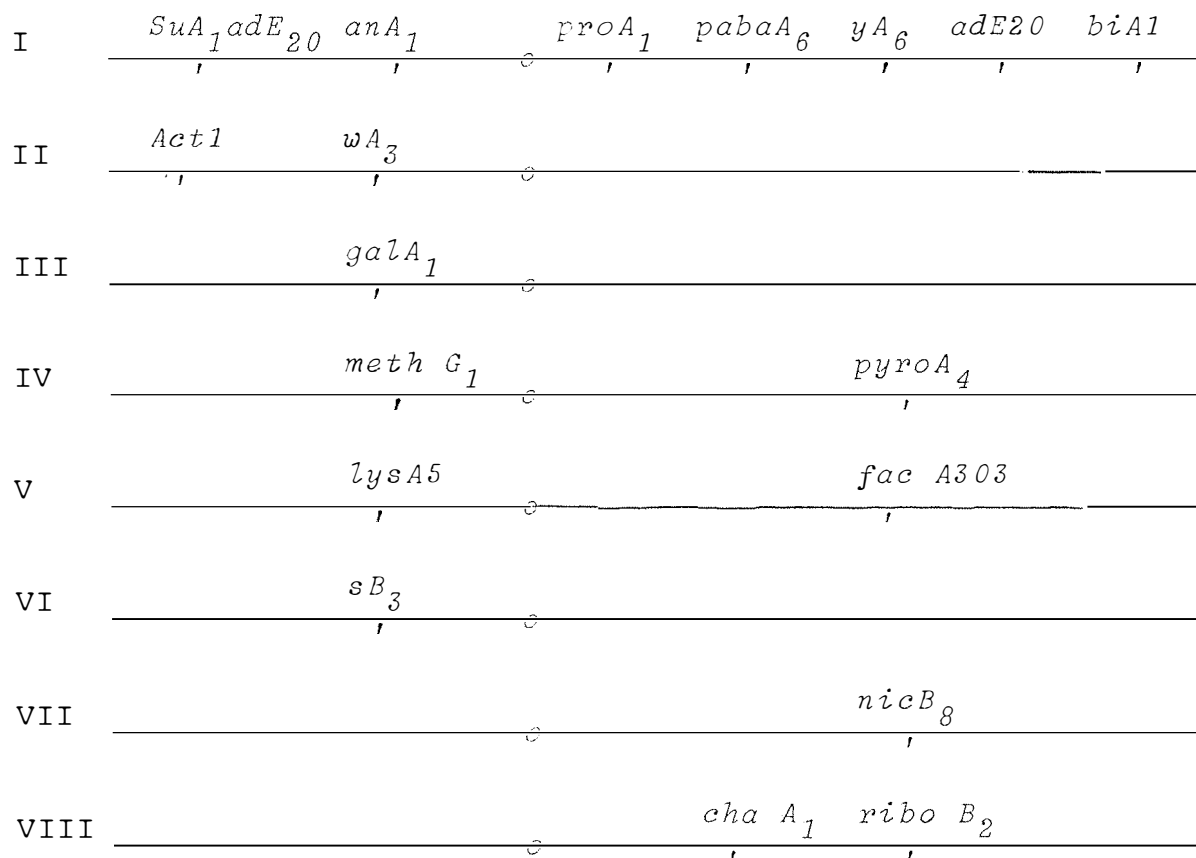


FIGURA 1 - Marcadores genéticos de *A. nidulans* utilizados. Os centrômeros estão representados por o. As distâncias no mapa não se encontram em escala.

TABELA 1- Linhagens e variantes utilizadas nesse trabalho com os seus respectivos marcadores genéticos e sua origem.

VARIANTES DETERIORADOS	GENÓTIPO	ORIGEM
V_5 (linhagem A)	$pro A_1 paba A_6; v_5$	AZEVEDO E ROPER (1970)
V_2 (linhagem B)	$pyro A_4; v_2$	AZEVEDO E ROPER (1970)
LINHAGENS		
$anA_1 biA_1$ (linhagem C)	$anA_1 biA_1$	PONTECORVO e col. (1953)
$biA_1; meth_{G1}$ (linhagem D)	$biA_1; meth_{G1}$	PONTECORVO e col. (1953)
"Master Strain E" (MSE) (linhagem E)	$yA_2 suA_1 adE_{20}; wA_3;$ $galA_1; pyroA_4;$ $facA_{303}; sB_3;$ $nicB_8; ribo B_2$	MC CULLY E FORBES (1965)
"118" (linhagem F)	$su ad_{20}; y, ad_{20};$ $paba_1; Aer_1; lysA5;$ $cha A_1$	BAINBRIDGE (1966)
$pro A_1 paba A_6 yA_2$ (linhagem G)	$proA_1 paba A_6 yA_2$	PONTECORVO e col. (1953)

TABELA 2 - Marcadores genéticos e fenótipos das marcas utilizadas.

SÍMBOLO

<i>Acr</i> ₁	Resistência à acriflavina
<i>adE</i> ₂₀	Requisito para adenina
<i>an A</i> ₁	Requisito para aneurina
<i>bi A</i> ₁	Requisito para a biotina
<i>cha A</i> ₁	Conídios de coloração chartreuse
<i>facA</i> ₃₀₃	Incapacidade de crescer em meio cuja única fonte de carbono é o acetato
<i>gal A</i> ₁	Incapacidade de crescer em meio cuja única fonte de carbono é a galactose
<i>lysA</i> ₅	Requisito para lisina
<i>meth G</i> ₁	Requisito para metionina
<i>nic B</i> ₈	Requisito para ácido nicotínico
<i>paba A</i> ₆	Requisito para ácido <i>p</i> -aminobenzóico
<i>pro A</i> ₁	Requisito para prolina
<i>pyro A</i> ₄	Requisito para pirodoxina
<i>ribo B</i> ₂	Requisito para riboflavina
<i>sB</i> ₃	Requisito para tiosulfato
<i>su A</i> ₁ <i>adE</i> ₂₀	Supressor da mutação <i>adE</i> ₂₀
<i>yA</i> ₂	Conídios de coloração amarela
<i>WA</i> ₃	Conídios de coloração branca

3.2. Meios de Cultura e Soluções

3.2.1. Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO e col. 1993)

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

3.2.2. Meio Completo (MC) (PONTECORVO e col. 1953, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973)

Adicionou-se ao meio mínimo

Peptona.....	2,0g
Caseína hidrolizada.....	1,5g
Extrato de levedura.....	0,5g
Solução de vitaminas.....	1,0ml
pH ajustado para 6,0 com NaOH 10%	

3.2.3. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo

(MM + 2% MC)

Ao meio mínimo líquido (item 3.2.1., sem o ágar) foi adicionado 2% de meio completo líquido. A solução resultante foi distribuída 2,5ml por tubo de ensaio.

3.2.4. Meio mínimo sólido mais 10% de meio completo

(MM + 10% MC)

Ao meio mínimo (item 3.2.1.) foi adicionado 10% de meio completo líquido. A solução resultante foi acrescentado ágar, e a mesma foi autoclavada.

3.2.5. Meio de acetato de amônia (APIRION, 1962)

CH ₃ COONH ₄	12,0g
KH ₂ PO ₄	3,0g
NaCl.....	2,0g
Mg SO ₄ 7H ₂ O.....	0,5g
Fe SO ₄	0,01g
Zn SO ₄	0,01g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1000ml
pH ajustado para 6,0 com NaOH 10%	

3.2.6. Meio mínimo de Galactose.

O preparo é idêntico ao meio mínimo (item 3.2.1.), apenas substituindo a glicose por galactose, como fonte de carbono.

3.2.7. Suplementos adicionados ao meio mínimo (MM)

Preparou-se o estoque de suplementos, adicionando-se cada um deles em água destilada esterilizada. As soluções foram aquecidas em banho-maria por 15 min. e conservadas no refrigerador à 4°C.

SUBSTÂNCIA	SOLUÇÃO ESTOQUE 100 ml DE ÁGUA	CONCENTRAÇÃO FINAL NO MEIO DE CULTURA
- Adenina	500,0 mg	25,00 µg/ml
- Ácido nicotínico	10,0 mg	0,50 µg/ml
- Ácido <i>p</i> -aminoben zólico	5,0 mg	0,25 µg/ml
- Biotina	4,0 mg	0,20 µg/ml
- Metionina	1,0 g	50,00 µg/ml
- Piridoxina	5,0 mg	0,25 µg/ml
- Prolina	1,0 g	50,00 µg/ml
- Riboflavina	10,0 mg	0,50 µg/ml
- Tiosulfato de sódio	2,0 g	100,00 µg/ml

3.2.8. Solução de vitaminas

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

A solução foi guardada em frasco escuro no refrigerador à 4°C, depois de ter sido aquecida em banho-maria por 15 minutos, sob clorofórmio.

3.2.9. Solução salina 0,85%.

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

3.2.10. Solução de Tween "80" (0,1% - V/V).

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

3.3. Esterilização e Incubação.

Os meios de cultura e as soluções foram sempre esterilizados em autoclave por 15 minutos, a uma atmosfera de pressão, com exceção das soluções nas quais se utilizou água destilada esterilizada. Os meios e as soluções foram estocados em temperatura ambiente, com exceção daqueles que estão assinalados e que foram estocados no refrigerador a 4°C.

A temperatura de incubação foi de 37°C.

3.4. Métodos

Os métodos gerais foram aqueles usados por PONTECORVO e col. (1953).

3.4.1. Obtenção de cleistotécios autofecundados

Este método foi utilizado para verificar uma possível influência do meio na produção de cleistotécios por essas linhagens. Para verificar a influência do meio sobre o comportamento das linhagens quanto a formação ou não de corpos de frutificação, inoculou-se as linhagens, com auxílio da alça de platina em quatro pontos em placas de Petri contendo MM sólido, MM + 10% MC sólido e MC sólido.

As placas foram vedadas com fita celulósica, colocadas em estufa à 37°C e observadas após dez, quinze e trinta

ta dias de incubação.

3.4.2. Obtenção de cleistotécios a partir de cruzamentos: análise genética.

Foram feitos cruzamentos entre as sete linhagens , em todas as combinações possíveis num total de vinte cruzamentos, sendo analisados doze cleistotécios de cada cruzamento. Um dos cruzamentos não foi realizado, uma vez que os requisitos nutricionais das duas linhagens eram idênticos (linhagem A x linhagem G).

Os cruzamentos foram feitos com fundamento no fenômeno da heterocariose que ocorre em *A. nidulans* (PONTECORVO e col., 1953). A formação de heterocários balanceados foi possível, visto que as linhagens usadas no presente trabalho tem requisitos nutricionais diferentes, com exceção de um dos cruzamentos (linhagem A x linhagem G), onde os requisitos nutricionais são idênticos. Para a obtenção dos heterocários, número aproximadamente igual de conídios (cerca de 10^6 conídios/linhagem) de duas linhagens complementares foram colocados em tubos de ensaio, contendo 2,5 ml de MM + 2% MC, o que permitiu a germinação inicial dos esporos.

Após setenta e duas horas de incubação à 37°C formou-se uma película, a qual foi transferida para MM sólido . Essa película foi dividida entre os quadrantes da placa, a

fim de se formarem os setores heterocarióticos. Em seguida as placas foram vedadas e incubadas a 37°C. No caso do cruzamento entre linhagem C x linhagem D, com requisito para um fator comum, ou seja a biotina, foi usada esta substância tanto adicionada ao MM + 2% MC líquido, como ao MM sólido.

Os heterocários produzidos de acordo com a técnica já descrita, foram mantidos em placas com MM, vedadas com fita celulósica, em estufa incubadora a 37°C por um período de dez dias.

3.4.3. Medidas do diâmetro dos cleistotécios, número de ascósporos e sua viabilidade.

3.4.3.1. Diâmetro

Após o período de incubação (dez dias), doze cleistotécios de cada cruzamento, escolhidos ao acaso foram transferidos para placas de Petri contendo ágar 3% e, em seguida rolados na superfície do ágar para retirar hifas, células "Hulle e conídios aderentes. Os cleistotécios foram transferidos para uma lâmina esterilizada contendo ágar 3%, medidos em microscópio AVS.JENA modelo NJ com ocular micrométrica.

3.4.3.2. Número de ascósporos

Depois de feita a medida do diâmetro dos cleistoté

cios, os mesmos foram transferidos individualmente para tubos de ensaio contendo tween "80" e com auxílio de alça de platina esmagados contra a parede do tubo e, em seguida, suspensos em solução. A estimativa por mililitro do número de ascósporos de cada cleistotécio foi feita em hematímetro.

3.4.3.3. Viabilidade

Após a estimativa do número de ascósporos por mililitro em cada cleistotécio, foram feitas diluições apropriadas e 0,1 ml de cada suspensão foram espalhados em placas contendo MC sólido e incubadas a 37°C por setenta e duas horas. Terminado o período de incubação, as colônias foram contadas e baseando-se na diluição feita e volume semeado foi feita uma estimativa da viabilidade dos ascósporos, bem como a classificação das colônias de acordo com sua origem híbrida ou não híbrida. Em cruzamentos em que não foi possível distinguir morfologicamente as linhagens, utilizou-se placas contendo meio mínimo suplementado com os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento.

3.4.3.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas em microcomputador HP-85 da Hewlett Packard, utilizando o General Pack Statistics.

A fim de se verificar se existem diferenças entre os diâmetros dos cleistotécios produzidos por linhagens individuais e através de cruzamentos fez-se a análise da variância.

Para se verificar a existência de correlação entre o diâmetro do cleistotécio e número de ascósporos e entre diâmetro do cleistotécio e número de ascósporos viáveis, foi feita uma análise de regressão linear, sendo que os cleistotécios gêmeos foram incluídos na análise dos híbridos.

Para a análise da variância foi utilizado o teste F, segundo SNEDECOR e COCHRAN (1972).

$$F \text{ teste} = \frac{n \cdot S^2 \bar{x}}{(\sum S^2)/K} \quad S^2 \bar{x} = \frac{\sum (\bar{x} - \bar{\bar{x}})^2}{K - 1}$$

Onde: n = número de elementos de cada tratamento.

\bar{x} = média de cada amostra

K = número de tratamentos (amostras)

S^2 = variância das amostras

$S^2 \bar{x}$ = quadrado médio de tratamentos

Para a análise da correlação foi feito o cálculo de r de Pearson (SNEDECOR e COCHRAN, 1972).

$$r = \frac{N \sum XY - \sum X \sum Y}{\sqrt{[N \sum x^2 - (\sum x)^2] [N \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

$$t \text{ teste} = \frac{r}{\sqrt{(1-r^2) / (N - 2)}}$$

Onde: N = número de pares utilizados

x = variável independente

y = variável dependente

r = coeficiente de correlação

4. RESULTADOS

4.1. Produção de cleistotécios em MM, MM + 10% MC e MC a partir de linhagens individuais.

A Tabela 3 apresenta os dados referentes a produção de cleistotécios das sete linhagens individuais em três meios de cultura. Para a verificação da produção de cleistotécios foram feitos três ensaios, sendo efetuadas leituras e análise dos cleistotécios produzidos com dez, quinze e trinta dias após a incubação das placas.

Pelos dados da tabela, observa-se que não houve produção de cleistotécios em MM, uma vez que todas as linhagens apresentam crescimento residual, devido a possuírem marcas auxotróficas. Em MM + 10% MC, quatro das sete linhagens produziram cleistotécios. Em MC, apenas duas linhagens continuaram não produzindo cleistotécios.

4.2. Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade de ascósporos obtidos a partir de linhagens individuais.

Dos cleistotécios produzidos pelas linhagens indicadas na Tabela 3, doze cleistotécios de cada linhagem foram analisados, sendo feita a medida de seus diâmetros bem como uma estimativa do número de ascósporos e de sua viabilidade.

As Tabelas de 4 a 8 apresentam dados referentes ao tamanho, número de ascósporos e viabilidade de ascósporos por cleistotécio, bem como seus valores médios.

4.3. Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade de ascósporos obtidos através de cruzamentos entre as linhagens.

Dos vinte cruzamentos realizados, foram analisados doze cleistotécios de cada cruzamento num total de duzentos e quarenta cleistotécios, sendo feita a medida de seus diâmetros, uma estimativa do número de ascósporos e de sua viabilidade. A finalidade desta análise foi constatar a existência de uma correlação entre o diâmetro do cleistotécio e número de ascósporos e entre diâmetro do cleistotécio e viabilidade dos ascósporos.

Os resultados dos vinte cruzamentos relativos a diâmetro dos cleistotécios, número de ascósporos e viabilidade

de, bem como seus valores médios são apresentados nas Tabelas de número 9 a 28.

As análises estatísticas de todos os cruzamentos estão sumarizadas na Tabela 29, compreendendo análise da variância do diâmetro, número de ascósporos e número de ascósporos viáveis em cleistotécios híbridos e não híbridos e análise de regressão linear para a verificação do índice de correlação entre o diâmetro cleistotecial e número de ascósporos, entre diâmetro cleistotecial e viabilidade de ascósporos.

A Tabela 30 apresenta uma síntese dos resultados gerais dos cruzamentos com relação ao número de cleistotécios híbridos e não híbridos, e nas Figuras 2a e 2b estão representadas as frequências dos cleistotécios híbridos e não híbridos em forma de histograma.

Nas Figuras 3 a 6 estão representados graficamente os dados obtidos a partir das equações de regressão linear para os números totais de cleistotécios híbridos e não híbridos obtidos nos vinte cruzamentos, representando o diâmetro dos cleistotécios e os números de ascósporos; diâmetro dos cleistotécios e número de ascósporos viáveis.

TABELA 3 - Produção de cleistotécios em MM, MM + 10% MC e em MC.

MEIOS DE CULTURA	INCUBAÇÃO (DIAS)	LINHAGENS						
		A	B	C	D	E	F	G
MM	10	-	-	-	-	-	-	-
MM + 10% MC	10	-	-	-	-	-	-	-
MC	10	-	-	+	-	+	+	+
MM	15	-	-	-	-	-	-	-
MM + 10% MC	15	-	-	+	-	+	+	+
MC	15	-	-	+	-	+	+	+
MM	30	-	-	-	-	-	-	-
MM + 10% MC	30	-	-	+	-	+	+	+
MC	30	-	-	+	+	+	+	+

OBS.: + : produção de cleistotécios

- : não produção de cleistotécios

TABELA 4 - Diâmetro de cleistotécios, número e viabilidade de ascósporos obtidos à partir da linhagem C.

CLEISTOTÉCIO Nº	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
			Nº DE ASCÓSPOROS VIÁVEIS	%
01	130	$1,5 \times 10^5$	$6,0 \times 10^3$	4,0
02	120	$0,8 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$	27,5
03	120	$1,2 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$	41,6
04	105	$1,0 \times 10^5$	$6,3 \times 10^3$	6,3
05	105	$1,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	13,3
06	105	$1,0 \times 10^5$	$9,7 \times 10^3$	9,7
07	105	$0,8 \times 10^5$	$6,2 \times 10^3$	7,7
08	100	$1,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	11,0
09	90	$0,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	24,0
10	90	$0,4 \times 10^5$	$4,4 \times 10^3$	11,0
11	75	$0,5 \times 10^5$	$3,3 \times 10^3$	6,6
12	60	$0,5 \times 10^5$	$9,5 \times 10^3$	19,0

Nº de cleistotécios = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ) = 100,4

Nº médio de ascósporos/cleistotécios = $0,9 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécios = $1,3 \times 10^4$

TABELA 5 - Diâmetro de cleistotécios, número e viabilidade de ascósporos obtidos à partir da linhagem D.

CLEISTOTÉCIO Nº	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
			Nº DE ASCÓSPOROS VIÁVEIS	%
01	204	$1,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	19,0
02	200	$1,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	10,8
03	187	$0,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	26,0
04	165	$1,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	18,0
05	165	$0,8 \times 10^5$	$9,8 \times 10^3$	12,2
06	154	$1,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	13,3
07	138	$1,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^3$	9,0
08	98	$0,8 \times 10^5$	$8,0 \times 10^3$	10,0
09	98	$0,8 \times 10^5$	$8,1 \times 10^3$	10,1
10	93	$1,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	12,0
11	90	$0,4 \times 10^5$	$9,3 \times 10^3$	23,2
12	82	$0,8 \times 10^5$	$8,8 \times 10^3$	11,0

Nº de cleistotécios = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ) = 139,5

Nº médio de ascósporos/cleistotécios = $0,9 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécios = $1,2 \times 10^4$

TABELA 6 - Diâmetro de cleistotécios, número e viabilidade de ascósporos obtidos à partir da linhagem E.

CLEISTOTÉCIO Nº	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
			Nº DE ASCÓSPOROS VIÁVEIS	%
01	390	$1,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^3$	6,0
02	375	$2,0 \times 10^5$	$7,5 \times 10^3$	3,7
03	315	$0,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$	10,0
04	300	$05, \times 10^5$	$9,2 \times 10^2$	1,8
05	225	$1,3 \times 10^5$	$7,4 \times 10^3$	5,7
06	218	$1,5 \times 10^5$	$5,7 \times 10^3$	3,8
07	218	$0,8 \times 10^5$	$3,3 \times 10^3$	4,1
08	200	$1,0 \times 10^5$	$8,3 \times 10^3$	8,3
09	198	$0,4 \times 10^5$	$3,5 \times 10^3$	8,8
10	198	$0,8 \times 10^5$	$4,2 \times 10^3$	5,3
11	192	$1,0 \times 10^5$	$7,3 \times 10^3$	7,3
12	192	$1,2 \times 10^5$	$8,0 \times 10^3$	6,6

Nº de cleistotécios = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ) = 251,7

Nº médio de ascósporos/cleistotécios = $1,0 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio = $5,6 \times 10^3$

TABELA 7 - Diâmetro de cleistotécios, número e viabilidade de ascósporos obtidos à partir da linhagem F.

CLEISTOTÉCIO Nº	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
			Nº DE ASCÓSPOROS VIÁVEIS	%
01	208	$1,5 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$	9,3
02	200	$2,5 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$	8,8
03	200	$1,2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$	2,5
04	198	$0,8 \times 10^5$	$6,0 \times 10^3$	7,5
05	152	$1,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	11,0
06	138	$0,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	25,0
07	122	$1,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^3$	4,0
08	112	$1,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	6,6
09	100	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	10,0
10	100	$0,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	12,5
11	98	$0,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$	3,7
12	70	$0,4 \times 10^5$	$3,5 \times 10^3$	8,7

Nº de cleistotécios = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ) = 141,5

Nº médio de ascósporos/cleistotécio = $1,0 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio = $9,0 \times 10^3$

TABELA 8 - Diâmetro de cleistotécios, número e viabilidade de ascósporos obtidos a partir da linhagem G.

CLEISTOTÉCIO Nº	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
			Nº DE ASCÓSPOROS VIÁVEIS	%
01	480	$2,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$	0,4
02	270	$0,5 \times 10^5$	$3,2 \times 10^3$	6,4
03	255	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	10,0
04	240	$1,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^2$	0,2
05	240	$1,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	13,0
06	195	$2,3 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$	9,6
07	195	$1,6 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	6,2
08	180	$0,8 \times 10^5$	$3,6 \times 10^3$	4,5
09	175	$0,4 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$	7,5
10	100	$1,2 \times 10^5$	$6,4 \times 10^3$	5,3
11	100	$1,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	1,3
12	98	$1,0 \times 10^5$	$2,4 \times 10^3$	2,4

Nº de cleistotécios = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ) = 210,6

Nº médio de ascósporos/cleistotécio = $1,2 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio = $6,3 \times 10^3$

TABELA 9 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados à partir do cruzamento linhagem A x linhagem B.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	H	191	$1,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^3$	3,1
02	H	191	$1,2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$	2,4
03	H	187	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	3,0
04	H	142	$0,8 \times 10^5$	$1,7 \times 10^3$	2,1
05	H	137	$1,2 \times 10^5$	$5,9 \times 10^3$	5,0
06	H	98	$0,8 \times 10^5$	$6,1 \times 10^2$	1,0
07	H	83	$0,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$	1,3
08	-	80	$0,8 \times 10^5$	0	0
09	H	75	$0,4 \times 10^5$	$5,8 \times 10^2$	1,4
10	H	75	$0,4 \times 10^5$	$4,4 \times 10^2$	1,1
11	-	60	$0,4 \times 10^5$	0	0
12	H	60	$0,4 \times 10^5$	$2,7 \times 10^2$	0,6

Nº de cleistotécios: H=10, NH=0, TOTAL = 10

Diâmetro médio dos cleistotécios: H=137,9, NH=-, TOTAL = 137,9

Nº médio de ascósporos/cleistotécio: H= $0,88 \times 10^5$, NH=0, TOTAL = $0,88 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H= $1,5 \times 10^3$, NH=0, TOTAL = $1,5 \times 10^3$

TABELA 10 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem A x linhagem C.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPOROS VIÁVEIS	%
01	H	237	$0,8 \times 10^5$	$4,0 \times 10^3$	4,7
02	NHC*	236	$1,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	1,1
03	NHC	209	$0,8 \times 10^5$	$2,5 \times 10^3$	3,0
04	NHC	182	$0,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	1,5
05	NHC	173	$0,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$	2,7
06	NHC	164	$0,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$	1,5
07	NHC	164	$0,4 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	4,4
08	NHC	163	$0,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$	2,7
09	NHC	155	$0,8 \times 10^5$	$1,6 \times 10^3$	2,0
10	NHC	136	$0,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	1,6
11	NHC	136	$0,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$	2,7
12	NHC	118	$0,4 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	4,4

Nº de cleistotécios: H=1, NH=11, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=237, NH=183, TOTAL = 210

Nº médio de ascósporos/cleistotécios: H= $0,8 \times 10^5$, NH= $0,6 \times 10^5$, TOTAL = $0,7 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécios: H= $4,0 \times 10^3$, NH= $1,6 \times 10^4$,

TOTAL = $1,0 \times 10^4$

* NHC - cleistotécios não híbridos originados a partir da linhagem C.

TABELA 11 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem A x linhagem D.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	H	200	$2,0 \times 10^5$	$6,4 \times 10^2$	32,1
02	H	173	$1,2 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$	4,0
03	H	164	$1,6 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$	3,0
04	H	145	$0,8 \times 10^5$	$6,4 \times 10^2$	0,8
05	H	136	$0,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	1,4
06	H	136	$0,4 \times 10^5$	$7,3 \times 10^2$	1,8
07	H	136	$0,4 \times 10^5$	$6,3 \times 10^2$	1,6
08	H	118	$0,4 \times 10^5$	$2,6 \times 10^2$	0,6
09	NHD*	112	$0,8 \times 10^5$	$3,4 \times 10^2$	0,4
10	H	109	$1,2 \times 10^5$	$2,6 \times 10^2$	2,2
11	NHD	91	$0,4 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	1,3
12	NHD	64	$0,4 \times 10^5$	$2,8 \times 10^2$	0,7

Nº de cleistotécios: H=9, NH=3, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=146, NH=89, TOTAL = 117

Nº médio de ascósporos/cleistotécio: H= $1,0 \times 10^5$, NH= $0,5 \times 10^5$, TOTAL = $0,7 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H= $2,4 \times 10^3$, NH= $3,8 \times 10^2$,

TOTAL = $1,4 \times 10^3$

* NHD - cleistotécio não híbrido originado a partir da linhagem D.

TABELA 12 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados à partir do cruzamento linhagem A x linhagem E.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	H	318	$1,2 \times 10^5$	$7,4 \times 10^2$	6,1
02	H	300	$1,6 \times 10^5$	$7,1 \times 10^2$	4,4
03	H	282	$1,2 \times 10^5$	$4,3 \times 10^2$	3,5
04	H	245	$1,2 \times 10^5$	$7,7 \times 10^3$	6,4
05	H	236	$1,2 \times 10^5$	$7,4 \times 10^3$	6,2
06	H	227	$1,2 \times 10^5$	$7,0 \times 10^3$	5,8
07	H	209	$0,8 \times 10^5$	$4,5 \times 10^3$	5,6
08	H	191	$0,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$	1,4
09	H	173	$0,4 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$	12,0
10	NHE*	160	$1,2 \times 10^5$	$3,1 \times 10^3$	2,5
11	NHE	143	$0,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$	3,5
12	NHE	100	$0,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$	3,5

Nº de cleistotécios: H=9, NH=3, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=242, NH=134, TOTAL = 188

Nº médio de ascósporos/cleistotécio: H= $1,0 \times 10^5$, NH= $0,9 \times 10^5$, TOTAL = $0,9 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H= $5,7 \times 10^3$, NH= $2,9 \times 10^3$

TOTAL = $4,3 \times 10^3$

NHE* - cleistotécio não híbrido originado a partir da linhagem E.

TABELA 13 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados à partir do cruzamento linhagem A x linhagem F.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	Nº DE ASCÓSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	H	300	$0,8 \times 10^5$	$4,6 \times 10^3$	6,0
02	H	273	$0,4 \times 10^5$	$7,5 \times 10^2$	2,0
03	H	273	$0,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$	4,0
04	H	245	$0,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	3,0
05	H	245	$0,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	3,0
06	H	227	$0,8 \times 10^5$	$3,2 \times 10^3$	4,0
07	H	227	$0,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$	1,4
08	H	209	$0,8 \times 10^5$	$2,1 \times 10^3$	2,6
09	H	209	$0,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$	3,4
10	H	209	$0,4 \times 10^5$	$3,1 \times 10^3$	7,8
11	H	164	$0,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	3,5
12	H	109	$0,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^2$	0,3

Nº de cleistotécios: H=12, NH=0, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=224, NH=-, TOTAL = 224

Nº médio de ascósporos/cleistotécio: H= $0,5 \times 10^5$, NH=0, TOTAL = $0,5 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H= $1,9 \times 10^3$, NH=0,

TOTAL = $1,9 \times 10^3$

TABELA 14 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem B x linhagem C.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPOROS VIÁVEIS	%
01	NHC*	200	$1,2 \times 10^5$	$8,0 \times 10^3$	6,6
02	NHC	200	$0,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	1,6
03	NHC	200	$0,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	2,4
04	NHC	191	$0,8 \times 10^5$	$3,6 \times 10^3$	4,6
05	NHC	182	$0,8 \times 10^5$	$1,7 \times 10^3$	2,1
06	NHC	182	$0,4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^3$	6,3
07	NHC	154	$0,8 \times 10^5$	$1,6 \times 10^3$	2,0
08	NHC	145	$0,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	2,4
09	NHC	143	$0,4 \times 10^5$	$1,7 \times 10^3$	4,2
10	NHC	136	$0,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^3$	2,2
11	NHC	118	$0,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	2,3
12	NHC	100	$0,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$	3,0

Nº de cleistotécios: H=0, NH=12, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=--, NH=162, TOTAL = 162

Nº médio de ascósporos/cleistotécios: H=0, NH= $0,7 \times 10^5$, TOTAL = $0,7 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H=0, NH= $2,4 \times 10^3$

TOTAL = $2,4 \times 10^3$

NHC* - cleistotécio não híbrido originado a partir da linhagem C.

TABELA 15 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados à partir do cruzamento linhagem B x linhagem D.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	Nº DE ASCÓSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	H	245	$0,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	2,0
02	H	227	$0,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	1,8
03	H	227	$1,2 \times 10^5$	$6,5 \times 10^3$	5,4
04	NHD*	209	$0,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	1,4
05	H	182	$0,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	1,6
06	H	182	$0,4 \times 10^5$	$7,2 \times 10^3$	1,8
07	H	163	$0,4 \times 10^5$	$7,5 \times 10^3$	2,0
08	NHD	154	$0,4 \times 10^5$	$8,1 \times 10^2$	2,0
09	NHD	136	$0,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	2,5
10	H	127	$0,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	1,4
11	NHD	127	$0,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	2,8
12	NHD	91	$0,4 \times 10^5$	$4,5 \times 10^2$	1,1

Nº de cleistotécios: H=7, NH=5, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=193, NH=143, TOTAL = 168

Nº médio de ascósporos/cleistotécios: H= $0,7 \times 10^5$, NH= $0,5 \times 10^5$, TOTAL = $0,6 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H= $1,8 \times 10^3$, NH= $9,0 \times 10^2$

TOTAL = $1,3 \times 10^3$

*
NDH - cleistotécio não híbrido originado a partir da linhagem D.

TABELA 16 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem B x linhagem E.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	H	291	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	8,5
02	H	273	$1,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	11,1
03	H	273	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	8,1
04	H	273	$1,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$	13,6
05	H	245	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	19,2
06	H	236	$1,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$	11,4
07	NHE*	227	$0,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	1,5
08	NHE	218	$0,8 \times 10^5$	$1,7 \times 10^3$	2,1
09	NHE	218	$0,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	2,5
10	NHE	209	$0,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	2,4
11	NHE	200	$0,8 \times 10^5$	$2,2 \times 10^3$	3,0
12	NHE	182	$0,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	1,4

Nº de cleistotécios: H=6, NH=6, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=265, NH=209, TOTAL = 237

Nº médio de ascósporos/cleistotécios: H= $1,2 \times 10^5$, NH= $0,8 \times 10^5$, TOTAL = $1,0 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécios: H= $1,2 \times 10^4$, NH= $1,5 \times 10^3$

TOTAL = $1,3 \times 10^4$

NHE* - cleistotécio não híbrido originado a partir da linhagem E.

TABELA 17 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados à partir do cruzamento linhagem B x linhagem F.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPOROS VIÁVEIS	%
01	H	130	$0,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	1,5
02	H	127	$1,2 \times 10^5$	$8,0 \times 10^3$	6,5
03	NHF*	118	$0,8 \times 10^5$	$9,0 \times 10^2$	1,1
04	H	116	$0,4 \times 10^5$	$4,6 \times 10^2$	1,2
05	H	109	$0,8 \times 10^5$	$6,0 \times 10^2$	0,7
06	H	109	$0,4 \times 10^5$	$2,2 \times 10^2$	0,5
07	NHF	104	$0,4 \times 10^5$	$2,6 \times 10^2$	0,6
08	H	100	$0,4 \times 10^5$	$3,4 \times 10^2$	1,0
09	NHF	100	$0,4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^2$	0,6
10	H	91	$0,8 \times 10^5$	$6,6 \times 10^2$	0,8
11	H	91	$0,4 \times 10^5$	$2,0 \times 10^2$	0,4
12	NHF	80	$0,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^2$	0,6

Nº de cleistotécios : H=8, NH=4, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=109, NH=100, TOTAL = 104

Nº médio de ascósporos/cleistotécio: H= $0,6 \times 10^5$, NH= $0,5 \times 10^5$, TOTAL = $0,5 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécios: H= $1,4 \times 10^3$, NH= $4,0 \times 10^2$

TOTAL = $9,0 \times 10^2$

NHF* - cleistotécio não híbrido originado a partir da linhagem F.

TABELA 18 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem B x linhagem G.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	H	291	$1,2 \times 10^5$	$4,8 \times 10^3$	4,0
02	H	227	$0,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$	1,3
03	H	223	$0,8 \times 10^5$	$7,3 \times 10^2$	1,0
04	NHG*	218	$0,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$	2,0
05	NHG	209	$0,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$	2,0
06	NHG	200	$0,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	2,0
07	H	198	$1,2 \times 10^5$	$4,5 \times 10^3$	4,0
08	NHG	173	$0,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	1,2
09	NHG	173	$0,4 \times 10^5$	$4,0 \times 10^3$	0,1
10	NHG	169	$0,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	3,3
11	NHG	145	$0,4 \times 10^5$	$4,5 \times 10^2$	1,1
12	NHG	100	$0,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$	3,0

Nº de cleistotécios : H=4, NH=8, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=235, NH=173, TOTAL = 204

Nº médio dos ascósporos/cleistotécio: H= $1,0 \times 10^5$, NH= $0,6 \times 10^5$, TOTAL = $0,8 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H= $2,8 \times 10^3$, NH= $1,1 \times 10^3$

TOTAL = $1,9 \times 10^3$

NHG* - cleistotécio não híbrido originado a partir da linhagem G.

TABELA 19 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem C x linhagem D.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	G*	318	$1,6 \times 10^5$	$8,1 \times 10^3$	5,0
02	G	255	$1,2 \times 10^5$	$4,6 \times 10^3$	4,0
03	G	237	$0,4 \times 10^5$	$8,0 \times 10^2$	2,0
04	G	236	$0,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10^2$	0,4
05	G	227	$0,4 \times 10^5$	$2,6 \times 10^2$	0,6
06	G	218	$1,6 \times 10^5$	$8,0 \times 10^2$	0,5
07	G	218	$1,2 \times 10^5$	$7,5 \times 10^3$	6,3
08	G	218	$0,8 \times 10^5$	$9,6 \times 10^2$	1,2
09	G	218	$0,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^2$	0,2
10	NHC**	209	$1,6 \times 10^5$	$3,6 \times 10^3$	2,3
11	NHC	209	$0,8 \times 10^5$	$1,6 \times 10^2$	0,2
12	NHD***	209	$0,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^2$	0,4

Nº de cleistotécios : H=9, NH=3, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=238, NH=209, TOTAL = 223

Nº médio de ascósporos/cleistotécio: H= $0,9 \times 10^5$, NH= $0,9 \times 10^5$, TOTAL = $0,9 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H= $2,6 \times 10^3$, NH= $1,3 \times 10^3$

TOTAL = $1,9 \times 10^3$

NHC** cleistotécio NH originado a partir da linhagem C.

NHD*** cleistotécio NH originado a partir da linhagem D.

G* - cleistotécio gêmeo.

TABELA 20 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem C x linhagem E.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	NHC*	227	$0,8 \times 10^5$	$3,5 \times 10^2$	0,4
02	NHC	200	$0,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	1,7
03	NHC	200	$0,8 \times 10^5$	$6,0 \times 10^2$	1,0
04	NHC	191	$1,2 \times 10^5$	$7,0 \times 10^3$	6,0
05	NHC	191	$1,2 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	2,0
06	NHC	191	$0,4 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	5,0
07	NHC	182	$1,2 \times 10^5$	$3,3 \times 10^3$	2,7
08	NHC	182	$0,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	1,3
09	NHC	145	$1,6 \times 10^5$	$2,6 \times 10^2$	0,2
10	NHC	127	$0,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	3,2
11	NHC	109	$0,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	3,0
12	NHC	55	$0,4 \times 10^5$	$3,4 \times 10^3$	9,0

Nº de cleistotécios: H=0, NH=12, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=-, NH=166, TOTAL = 166

Nº médio de ascósporos/cleistotéccio: H=0, NH= $0,8 \times 10^5$, TOTAL = $0,8 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotéccio: H=0, NH= $1,9 \times 10^3$, TOTAL = $1,9 \times 10^3$

NHC* - cleistotéccio não híbrido originado a partir da linhagem C.

TABELA 21 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados à partir do cruzamento linhagem C x linhagem F.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	H	246	$1,6 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	8,1
02	H	246	$1,2 \times 10^5$	$7,2 \times 10^2$	0,1
03	H	245	$1,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	9,0
04	H	209	$0,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	1,6
05	H	200	$0,8 \times 10^5$	$4,1 \times 10^2$	0,5
06	H	191	$0,8 \times 10^5$	$7,8 \times 10^2$	1,0
07	NHC*	182	$0,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^3$	2,2
08	NHC	173	$0,4 \times 10^5$	$2,1 \times 10^3$	5,3
09	NHC	172	$0,4 \times 10^5$	$4,0 \times 10^3$	1,0
10	H	155	$0,8 \times 10^5$	$3,4 \times 10^2$	0,4
11	H	136	$0,8 \times 10^5$	$8,3 \times 10^2$	1,0
12	NHC	100	$0,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	0,3

Nº de cleistotécios: H=8, NH=4, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=203, NH=157, TOTAL = 180

Nº médio de ascósporos/cleistotécio: H= $1,0 \times 10^2$, NH= $0,5 \times 10^2$, TOTAL = $0,7 \times 10^2$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H= $3,5 \times 10^3$, NH= $1,4 \times 10^3$

TOTAL = $2,4 \times 10^3$

NHC* - cleistotécio não híbrido originado a partir da linhagem C.

TABELA 22 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem C x linhagem G.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	NHC*	300	$5,6 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	5,1
02	NHC	236	$2,0 \times 10^5$	$7,5 \times 10^3$	4,0
03	NHC	227	$0,8 \times 10^5$	$7,0 \times 10^3$	8,8
04	NHC	218	$0,8 \times 10^5$	$8,4 \times 10^3$	10,5
05	NHC	182	$1,6 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$	30,5
06	NHC	173	$0,8 \times 10^5$	$8,7 \times 10^3$	10,8
07	NHC	164	$4,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^3$	1,0
08	NHC	163	$0,8 \times 10^5$	$7,1 \times 10^3$	8,9
09	NHC	154	$0,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	28,9
10	NHC	136	$0,8 \times 10^5$	$4,4 \times 10^3$	5,5
11	NHC	127	$0,4 \times 10^5$	$1,7 \times 10^4$	43,2
12	NHC	109	$0,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	30,8

Nº de cleistotécios: H=0, NH=12, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=-, NH=182, TOTAL = 182

Nº médio de ascósporos/cleistotécio: H=0, NH= $1,5 \times 10^5$, TOTAL = $1,5 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H=0, NH= $1,0 \times 10^4$, TOTAL = $1,0 \times 10^4$

NHC* - cleistotécio não híbrido originado a partir da linhagem C.

TABELA 23 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados à partir do cruzamento linhagem D x linhagem E.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	H	282	$0,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	2,4
02	H	227	$1,6 \times 10^5$	$7,2 \times 10^3$	4,5
03	H	218	$0,8 \times 10^5$	$3,5 \times 10^3$	4,4
04	H	218	$0,4 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$	6,8
05	H	209	$0,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	2,9
06	H	200	$0,8 \times 10^5$	$4,3 \times 10^3$	5,3
07	H	182	$0,8 \times 10^5$	$6,0 \times 10^3$	7,3
08	H	182	$0,4 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$	12,0
09	NHD*	182	$0,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	2,4
10	NHD	173	$0,4 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$	7,1
11	NHD	164	$0,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$	3,4
12	NHD	127	$0,4 \times 10^5$	$2,7 \times 10^3$	6,8

Nº de cleistotécios: H=8, NH=4, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=215, NH=161, TOTAL = 188

Nº médio de ascósporos/cleistotécio: H= $0,7 \times 10^5$, NH= $0,6 \times 10^5$, TOTAL = $0,6 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H= $4,0 \times 10^3$, NH= $2,5 \times 10^3$

TOTAL = $3,2 \times 10^3$

NHD*- cleistotécio não híbrido originado a partir da linhagem D.

TABELA 24 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem D x linhagem F.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCOSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	H	245	$0,8 \times 10^5$	$3,4 \times 10^2$	0,4
02	H	237	$0,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	1,5
03	H	236	$0,8 \times 10^5$	$3,3 \times 10^2$	0,4
04	H	227	$0,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^2$	0,2
05	H	218	$0,8 \times 10^5$	$4,4 \times 10^2$	0,5
06	H	218	$0,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^2$	0,4
07	H	200	$0,8 \times 10^5$	$4,0 \times 10^2$	0,5
08	H	191	$0,4 \times 10^5$	$6,5 \times 10^2$	1,6
09	NHF*	191	$1,2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$	2,4
10	NHF	182	$0,4 \times 10^5$	$3,6 \times 10^2$	0,9
11	NHF	145	$0,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^2$	0,3
12	NHF	109	$0,4 \times 10^5$	$3,2 \times 10^2$	0,8

Nº de cleistotécios: H=8, NH=4, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=221, NH=157, TOTAL = 189

Nº médio de ascósporos/cleistotécio: H= $0,7 \times 10^5$, NH= $0,6 \times 10^5$, TOTAL = $0,6 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H= $4,5 \times 10^2$, NH= $9,2 \times 10^2$

TOTAL = $6,8 \times 10^2$

NHF* - cleistotécio não híbrido originado a partir da linhagem D.

TABELA 25 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados à partir do cruzamento linhagem D x linhagem G.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍBRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPOROS VIÁVEIS	%
01	H	254	$0,4 \times 10^5$	$8,1 \times 10^2$	2,0
02	H	182	$1,2 \times 10^5$	$4,2 \times 10^3$	3,5
03	H	182	$0,8 \times 10^5$	$6,3 \times 10^2$	0,8
04	H	182	$0,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	1,7
05	H	164	$1,6 \times 10^5$	$5,8 \times 10^3$	3,6
06	H	164	$0,4 \times 10^5$	$5,3 \times 10^2$	1,3
07	H	155	$0,4 \times 10^5$	$4,6 \times 10^2$	1,1
08	H	146	$1,2 \times 10^5$	$3,5 \times 10^3$	3,0
09	H	136	$0,8 \times 10^5$	$4,3 \times 10^2$	0,5
10	H	136	$0,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^2$	0,2
11	H	109	$0,4 \times 10^5$	$3,6 \times 10^2$	0,9
12	H	100	$0,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^2$	0,3

Nº de cleistotécios: H=12, NH=0, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=159, NH=-, TOTAL = 159

Nº médio de ascósporos/cleistotécio: H= $0,7 \times 10^5$, NH=0, TOTAL = $0,7 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H= $1,5 \times 10^3$, NH=0, TOTAL = $1,5 \times 10^3$

TABELA 26 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados à partir do cruzamento linhagem E x linhagem F.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	H	309	$1,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	7,1
02	H	300	$1,6 \times 10^5$	$8,8 \times 10^3$	5,5
03	H	291	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	1,5
04	H	282	$2,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^3$	0,9
05	H	273	$1,2 \times 10^5$	$6,0 \times 10^3$	5,0
06	H	273	$1,2 \times 10^5$	$5,5 \times 10^3$	4,6
07	H	245	$1,2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$	2,4
08	H	245	$0,8 \times 10^5$	$6,2 \times 10^2$	0,8
09	H	245	$0,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	1,7
10	H	227	$0,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$	1,9
11	H	227	$0,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	1,8
12	-	209	$0,8 \times 10^5$	0	0

Nº de cleistotécios: H=11, NH=0, TOTAL = 11

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=265, NH=-, TOTAL = 265

Nº de ascósporos/cleistotécio: H= $1,2 \times 10^5$, NH=0, TOTAL = $1,2 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H= $3,9 \times 10^3$, NH=0, TOTAL = $3,9 \times 10^3$

TABELA 27 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados a partir do cruzamento linhagem E x linhagem G.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	H	364	$1,6 \times 10^5$	$8,4 \times 10^3$	5,2
02	H	364	$1,6 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$	3,0
03	H	355	$1,2 \times 10^5$	$4,3 \times 10^3$	3,5
04	H	327	$0,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	1,8
05	H	327	$0,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	2,5
06	H	282	$1,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	11,7
07	H	273	$1,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	11,0
08	H	273	$2,4 \times 10^5$	$4,0 \times 10^3$	1,7
09	H	264	$0,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	1,5
10	H	263	$2,0 \times 10^5$	$3,6 \times 10^3$	18,3
11	H	236	$0,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10^2$	0,4
12	H	200	$0,8 \times 10^5$	$3,3 \times 10^2$	0,4

Nº de cleistotécios: H=12, NH=0, TOTAL = 12

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=294, NH=-, TOTAL = 294

Nº médio de ascósporos/cleistotécio: H= $1,3 \times 10^5$, NH=0, TOTAL = $1,3 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H= $5,2 \times 10^3$, NH=0, TOTAL = $5,2 \times 10^3$

TABELA 28 - Diâmetro dos cleistotécios, número e viabilidade dos ascósporos originados à partir do cruzamento linhagem F x linhagem G.

CLEISTOTÉCIO Nº	CONDIÇÃO HÍ- BRIDA (H) OU NÃO HÍBRIDA (NH)	DIÂMETRO (μ)	Nº DE ASCÓSPOROS	VIABILIDADE	
				Nº DE ASCÓSPO- ROS VIÁVEIS	%
01	H	309	$0,4 \times 10^5$	$5,3 \times 10^2$	1,3
02	0	291	$2,4 \times 10^5$	0	0
03	H	291	$2,0 \times 10^5$	$5,8 \times 10^3$	29,0
04	H	273	$0,8 \times 10^5$	$7,3 \times 10^2$	0,9
05	H	273	$1,6 \times 10^5$	$6,7 \times 10^3$	4,2
06	H	264	$0,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	1,5
07	H	263	$1,2 \times 10^5$	$5,2 \times 10^3$	4,4
08	H	245	$0,4 \times 10^5$	$5,0 \times 10^2$	1,3
09	H	227	$0,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	2,3
10	H	227	$0,4 \times 10^5$	$0,6 \times 10^2$	2,4
11	H	191	$0,8 \times 10^5$	$7,3 \times 10^2$	1,0
12	H	173	$0,8 \times 10^5$	$8,0 \times 10^2$	1,0

Nº de cleistotécios: H=11, NH=0, TOTAL = 11

Diâmetro médio dos cleistotécios (μ): H=249, NH=0, TOTAL = 249

Nº médio de ascósporos/cleistotécio: H= $0,9 \times 10^5$, NH=0, TOTAL = $0,9 \times 10^5$

Nº médio de ascósporos viáveis/cleistotécio: H= $2,1 \times 10^5$, NH=0, TOTAL = $2,1 \times 10^5$

TABELA 29 - Ascósporos e Número de Ascósporos Viáveis; Coeficiente de Regressão Linear entre Diâmetro do Cleistotécio e Número de Ascósporos, entre Diâmetro do Cleistotécio e Número de Ascósporos Viáveis para Cleistotécios obtidos à partir de cada um dos vinte cruzamentos:

TIPOS DE ANÁLISE ESTADÍSTICA		ANÁLISE DE VARIÂNCIA			REGRESSÃO LINEAR				
CRUZAMENTOS	CLEIS TOTIFÉCIOS	DIÂMETRO X Nº DE ASCOSP. X VIÁVEIS		DIÂMETRO X Nº DE ASCOSP.		DIÂMETRO X VIÁVEIS			
		F	SIGNIFICÂNCIA	R ²	t	SIGNIFICÂNCIA	R ²	t	SIGNIFICÂNCIA
A X B	H	56,4	*	0,374	2,06	*	0,347	2,06	*
	NH	-	-	-	-	-	-	-	-
A X C	H	-	-	-	-	-	-	-	-
	NH	76,4	*	0,406	2,48	*	0,292	2,28	*
A X D	H	25,8	*	0,529	2,80	*	0,658	3,67	**
	NH	15,9	*	-	-	-	-	-	-
A X E	H	80,5	*	0,676	3,82	**	0,289	1,68	*
	NH	47,5	*	-	-	-	-	-	-
A X F	H	87,2	*	0,031	0,56	NS	0,181	1,48	NS
	NH	-	-	-	-	-	-	-	-
B X C	H	-	-	-	-	-	-	-	-
	NH	116,1	*	0,208	1,62	NS	0,211	1,63	NS
B X D	H	34,8	*	0,556	2,50	*	0,197	1,10	NS
	NH	35,2	*	0,719	3,77	*	0,498	1,72	NS
B X E	H	116,4	*	0,186	0,95	NS	0,090	0,63	NS
	NH	100,0	*	-	-	-	0,011	0,22	-
B X F	H	37,0	*	0,246	1,39	NS	0,309	1,63	NS
	NH	2,6	*	-	-	-	-	-	-
B X G	H	72,2	*	-	-	-	-	-	-
	NH	61,7	*	0,501	2,45	*	0,227	1,32	NS
C X D	H	40,7	*	0,189	1,27	NS	0,385	2,09	*
	NH	6,9	*	-	-	-	-	-	-
C X E	H	-	-	-	-	-	-	-	-
	NH	51,1	*	0,149	1,32	NS	0,010	0,31	NS
C X F	H	82,0	*	0,574	2,48	*	0,384	1,93	NS
	NH	24,2	*	0,042	0,29	NS	0,023	0,21	NS
C X G	H	-	-	-	-	-	-	-	-
	NH	9,9	*	0,423	2,70	*	0,166	1,67	NS
D X E	H	27,1	*	0,073	0,68	NS	0,163	1,08	NS
	NH	25,8	*	-	-	-	-	-	-
D X F	H	113,2	*	-	-	-	0,572	2,82	*
	NH	8,8	*	-	-	-	-	-	-
D X G	H	43,4	*	0,006	0,24	NS	0,038	0,62	NS
	NH	-	-	-	-	-	-	-	-
E X F	H	87,2	*	0,717	4,77	**	0,516	3,09	**
	NH	-	-	-	-	-	-	-	-
E X G	H	47,0	*	0,023	0,51	NS	0,012	0,34	NS
	NH	-	-	-	-	-	-	-	-
F X G	H	24,3	*	0,166	1,33	NS	0,154	1,28	NS
	NH	-	-	-	-	-	-	-	-
H Totais				0,208	6,120	**	0,051	2,770	*
NH Totais				0,216	4,960	**	0,008	0,885	NS

OBS.: **: significativo ao nível de 5%

*: significativo ao nível de 1%

NS: não significativo

-: dados insuficientes para o cálculo

TABELA 30 - Síntese dos resultados gerais dos cruzamentos com relação ao número de cleistotécios híbridos e não híbridos.

	B		C		D		E		F		G						
	NH	H T	NH	H T	NH	H T	NH	H T	NH	H T	NH	H T					
A	0	10	11	1	12	3	9	12	3	9	12	0	12	12	0	0	0
B			12	0	12	5	7	12	6	6	12	4	8	12	8	4	12
C						3	9	12	12	0	12	4	8	12	12	0	12
D									4	8	12	4	8	12	0	12	12
E												0	11	11	0	12	12
F															0	11	11

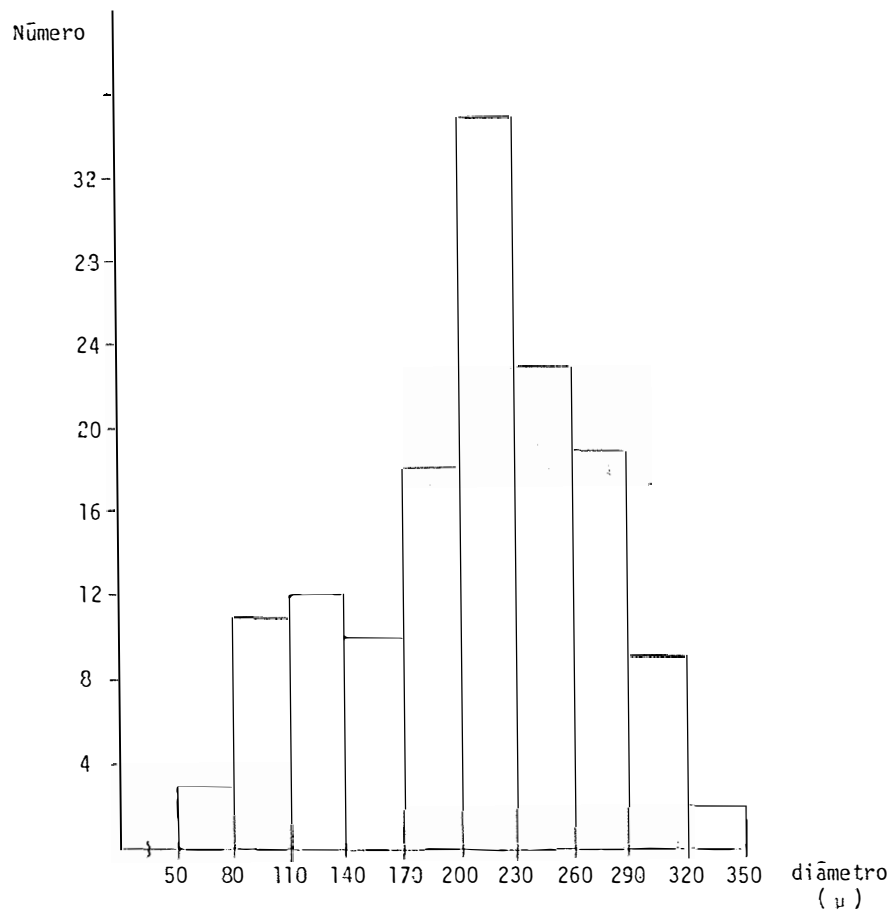


FIGURA 2a. - Histograma com resultados gerais dos cruzamentos-diâmetro dos cleistotécios e seus estados híbridos nos vinte cruzamentos.

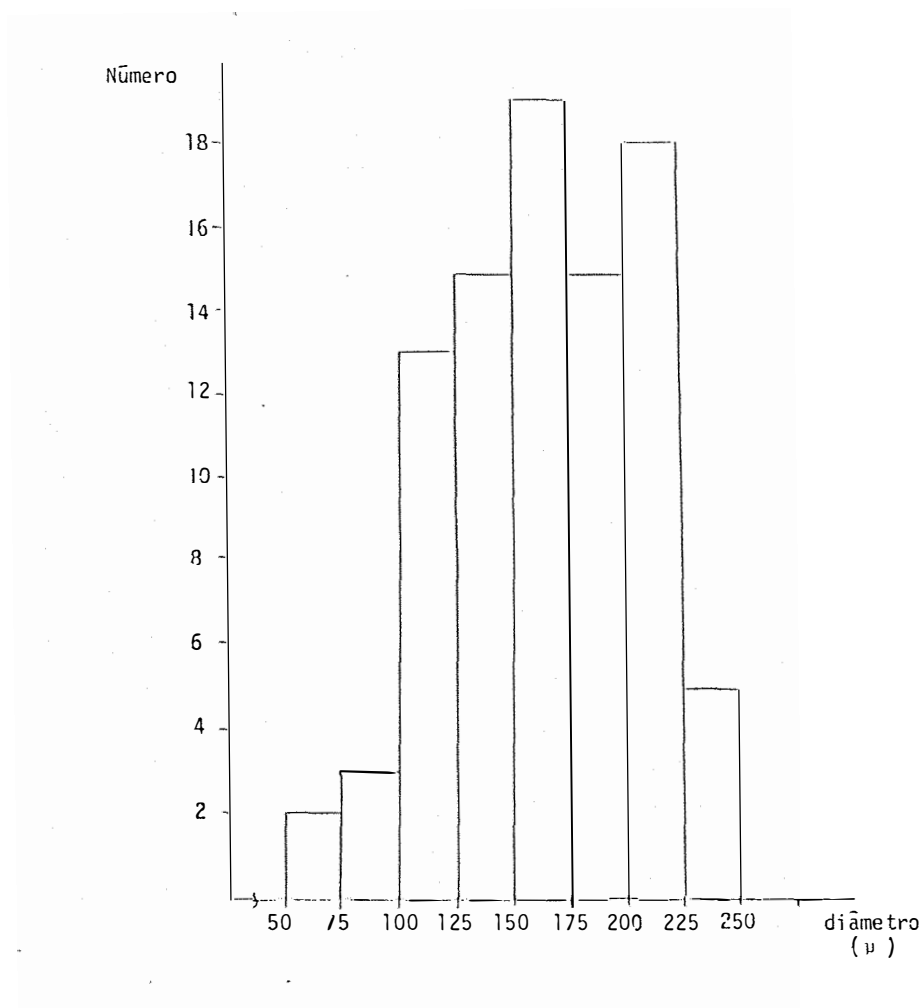


FIGURA 2b. - Histograma com resultados gerais dos cruzamentos-diâmetro dos cleistotécios e seus estados não híbridos nos vinte cruzamentos.

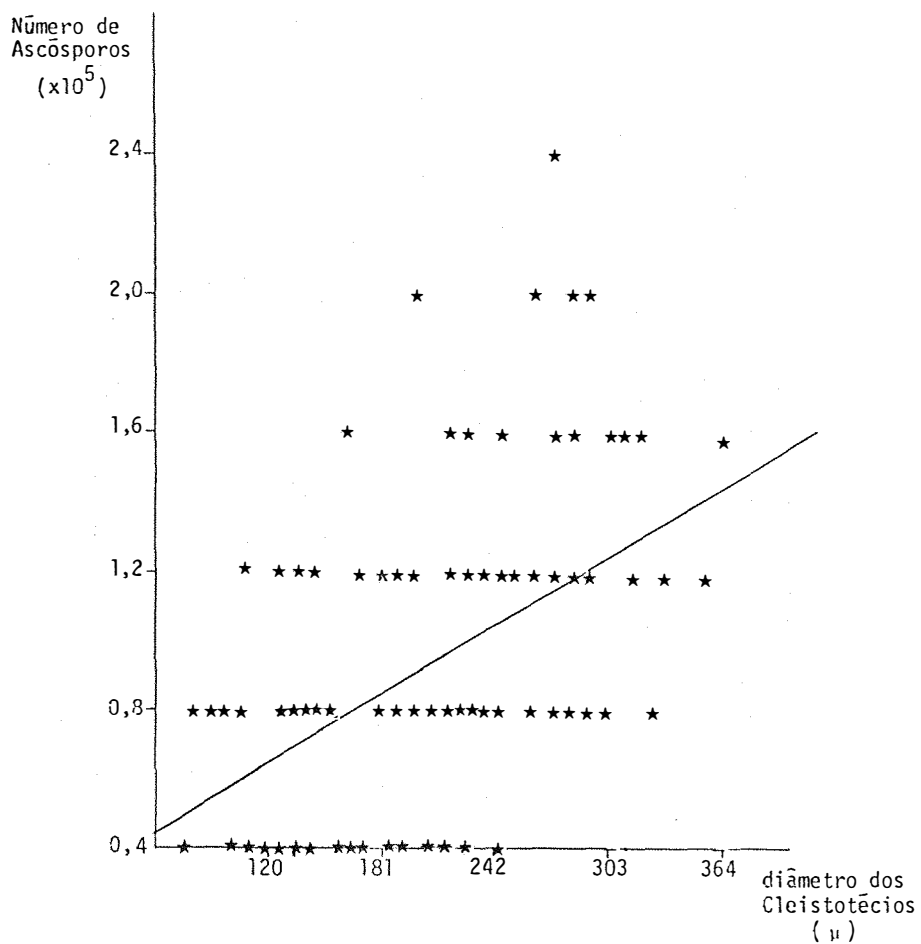


FIGURA 3 - Representação gráfica dos dados obtidos à partir das equações de regressão linear para o número total de cleistotécios híbridos obtidos nos vinte cruzamentos, representando o diâmetro dos cleistotécios e o número de ascósporos do mesmo.

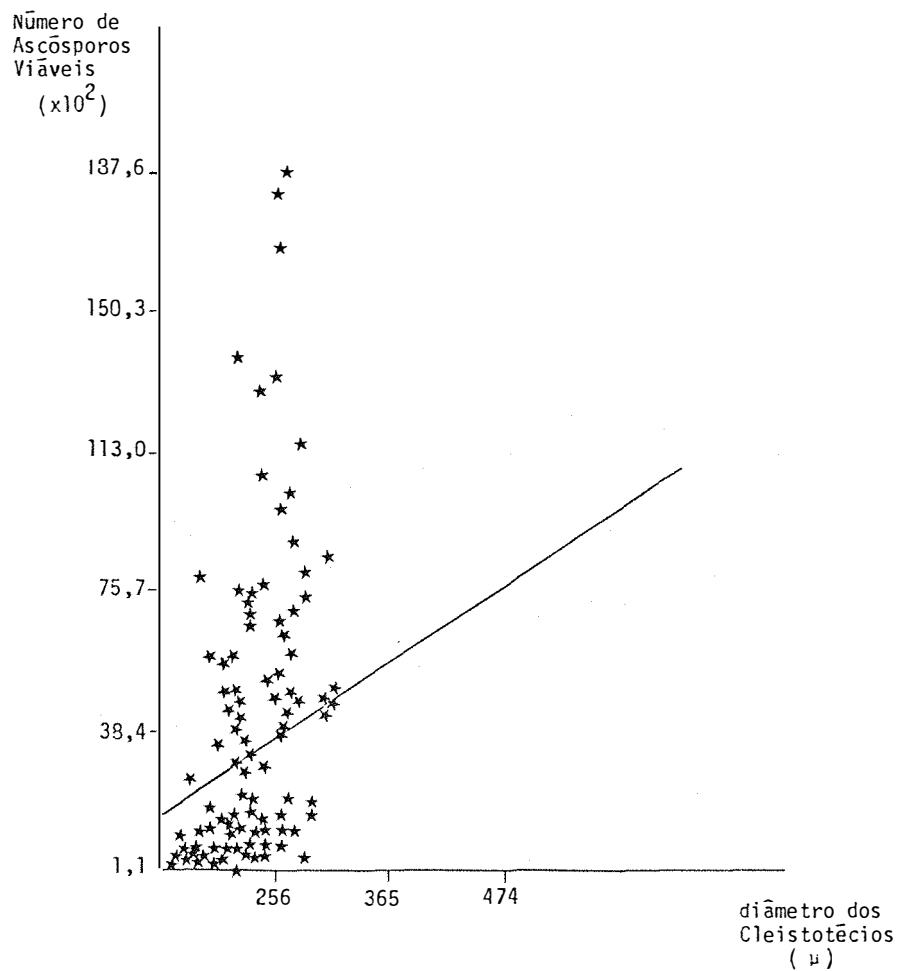


FIGURA 4 - Representação gráfica dos dados obtidos a partir das equações de regressão linear para o número total de cleistotécios híbridos obtidos nos vinte cruzamentos, representando o diâmetro dos cleistotécios e o número de ascósporos viáveis do mesmo.

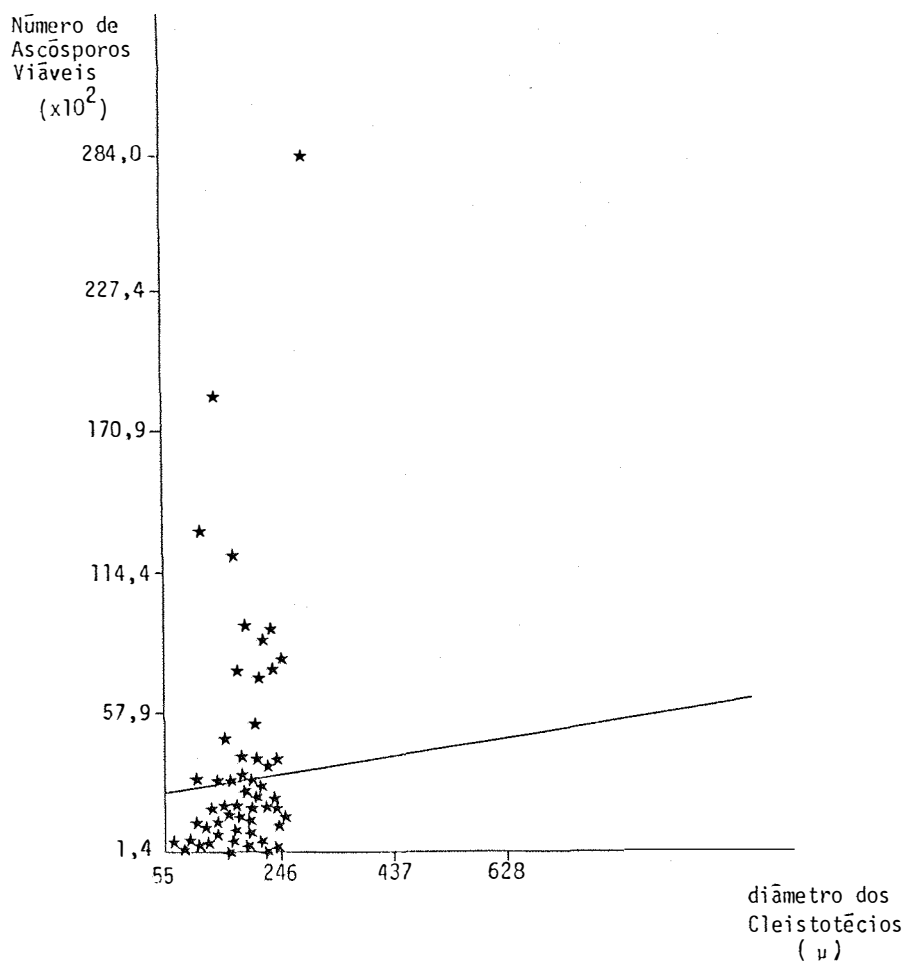


FIGURA 6 - Representação gráfica dos dados obtidos a partir das equações de regressão linear para o número total de cleistotécios não híbridos obtidos nos vinte cruzamentos, representando o diâmetro dos cleistotécios e o número de ascósporos viáveis do mesmo.

5. DISCUSSÃO

5.1. Produção de cleistotécios a partir de linhagens individuais

As linhagens estudadas apresentaram variação na produção de cleistotécios, conforme já havia sido observada anteriormente em *A. nidulans* (SMITH, 1957; MAHONEY e WILKIE, 1958; BARACHO, 1968).

Pelos resultados obtidos (Tabela 3), verificou-se que em MM não houve produção de cleistotécios, pelo fato de todas as linhagens possuírem marcas auxotróficas, apresentando somente um crescimento residual. Também, em MM + 10% MC, após dez dias de incubação, nenhuma das linhagens produziu cleistotécios. Os mesmos só foram produzidos após quinze dias, a partir das linhagens C, E, F, e G, sendo verificado o mesmo resultado após trinta dias. Em MC, após dez e quinze dias de incubação, encontrou-se os mesmos resultados obtidos em MM + 10% MC, e após trinta dias verificou-se, também a produção de cleistotécios pela linhagem D. Apenas os variantes deteriorados (linhagens A e B) não produziram

cleistotécios, indicando serem linhagens acleistoteciais.

Em comparação com os resultados obtidos por BARACHO (1968), verifica-se que o mesmo não observou produção de cleistotécios pelas linhagens C, D, F e G, quando utilizou MM + 2% MC, sendo que a linhagem C apresentou um crescimento residual, a linhagem D teve um crescimento bom, enquanto as linhagens F e G não cresceram. No presente trabalho, prova - velmente, pelo fato de termos usado MM + 10% MC, foi verificada a produção de cleistotécios pelas linhagens C, F e G , sendo apenas a linhagem D incapaz de produzir cleistotécios. Esses dados, portanto, nos levam a concluir que a diferença encontrada quanto à produção de cleistotécios, foi provavelmente pelo fato do MM + 10% MC, conter mais nutrientes, o que favoreceu o crescimento das linhagens, bem como a produção de cleistotécios. Em MC, que contém os requisitos necessários para o crescimento das linhagens auxotróficas utilizadas, todas as linhagens poderiam produzir cleistotécios. Esse fato não foi verificado no presente trabalho, bem como no de BARACHO (1968), que observou produção de cleistotécios apenas a partir das linhagens C e F, sendo que a linhagem C produziu cleistotécios após ser mantida por dois meses em tubo inclinado com MC à temperatura ambiente; entretanto , foi verificado no presente trabalho, produção de cleistotécios a partir de todas as linhagens, com exceção das linha -

gens A e B.

As linhagens A e B não produziram cleistotécios , quando ensaiadas individualmente, possivelmente devido aos genes *v5* e *v2*. Quando em cruzamentos, originaram cleistotécios híbridos em frequência superior a 50%, indicando a ocorrência do fenômeno conhecido como "heterotalismo relativo" , já constatado em *A. nidulans*, por BARACHO e AZEVEDO (1977).

Os dados aqui encontrados, referentes à produção de cleistotécios em três diferentes tipos de meio de cultura, nos levam a concluir que a formação dos corpos de frutificação está na dependência do meio de cultura utilizado, de acordo com resultados encontrados anteriormente (ZONNEVELD , 1972a e b, 1973, 1974). Constatou-se que, também, no caso da linhagem D, que além da influência do meio de cultura utilizado, houve também influência do tempo de incubação.

5.2. Produção de cleistotécios a partir de cruzamentos

Em todos os vinte cruzamentos analisados, cujos resultados estão mostrados nas tabelas de número 8 a 28, houve produção de cleistotécios, sendo constatada uma variação quanto à formação de híbridos e não híbridos nos diferentes cruzamentos. As figuras 2a e 2b mostram a distribuição de cleistotécios híbridos e não híbridos, respectivamente, e a tabela 30 nos mostra os resultados gerais dos cruzamentos

com relação ao número de cleistotécios híbridos e não híbridos em cada cruzamento.

Considerando o número total de cleistotécios analisados e utilizando-se o teste de proporção, verifica-se que a proporção de híbridos foi de 61,4% ($Z^2 = 3,5$), diferindo significativamente da encontrada por BARACHO e AZEVEDO (1977), em seu estudo sobre o heterotalismo relativo, no qual estavam envolvidas as linhagens C, D e F, aqui utilizadas. Os citados autores constataram que a proporção de híbridos não excedia 50%, indicando que o heterotalismo relativo não é um fenômeno comum a todos os cruzamentos, sendo que os resultados aqui obtidos, com diferentes combinações entre as linhagens não confirmam esse fato.

Pela observação das Tabelas, pode-se constatar que em catorze dos vinte cruzamentos realizados houve a formação de mais que 50% de cleistotécios híbridos, sendo que seis desses cruzamentos deram origem a 100% de híbridos. Esses resultados podem ser explicados pelo heterotalismo relativo, já constatado em *A. nidulans* por diversos autores (HEMONS e col., 1952; PONTECORVO e col., 1953; OLIVE, 1954 ; BARACHO, 1968 e BARACHO e AZEVEDO, 1977), demonstrando a existência de cariogamia preferencial. Dos seis cruzamentos restantes, dois apresentaram tendência à formação de cleistotécios do tipo não híbrido em percentagem 100% (linhagem C

x linhagem E e linhagem C x linhagem G), sendo que todos foram do tipo da linhagem C.

Observando-se cada linhagem, individualmente, em todos os cruzamentos em que a mesma está envolvida, verifica-se que nos cruzamentos em que a linhagem C esteve envolvida, houve uma tendência à formação de cleistotécios não híbridos do tipo da linhagem C. Em dois cruzamentos (linhagem C x linhagem E e linhagem C x linhagem G) ocorreu a formação de 100% de cleistotécios não híbridos do tipo da linhagem C. Essa ausência de cleistotécios híbridos indica algum tipo de incompatibilidade na formação de híbridos. Estudos sobre a incompatibilidade de heterocários foram feitos por muitos autores (CATEN e JINKS, 1966; BUTCHER, 1968), sendo que em vista do heterocário ser uma mistura de hifas homocarióticas e heterocarióticas (CLUTTERBUCK e ROPER, 1966), algumas combinações de linhagens podem dar uma predominância de hifas homocarióticas, com isto reduzindo a possibilidade de formação de híbridos. A possível incompatibilidade de cruzamento demonstrada pela linhagem C com algumas das outras linhagens usadas pode ser devido a barreiras existentes na parede celular ou na própria cariogamia. Esse problema poderia ser resolvido pela produção de protoplastos na linhagem C e posterior cruzamento com as demais linhagens. Com isto poderia ser feita uma distinção entre incompatibilidade por parede ou na

cariogamia. Nos cruzamentos em que a linhagem G esteve envolvida houve uma maior tendência para a formação de cleistotécios do tipo híbrido. Nos demais cruzamentos não foi verificada predominância de nenhum dos tipos.

O cruzamento linhagem C x linhagem D merece ser destacado, pelo fato de que os ascósporos provenientes dos doze cleistotécios ensaiados foram do tipo parental, sendo que nenhum recombinante foi originado. Pelo fato das linhagens envolvidas no cruzamento não poderem ser distinguidas morfológicamente, a análise dos ascósporos foi feita pela caracterização das linhagens em MM + os requisitos envolvidos no cruzamento. Sabe-se que em fungos existem diversos fatores responsáveis por distorções na segregação. SMITH (1975); DE LANGE e GRIFFITHS (1980), citam os mutantes meióticos em *Neurospora*, que afetam o pareamento e a disjunção cromossômica, levando a um aborto de ascósporos. Além da produção de ascósporos defectivos, existe também a possibilidade de formação de cleistotécios gêmeos já constatados por PONTECORVO e col. (1953) e por BARACHO, VENCOVSKY e AZEVEDO (1970), que são originados devido ao desenvolvimento ocasional de dois cleistotécios, um dentro do outro, ou fusionado ao outro. O fato de não haver sido observada, durante a manipulação das linhagens qualquer deficiência nos ascósporos, sugere que o tipo de segregação encontrada refere-se à presença de cleis-

totécios gêmeos, e de acordo com os resultados encontrados supõe-se que deve existir alguma barreira impedindo a ocorrência de recombinação entre as linhagens, reunindo, dessa maneira, cleistotécios do tipo autofecundado, dando origem a cleistotécios gêmeos. Considerando todos os cleistotécios analisados nos vinte cruzamentos e realizando o teste de proporção, a percentagem de gêmeos foi de 5% ($Z^2 = 501,8$), diferindo da encontrada por BUTCHER (1968) e BARACHO, VENCOSKY e AZEVEDO (1970), os quais observaram cleistotécios gêmeos em uma percentagem de 1,3%. Essa diferença, possivelmente, pode ser explicada através de estudos citológicos das linhagens C e D, uma vez que o cruzamento envolvendo ambas foi o único que apresentou distorções na segregação.

5.3. Correlação entre o diâmetro do cleistotécio e o número de ascósporos

Os resultados apresentados na Tabela 29, considerando o número total de cleistotécios analisados mostram que existe uma correlação entre o diâmetro do cleistotécio e o número de ascósporos, tanto para cleistotécios híbridos, como para não híbridos, havendo uma tendência de cleistotécios híbridos possuírem maior número de ascósporos e não híbridos um menor número de ascósporos.

Para cleistotécios híbridos, considerando-se cruzamentos específicos, encontrou-se um índice de correlação entre o diâmetro e número de ascósporos em dois dos vinte cruzamentos, tomando como nível de significância 1% (linhagem A x B e E x F) e em quatro cruzamentos, tomando-se como nível de significância 5% (linhagens A x B, A x D, B x D e C x F) . Em oito cruzamentos os resultados foram não significativos . Nos demais cruzamentos, não foi possível verificar índice de correlação, pelo fato dos dados serem insuficientes para a análise.

Para cleistotécios não híbridos, considerando como nível de significância 5%, verificou-se índice de correlação entre diâmetro de cleistotécio e número de ascósporos em quatro dos cruzamentos (linhagens A x C, B x D, B x G e C x G). Em três cruzamentos os resultados foram não significativos , sendo que nos cruzamentos restantes os dados foram insuficientes para a análise.

Nas Figuras 3 e 5, estão representados graficamente os dados obtidos a partir das equações de regressão linear para o número total de cleistotécios híbridos e não híbridos, respectivamente, representando o diâmetro dos cleistotécios e o número de ascósporos do mesmo.

5.4. Correlação entre o diâmetro do cleistotécio e o número de ascósporos viáveis.

Considerando o número total de cleistotécios analisados, foi encontrada correlação entre o diâmetro do cleistotécio e o número de ascósporos viáveis para cleistotécios híbridos, considerando como nível de significância 5%. Para cleistotécios não híbridos, os resultados foram não significativos, não existindo, portanto, índice de correlação. Esses resultados não significativos, podem ter sido devido a amostragem utilizada para a análise ter sido pequena, isto é, os dados terem sido insuficientes.

Pela observação dos cruzamentos individuais, um deles apresentou índice de correlação, considerando o nível de significância de 1% (linhagem A x linhagem D) e cinco cruzamentos apresentaram índice de correlação ao nível de 5% para cleistotécios híbridos (linhagens A x B, A x E, C x D, D x F e E x F). Em nove cruzamentos, os resultados foram não significativos, sendo que nos cruzamentos restantes os dados foram insuficientes para a análise.

Os resultados estão mostrados na Tabela 29, sendo que nas Figuras 4 e 6 estão representados graficamente os dados obtidos à partir das equações de regressão linear para o número total de cleistotécios híbridos e não híbridos, respectivamente, representando o diâmetro dos cleistotécios e

o número de ascósporos viáveis do mesmo. Para cleistotécios não híbridos, em treze dos vinte cruzamentos não foi possível o cálculo do coeficiente de regressão linear, pelo fato do número de cleistotécios por cruzamento ser muito pequeno. Em um dos cruzamentos (linhagem A x linhagem C), foi encontrado índice de correlação, considerando os resultados como significativos ao nível de 5%. Em cinco cruzamentos, os resultados foram não significativos, sendo o número de dados insuficiente para afirmar uma ausência de correlação.

A baixa viabilidade encontrada nos cruzamentos em geral foi, provavelmente, devido a uma certa imaturidade dos cleistotécios, pois todas as análises foram feitas após dez dias de incubação dos heterocários, sendo que os cleistotécios poderiam não estar bem formados neste período. Para resultados mais significativos, a viabilidade poderia ser ensaiada em períodos superiores a dez dias de incubação, quando, provavelmente, pelo fato dos cleistotécios estarem mais maduros, os ascósporos, em consequência produzirão uma maior viabilidade. É interessante ressaltar que na análise dos cleistotécios observou-se em quatro casos a presença de ascósporos, quando da contagem em hematímetro, sendo que após o plaqueamento dos mesmos, verificou-se total inviabilidade.

6. CONCLUSÕES

Pelos resultados aqui obtidos pode-se concluir que:

1. Pela comparação com resultados obtidos anteriormente, observa-se que os cleistotécios que apresentam um maior diâmetro apresentam a tendência de serem híbridos, enquanto os de menor diâmetro apresentam-se como autofecundados.
2. Existe correlação entre o diâmetro de cleistotécios e seu número de ascósporos, tanto para cleistotécios híbridos, como para não híbridos.
3. A composição do meio de cultura, bem como o tempo de incubação, exercem influência na produção de cleistotécios.

7. BIBLIOGRAFIA

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

AZEVEDO, J.L., 1966. Estudos sobre recessivos letais em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Tese de Livre Docência apresentada a ESALQ, Piracicaba, São Paulo, 121p.

AZEVEDO, J.L. e COSTA, S.O.P., 1973. *Exercícios Práticos de Genética*. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 288p.

AZEVEDO, J.L. e ROPER, J.A., 1970. Mitotic nonconformity in *Aspergillus*: successive and transposable genetics changes. *Genetical Research*, 16:79-93.

BAINBRIDGE, B.W., 1966. Table of located or partially located mutants and revised map of linkage group III. *Aspergillus Newsletter* 7:19-21.

- BARACHO, I.R., 1968. Estudos sobre corpos de frutificação em *Aspergillus nidulans*. Tese de mestrado apresentada a ESALQ, Piracicaba, São Paulo, 57p.
- BARACHO, I.R.; VENCOSKY, R. e AZEVEDO, J.L., 1970. Correlation between size and hybrid or selfed state of the cleistothecia in *Aspergillus nidulans*. *Transaction of the British Mycological Society* 54:109-116.
- BARACHO, I.R. e AZEVEDO, J.L., 1971. A quantitative analysis of Cleistothecia Production in *Aspergillus nidulans*. *Experientia* 27:855-856.
- BARACHO, I.R. e AZEVEDO, J.A., 1977. Relative heterothallism in *Aspergillus nidulans* - *Revista de Microbiologia* 8:36-8.
- BARNETT, H.L. e LILLY, V.G., 1966. Manganese Requirements and deficiency symptoms of some fungi. *Mycologia* 58:585-591.
- BEADLE, G.W. e CONRADT, V.L., 1944. Heterocaryosis in *Neurospora crassa*. *Genetics* 29:291-308.

- BUTCHER, A.C., 1968. The Relationship between sexual outcrossing and heterokaryon incompatibility in *Aspergillus nidulans*. *Heredity* 23:443-452.
- BUTCHER, A.C.; CROFT, J. e GRINDLE, M., 1972. Use of Genotype - environmental interaction analysis in the study of natural populations of *Aspergillus nidulans*. *Heredity* 29:263-283.
- CATEN, C.E. e JINKS, J.L., 1966. Heterokaryosis: its significance in wild homothallic Ascomycetes and fungi imperfecti. *Transactions of the British Mycological Society* 49:81-93.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1969. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63:317-27.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1974. *Aspergillus nidulans*. In: King, R.C. (ed). *Handbook of Genetics I*. New York, Plenum Press, p. 447-510.
- CLUTTERBUCK, A.J. e ROPER, J.A., 1966. A direct determination of nuclear distribution in heterokaryons of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research* 7:185-194.

- CROFT, J.H., 1966. A reciprocal phenotypic instability affecting development in *Aspergillus nidulans*. *Heredity* 21:565-579.
- DE LANGE, A.M. e GRIFITHS, A.F., 1980. Meiosis in *Neurospora crassa* II. Genetic and cytological characterization of three meiotic mutants. *Genetics* 96:379-398.
- EMERSON, S., 1952. Biochemical models of heterosis in *Neurospora*. *Bulletin Torrey Botanic Club* 69:75-91.
- ESSER, K., 1968. Phenoloxidases and morphogenesis in *Podospora anserina*. *Genetics* 60:281-288.
- ESSER, K. e MINUTH, W., 1970. The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. VI Genetic regulation of the formation of laccase. *Genetics* 64:441-458.
- GRIFFITHS, A.J.F. e DE LANGE, A.M., 1978. Mutations of the a mating-type gene in *Neurospora crassa*. *Genetics* 88:239-254.
- HEMMONS, L.M.; PONTECORVO, G. e BUFTON, A.W.J., 1952. The technique of "perithecium analysis" in *Aspergillus nidulans*. *Heredity* 6:135.

- HERMANN, T.E.; KURTZ, M.B. e CHAMPE, S.P., 1983. Laccase localized in Hulle Cells and Cleistothecial Primordia of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 154: 955-964.
- HOFFMANN, E.; SCHECK, H. e SAFFERT, K., 1950. "Über den Einfluß des Mangans auf die Bildung von Saccharase β - Gluconidase und Katalase bei *Aspergillus oryzae* *Biochemical Journal* 320.126-135.
- HOUGHTON, J.A., 1970. A new class of slow-growing non-perithecial mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research* 16:285-292.
- HOUGHTON, J.A., 1971. Biochemical investigation of the slow-growing non-perithecial (*sgp*) mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research* 17:237-244.
- IYENGAR, G.A.S.; DEKA, P.C.; KUNDU, S.C. e SEN, S.K., 1977 . DNA synthesis in course of meiotic development in *Neurospora crassa*. *Genetical Research* 29:1-8.
- JINKS, J.L., 1954. Somatic selection in fungi. *Nature* London, 174:409-410.

JINKS, J.L., 1956. Naturally occurring cytoplasmic changes in fungi. *Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg*. 26:183-203.

JINKS, J.L., 1958. Cytoplasmic differentiation in fungi. *Proceedings Royal Society, B*. 148:314-321.

JOHNSON, T.E., 1976. Analysis of a perithecial development mutant in *Neurospora crassa* that is male and female sterile. *Genetics* 83:36-37.

JOHNSON, T.E., 1978. Isolation and characterization of perithecial development mutants in *Neurospora*. *Genetics* 88:27-47.

KURTZ, M.B. e CHAMPE, S.P., 1981. Dominant spore color mutants of *Aspergillus nidulans*. Defective in Germination and sexual Development. *Journal of Bacteriology* 148:629-638.

KURTZ, M.B.; CHANG, A.W. e CHAMPE, S.P., 1984. Abnormal Sexual Development of *Aspergillus nidulans* caused by Suppressors of a Conidial - Color Mutation. *Experimental Mycology* 8:261-265.

- LAW, D.J. e TIMBERLAKE, W.E., 1980. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 144:509-517.
- MAHONEY, M. e WILKIE, D., 1958. An instance of cytoplasmic inheritance in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings Royal Society B* 154:524-532.
- MAHONEY, M. e WILKIE, D., 1962. Nucleo-cytoplasmic control of perithecial formation in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings Royal Society, B* 156:524-532.
- MARTINELLI, S.D., 1976. Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged culture. *Transactions of the British Mycological Society*, 67:121-128.
- MARTINELLI, S.D. e BAINBRIDGE, B.W.; 1974. Phenoloxidase of *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, 63:361-370.
- MARTINELLI, S.D. e CLUTTERBUCK, A.J., 1971. A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 69:261-268.

- Mc CULLY, K.S. e FORBES, E., 1965. The use of p-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research* 6:352-359.
- MYLYK, O.M. e THRELKELD, S.F.H., 1974. A genetic study of female sterility in *Neurospora crassa*. *Genetical Research*, 24:91-102.
- NAGAI, S.; YANAGISHIMA, N. e NAGAI, H., 1961. Advances in the study of respiration deficient (RD) mutation in yeast and other micro-organisms. *Bacteriological Reviews*, 25:404-426.
- NEWMAYER, D.; SCHROEDER, A.L. e GALEAZZI, D.R., 1978. A meiotic UV-sensitive mutant that causes deletion of duplications in *Neurospora*. *Genetics* 89:245-269.
- OLIVE, L.S., 1954. Heterothallic Behavior in the Aspergillaceae. *Mycologia* 46:254-255.
- PERKINS, D.D. e BARRY, E.G., 1977. The cytogenetics of *Neurospora*. *Advances in Genetics* 19:133-285.

- POLACHECK, I. e ROSENBERGER, R.F., 1977. *Aspergillus nidulans* Mutant Lacking α (1,3) - Glucan, melanin, and Cleistothecia. *Journal of Bacteriology* 132:650-656.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; Mc DONALD, K.D. e BUFTON, A.W.J., 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* 5:141-238.
- SAXENA, R.K. e SINHA, U., 1973. Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged liquid culture. *Journal of General and Applied Microbiology* 19:141-146.
- SAXENA, R.K. e SINHA, U., 1977. Sexual Differentiation under Submerged Conditions in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 102:195-198.
- SERLUPI-CRESCENZI, O.; KURTZ, M.B. e CHAMPE, S.P. 1983. Developmental Defects Resulting from Arginine Auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 129:3535-3544.
- SCHROEDER, A.L., 1975. Genetic Control of Radiation Sensitivity and DNA Repair in *Neurospora*. In: Molecular Mechanisms for Repair of DNA, part B. Edited by PC. HANAWALT and R.B. SETLOW. Plenum Press, New York, p.567-576.

SMITH, G., 1957. An introduction to industrial mycology .
Arnold, London, 399 p.

SMITH, D.A., 1975. A mutant affecting meiosis in *Neurospora*.
Genetics 80:125-133.

SNEDECOR, G.W. e COCHRAN, W.G., 1972. *Statistical Methods* ,
6ª edição, Ames. The Iowa State University Press. 593p.

VIGFUSSEN, N.V. e WEIJER, J., 1972. Sexuality in *Neurospora*
crassa. *Genetical Research* 19:205-211.

WEIJER, J. and VIGFUSSEN, N.V., 1972. Sexuality in *Neurospora*
crassa. I. Mutations to male sterility. *Genetical*
Research 19:191-204.

WEINBERG, E.D., 1964. Manganese Requirement for sporulation
and other secondary biosynthetic processes of *Bacillus* .
Applied Microbiology 12:436-441.

ZONNEVELD, B.J.M., 1971. Biochemical analysis of the cell
wall of *Aspergillus nidulans*. *Biochemical Biophysics*
Acta 249:506-511.

ZONNEVELD, B.J.M., 1972 a. A new type of enzyme , an exosplitting α - 1,3 glucanase from non-induced cultures of *Aspergillus nidulans*. *Biochemical Biophysics Acta* 258:541-547.

ZONNEVELD, B.J.M., 1972 b. Morphogenesis in *Aspergillus nidulans*: the significance of α - 1,3 glucan and α - 1,3 glucanase for cleistothecium development. *Biochemical Biophysics Acta* 273:174-187.

ZONNEVELD, B.J.M., 1973. Inhibitory effect of 2-deoxy-
-glucose on cell wall α - 1,3 glucan synthesis and cleistothecium development in *Aspergillus nidulans* .
Developmental Biology 34:1-8.

ZONNEVELD, B.J.M., 1974. α - 1,3 glucan Synthesis Correlated With α - 1,3 Glucanase Synthesis, Conidiation and Fructification in Morphogenetic Mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 81:445-451.

ZONNEVELD, B.J.M., 1975 a. Sexual Differentiation in *Aspergillus nidulans*. The Requirement for Manganese and Its Effect on α - 1,3 Glucan Synthesis and Degradation
Archives Microbiology 105:101-104.

ZONNEVELD, B.J.M., 1975 b. Sexual Differentiation in
Aspergillus nidulans. The Requirement for Manganase and
the Correlation between Phosphoglucomutase and the
Synthesis of Reserve Material. *Archives Microbiology* 105:
105-108.