

BC/21077
IB/80135

T/UNICAMP

B23_a

MARTA DOS SANTOS BARACHO



ANÁLISE DA INSTABILIDADE DE FUNGOS POR MEIO
DA ESTATÍSTICA CIRCULAR

ORIENTADOR: IVANHOÉ RODRIGUES BARACHO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Marta dos Santos Baracho 26
01
74
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do título
de Mestre. Área de concentração
Genética.

CAMPINAS -SP

1994

UNIDADE	IB		
N.º CHAMADA:	T		
	B23a		
V.	Ex.		
TOMBO BC/	21077		
PROC.	286/94		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	CR\$ 800,00		
DATA	25/02/94		
N.º CPU			

CM00054723-7

AGRADECIMENTOS:



Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

Ao professor Dr. Ivanhoé Rodrigues Baracho, pela confiança, amizade e excelente orientação.

Aos professores: Dr. Aquiles E. Piedrabuena, Dr. Tomasa Yano e Dr. Claudio Luís Messias pela leitura deste trabalho.

Aos amigos Maria Massue, Adalgisa, Ingrid, Alfredo, Ricardo, Gilberto, Rachel, Joaquim, Edson, Maria Elena e David.

Ao Juverlandi pela amizade e atenção.

Ao colega Marcos pelo carinho e bom humor sempre presente.

Às minhas amigas Leila, Priscila e Melina, pela atenção e grande amizade.

A Cacá pela confiança e grande amizade.

Aos meus irmãos Fernando e Ivan, pelo carinho que sempre tiveram por mim.

Às minhas sobrinhas Patrícia e Maria Amélia pela compreensão nas horas precisas.

A minha mãe por ter paciência comigo.

A meu pai pela amizade e compreensão.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao mestre e orientador
Pelos rígidos princípios que nortearam sua vida

Meu pai
Por orientar seus filhos para interesse intelectuais

Minha mãe
Por sua magnífica devoção a família

Meus amigos
Por tornarem tudo tão significativo

DEDICO

INDICE

1	Introdução	1
2.	Revisão da Literatura	2
2.1.	Instabilidade em <i>Aspergillus nidulans</i>	2
2.2.	Fatores que afetam a instabilidade.	5
3.	Material e Métodos	11
3.1.	Linhagens utilizadas	11
3.2.	Meio de Cultura	14
3.2.1.	Meio Mínimo	14
3.2.2.	Meio Mínimo + 2 % de Meio Completo	14
3.2.3.	Meio Completo	14
3.2.4.	Meio Sólido	15
3.3.	Soluções	16
3.3.1.	Solução de Vitaminas	16
3.3.2.	Solução de Salina	16
3.3.3.	Solução de "Tween"	16
3.3.4.	Solução de Cloroneb em água	17
3.3.5.	Solução de Cloroneb em Metanol	17
3.3.6.	Solução de Benlate em água	17
3.3.7.	Solução de Benlate em Acetona	17
3.3.8.	Solução de Vitavax em água	18
3.3.9.	Solução de Vitavax em Acetona	18
3.3.10.	Solução de Plantavax em água	18
3.3.11.	Solução de Peptona	18
3.3.12.	Solução de Extrato de Leveduras	18
3.3.13.	Solução de Verde Malaquita	18
3.3.14.	Solução de Fucsina Básica	19
3.3.15.	Solução de Sacarina	19
3.4.	Substâncias adicionadas ao meio mínimo.	19
3.5.	Marcadores Genéticos e Fenótipicos e marcas utilizadas	19
3.6.	Esterilização e incubação	20

3.7. Técnica Geral-----	21
3.7.1. Obtenção de heterocário-----	21
3.7.2. Isolamento de Diplóides-----	21
3.7.3. Medida dos Diâmetros de Conídios-----	21
3.8. Análise da Instabilidade-----	22
3.8.1. Efeito de droga -----	22
3.8.2. Natureza dos setores da linhagem 10v10 de <i>Aspergillus niger</i> -----	25
3.9. Análise Estatística-----	26
4. Resultado-----	28
4.1. Diplóides obtidos-----	28
4.2. Setores espontâneos -----	28
4.3. Efeitos de Drogas-----	29
4.3.1. Efeito de Drogas em <i>A. niger.</i> -----	29
4.4 Efeito de fungicidas em linhagem de <i>A.</i> <i>nidulans</i> -----	37
4.4.1 Efeito na linhagem diplóide-----	37
4.4.2. Efeito na linhagem A -----	37
4.5 Efeito de outras substâncias -----	50
4.5.1. Efeitos na linhagem A-----	50
4.5.2 Efeitos na linhagem diplóide-----	50
5. Discussão-----	56
5.1. Uso da Estatística circular-----	56
5.2. Setores espontâneos -----	60
5.3. Fungicidas agrícolas-----	63
5.4. Efeito de outras substâncias-----	67
6. Conclusão-----	70
7. Resumo-----	71
8. Abstract-----	72
9. Bibliografia.-----	73

1. INTRODUÇÃO

1

Algumas linhagens de fungo apresentam fenômeno de instabilidade que consiste no aparecimento de setores diferentes do resto da colônia. Esta instabilidade frequentemente origina-se de mudanças genéticas, que ocorrem no desenvolvimento do fungo tais como recombinação mitótica, separação de núcleos em heterocários, perdas cromossômicas na haploidização, etc.

Para os casos de instabilidade mitótica, os fungos constituem um excelente material de estudos. Particularmente no fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* estes estudos tem sido amplamente desenvolvidos.

Em *A. nidulans* foram feitos vários estudos em linhagens diplóides, e a instabilidade foi explicada pela permuta mitótica e não disjunção conduzindo à haploidização. Neste fungo verificou-se a existência de linhagens com duplicações cromossômicas que eram instáveis mitoticamente e produziam setores melhorados e deteriorados. Também, em *Aspergillus nidulans* vários trabalhos foram realizados com o fim de verificar o efeito de agentes físicos e químicos sobre a instabilidade de linhagens haplóides e diplóides.

O interesse por esse tipo de estudo está assentado na crença de que o melhor conhecimento desse problema poderia permitir a estabilização de linhagens industriais e uma avaliação de drogas, que tenham potencialmente efeito como mutagênicas e/ou carcinogênicas.

O trabalho ora apresentado visa verificar a possibilidade de aplicação da estatística circular, no estudo de efeitos de drogas em linhagens instáveis de *A. nidulans* e *A. niger*. Como estes fungos, crescendo em meio sólido formam colônias circulares, e como os pontos de aparecimento de setores pode ser determinado nestas colônias, a análise de setores, através da estatística circular, é uma possibilidade a ser explorada.

Essa análise poderá facilitar o estudo de efeitos de drogas em *A. nidulans* e *A. niger*, e também possibilitar a aquisição de outras informações de interesse.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. INSTABILIDADE EM *Aspergillus nidulans*

Os primeiros estudos de instabilidade genética em *Aspergillus nidulans* foram feitos em linhagens diplóides e começaram na década de 50 (ROPER, 1952; PONTECORVO *et alii*, 1954; PONTECORVO e KAFER, 1958; KAFER, 1960 e 1961; JINKS, 1966; CROFT, 1966), onde a instabilidade foi explicada pela permuta mitótica e não disjunção conduzindo a haploidização. Posteriormente verificou-se que linhagens de *Aspergillus nidulans* que apresentavam duplicações cromossômicas eram instáveis mitoticamente e produziam três tipos de setores (NGA e ROPER, 1968; AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971):

a) Melhorados - surgiam devido a perda de parte ou de todo segmento duplicado (NGA e ROPER, 1968).

b) Deteriorados - ocorriam devido a novas duplicações, provavelmente em "tandem", ou pela transposição do segmento duplicado (NGA e ROPER, 1968; AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971).

c) Heterocarióticos - apareciam em baixa frequência, possuíam uma mistura de conídios verdes e amarelos (ROPER e NGA, 1969).

NGA e ROPER (1968), mostraram que o desequilíbrio nos segmentos cromossômicos era o responsável pela instabilidade, e que as deleções cromossômicas produzidas eram confinadas unicamente aos segmentos que provocavam a instabilidade. Foi observado que a perda do segmento cromossômico podia ocorrer por permuta desigual ou por permuta em alça intracromossômica. Foi proposto o termo "não conformidade mitótica", pelos autores para este fenômeno de instabilidade, sendo provocado pelo desbalanço cromossômico.

Surgiram então algumas explicações para o fenômeno. NGA e ROPER (1966) tinham várias sugestões sobre os mecanismos envolvidos, entre eles: deleção terminal, mutação, permuta mitótica e permuta desigual entre cromátides irmãs. Uma outra possibilidade foi levantada pelos mesmos autores em 1969, propondo um estado heterocromático para um ou outro segmento duplicado, uma vez que a heterocromatina mostra uma

menor estabilidade mitótica em relação a eucromatina. A proposta foi descartada pelo pouco conhecimento a respeito desse tipo de cromatina e a impossibilidade de evidências citológicas (ELLIOTT, 1960).

Em 1969, ROPER e NGA, descreveram a terceira classe de setores obtidos a partir de uma linhagem com duplicação. Mostraram que deleções em linhagens duplicadas podiam estender-se além do segmento duplicado, e produzir hipohaplóide e hipodiplóide respectivamente, de haplóides e parentes diplóides não balanceados.

BALL (1966) descreveu a instabilidade cromossômica em *Aspergillus nidulans* relacionada com a supressão. Este autor já levanta a possibilidade do sistema complexo, que envolve a instabilidade de *Aspergillus nidulans* estar relacionada com o sistema já descrito em organismos superiores, como em milho (Mc CLINTOCK, 1951) e bactérias (DAWSON e SMITH-KEARY, 1963).

Outro trabalho que associa instabilidade com efeito de posição foi feito por CLUTERBURCK (1970); que estudou o alelo brl_{12} do locus "bristle" de *Aspergillus nidulans*. Este locus produzia fenótipo variegado e a análise genética mostrou que o mesmo estava associado com translocação.

Em 1970 surge o primeiro trabalho que enfoca transposição: "Não-conformidade mitótica em *Aspergillus*: alterações genéticas e sucessivas" por AZEVEDO e ROPER que estudaram os setores deteriorados de linhagens de *Aspergillus nidulans* com duplicações. Os setores deteriorados observados em linhagens duplicadas poderiam ser devidos a novas duplicações em "tandem" ou à transposições do determinante de deterioração. Assim, era esperado que ocorresse setor deteriorado ao lado de setor não deteriorado. Em alguns casos verificou-se a ocorrência de "twin-spots" (setores gêmeos), mas em outros a ausência de um dos dois setores poderia ser explicada por letalidade do melhorado por deleção, ou inviabilidade do deteriorado. A análise de 31 setores obtidos da linhagem A permitiu localizar os fatores determinantes da deterioração em quase todos os grupos de ligação.

ROSATO (1973) . utilizando a acriflavina e etil metano sulfonato (EMS) se propôs a obter variantes melhorados a partir da linhagem A, através da eliminação de material genético extra. O EMS foi mais eficiente que a acriflavina na produção de variantes morfológicos .Quatro dos variantes morfológicos obtidos por indução com EMS a partir de linhagens deterioradas, mostraram supressão dos determinantes de deterioração originais e o aparecimento simultâneo de novos determinantes em diferentes locais , atuando como mutações simples (ROSATO e AZEVEDO ,1978).

MENEZES (1974)obteve variantes deteriorados espontaneos e também induzidos por U.V. e DNA exógeno a partir da linhagem A de *Aspergillus nidulans*.

MENEZES e AZEVEDO (1978) observaram seis reversões a partir de variantes originados por linhagem com duplicação I- II, e através de análise genética concluíram que cinco delas eram devidas a supressores e uma causada provavelmente por mutação reversa . Os supressores segregaram como genes simples e não estavam ligados as mutações que suprimiam.

Em 1979 , ZUCCHI e AZEVEDO, analisaram setores deteriorados , mostraram que deterioração podia estar associada à deleção do segmento em duplicata , embora em dois casos determinantes de deterioração tenham sido localizados em grupos de ligação que não estavam envolvido na duplicação original .

CASE e ROPER (1981) . mostraram que a eliminação dos segmentos translocados em diplóide balanceados de *Aspergillus nidulans* , ocorria mais frequentemente por permuta do que por deleção.

Agentes químicos, físicos e mesmos fatores genéticos podem alterar o padrão normal de instabilidade em linhagem com duplicação cromossômica. Alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de verificar alterações dos padrões de instabilidade em linhagens diplóides e duplicadas, por meio de agentes físicos e químicos. Assim COOKE *et alii* (1970) adicionando azul de tripan ao meio de cultura, constataram o aumento da instabilidade de linhagens duplicadas. PALMER e ROPER (1970) analisaram o efeito de várias drogas na instabilidade. Algumas como o cicloheximida, 6-aminonicotinamida, o metano, acriflavina, o cristal violeta, não alteram significativamente a frequência de setores. Outros produzem efeitos apreciáveis. A cafeína induziu quebras e evitou reparos de lesões espontâneas; a atebrina aumenta a frequência de deleções dos segmentos duplicados, o mesmo ocorrendo com o verde malaquita.

ROSATO (1973), ROSATO e AZEVEDO (1978), estudaram os efeitos da acriflavina e do metano-sulfonato de etila na instabilidade de várias linhagens. O metano-sulfonato de etila mostrou-se eficiente na indução de instabilidade, em linhagens duplicadas. A acriflavina usada para possível eliminação de material genético extra, não foi eficiente.

LEE e NGA (1973), trataram uma linhagem duplicada com 7,8,12, trimetil-benzeno antraceno e obtiveram uma linhagem com uma translocação responsável pela alta produção de cleistotécios.

HASTIE (1970) analisando a ação do benlate na instabilidade do diplóide verificou que este aumentava a frequência de segregantes especialmente de segregantes haplóides, uma ação, portanto similar a da p-fluorofenilalanina (MORPUGO, 1961).

KAPPAS *et alii* (1973) analisaram a ação do benzimidazole e o tiofanato e verificaram que essas drogas induziam a instabilidade

MENEZES (1974) verificou em linhagem duplicada alteração dos padrões de instabilidade pela ação da luz ultra-violeta e do DNA exógeno. A ação da luz ultra-violeta também foi analisada por PARAG e ROPER (1975), que obtiveram alta instabilidade em linhagens

portando duplicações. após tratamento com esse agente mutagênico. Utilizando a luz ultra-violeta. AZEVEDO(1975) obteve um variante mais estável do que a linhagem original, que apresentou um determinante de estabilidade localizado no grupo de ligação VIII.

Drogas como o hidrato de cloral, o brometo de etídio e a cumarina também mostraram ter influência na instabilidade. O hidrato de cloral interfere na recombinação mitótica (MERCER e MORIS, 1975; SINGH e SINHA.(1976); o brometo de etídio reduz o número de setores produzidos por linhagens duplicadas e por diplóides (BONATELLI JR e AZEVEDO,1977); a cumarina aumentou a instabilidade de linhagens duplicadas através de deleção preferencial do segmento translocado (MAJERFELD e ROPER, 1978a)

A ação dos fungicidas cloroneb e vitavax foi investigada por AZEVEDO *et alii*(1977). em linhagem diplóide e em linhagem duplicada; verificaram que o cloroneb aumentou a instabilidade, enquanto o vitavax a reduziu mostrando ação diferencial sobre o material duplicado.

A respeito da ação da temperatura na instabilidade de linhagens duplicadas, merece referência o trabalho de LIEBER(1976) .onde é apresentado alguns dados que mostram ser as frequências de deleções do cromossomo I com duplicação, aumentadas pelas altas temperaturas , enquanto as frequências de deleções do cromossomo III , portando duplicação , são aumentadas por temperaturas baixas. Ainda nesse ponto cumpre mencionar o trabalho de NIFFINEGER e SOUZA (1979) , que estudando uma linhagem duplicada constatou que na temperatura de 40°. havia aumento de frequência total de setores Verificou ainda que em temperaturas baixas havia aumento da frequência de setores verdes e em temperaturas altas uma maior frequência de setores amarelos. A variação da temperatura parece alterar as frequências de deleção ou reparo, mas não as de transposição ou de novas duplicações, sugerindo ou uma alteração preferencial de enzimas de reparo ou de velocidade para a formação de cópias para os segmentos envolvidos na duplicação. FAVRAUD (1984) , também observou aumento de instabilidade dentro dos limites de 30°e40°C, da linhagem A e seus variantes.

GABRIELLI e AZEVEDO (1980) . utilizando o variante deteriorado V₅₉, determinaram a frequência de dissômicos produzidos em

diferentes temperaturas: concluíram que a variação na temperatura não teve influência na produção de dissômicos .

PIZZIRANI-KLEINER (1981) estudando o efeito da temperatura na expressão do gene *binA₁*, que determina a formação de conídios com mais de um núcleo, observou que o aumento ou diminuição da frequência de conídios uni , bi e trinucleados em função do aumento da temperatura ocorre de maneira linear. Com elevação da temperatura a percentagem de conídios uninucleados aumenta, enquanto a dos bi e trinucleados diminui. A presença do gene *binA₁* diminui a instabilidade na linhagem com duplicação cromossômica e em diplóides.

Outro gene descrito por PIZZIRANI-KLEINER e AZEVEDO (1986b), o *bncA* causa redução da instabilidade em linhagens com duplicação e em diplóides , sugerindo ser este responsável por um processo de estabilização. A presença do gene *bncA* produz conídios binucleados e trinucleados , sendo extremamente influenciado pela temperatura , podendo estar envolvidos componentes termossensíveis no processo de migração de núcleos para os esterigmas (PIZZIRANI-KLEINER e AZEVEDO ,1986a).

QUEIROZ,1988 ;verificou que a protoplastização provoca um aumento no número de setores deteriorados nas colônias da linhagem A que foram submetidas a essa técnica, embora as características dos deteriorados não pareçam diferir .

De maneira geral é interessante salientar que , fatores que alteram a frequência de recombinação mitótica ou reparo do DNA alteram a instabilidade de linhagens com duplicação. O que era de se esperar já que a instabilidade mitótica de *Aspergillus nidulans* está intimamente ligada a processos que os envolvem , como permuta desigual entre cromátides irmãs, novas duplicações em tandem e até transposição de parte ou todo material extra para outro sítio do genoma como descrito por NGA e ROPER (1968 e 1969) e AZEVEDO e ROPER (1970).

O quadro I apresenta um resumo desses agentes que afetam a instabilidade. Esse quadro é uma ampliação do resumo feito por PACCOLA (1982), e se limita aos agentes que foram considerados importantes , para esclarecer esse trabalho.

Quadro 1- Agentes que afetam a instabilidade

8

Agente	Ação	Referência
Acriflavina	Eliminação de material genético adicional em variantes deteriorados	ROSATO e AZEVEDO, 1978
Alebrina	Aumenta a frequência de deleções no segmento translocado	PALMER e ROPER, 1970
Azul de tripan	Aumenta a instabilidade em linhagens com duplicação	COOKE <i>et alii.</i> 1970
Benlate	Aumentou a frequência ,mais especialmente de segregantes haplóides	HASTIE,1970
Benzimidazóis e Tifanato	Aumenta a instabilidade em diplóides	HASTIE, 1970 KAPPAS <i>et alii.</i> 1973.
Brometo de Etídio	Reduz a instabilidade em linhagens com duplicações	BONATELLI e AZEVEDO,1977
Cafeína	Aumenta a instabilidade em linhagens com duplicações	PALMER e ROPER 1970

Agente	Ação	Referência
Cloroneb	Aumenta a instabilidade	AZEVEDO <i>et alii</i> , 1977
Cumarina	Aumenta a instabilidade através de deleção do segmento translocado em linhagens com duplicação	MAJERFELD e ROPER, 1978a
EMS	Induz a instabilidade	ROSATO e AZEVEDO, 1978
Gene $bl A_1$	Reduz a instabilidade	PIZZIRANI - KLEINER, 1981
Genes que conferem sensibilidade ao U.V.	Aumenta a instabilidade	BURR <i>et alii</i> , 1971.
pFA	Aumenta a instabilidade em diplóides	MORPUGO, 1961
Radiação gama	Induz translocação	ALMEIDA e AZEVEDO, 1978
stf-1	Reduz a instabilidade	AZEVEDO, 1975
Temperatura	Variação na temperatura altera a instabilidade	LIEBER, 1976 NIFFINEGGER e SOUZA, 1979
Trimetil-benzeno antraceno	Obtenção de linhagens instáveis com translocação	LEE e NGA, 1973

Agente	Ação	Referência
U. V.	Aumenta a instabilidade em linhagens com duplicação	PARAG e ROPER, 1975
Verde malaquita	Aumenta a frequência de deleções	PALMER e ROPER, 1970
Vitavax	Reduz a instabilidade com ação diferencial sobre a duplicação	AZEVEDO <i>et alii</i> , 1977.

3. MATERIAL E MÉTODOS :

3.1. LINHAGENS UTILIZADAS.

Linhagens de *Aspergillus nidulans*:

a) Linhagem A (NGA e ROPER ,1968) que apresenta conídios verdes e uma duplicação do grupo de ligação I, translocado para o grupo de ligação II. (figura 1).

b) Linhagem MSE (Master Strain E de McCULLY e FORBES, 1965) que apresenta marcadores em todos os grupos de ligação.

c) Linhagem pro A₁; paba A₆; y A₁; possui os marcadores genéticos pro A₁; paba A₆ e y A₁ no grupo de ligação I. Os grupos de ligação e localização dos marcadores genéticos estão representados na figura 2.

Linhagem de *Aspergillus niger* :

a) Linhagem 10v10. Essa linhagem foi classificada como *Aspergillus niger* van Tieghem conforme RAPER e FENNELL (1965).

As linhagens foram obtidas da coleção existente no laboratório de Genética de Microorganismo do Instituto de Biologia da UNICAMP.

As linhagens de *Aspergillus nidulans* foram mantidas em tubos com meio completo inclinado a cerca de quatro graus centígrados .

As linhagens de *Aspergillus niger* foram mantidas em tubos com meio mínimo inclinado a cerca de quatro graus centígrados.

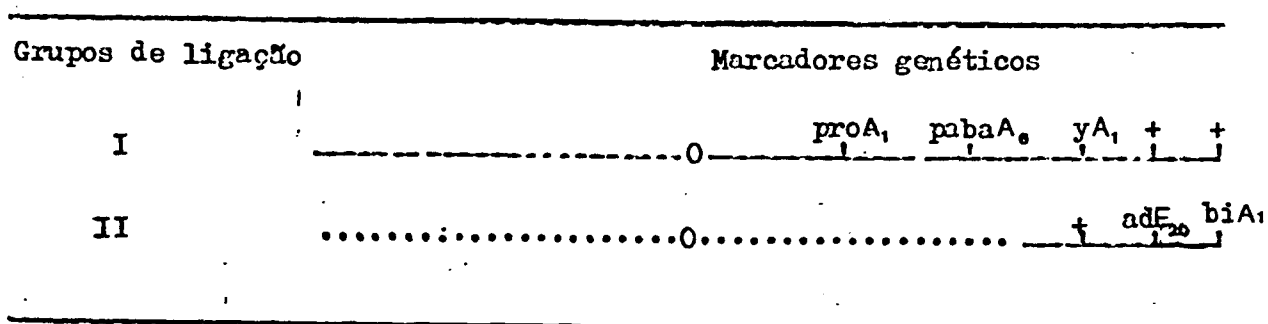


Figura 1. Marcadores genéticos da linhagem A de *Aspergillus nidulans*

Os centrômetros estão designados por O. Os fenótipos determinados pelos genes podem ser encontrados no item 3.1.

----- grupo de ligação I

..... grupo de ligação II

Obs.: as distâncias não estão em escala no mapa.

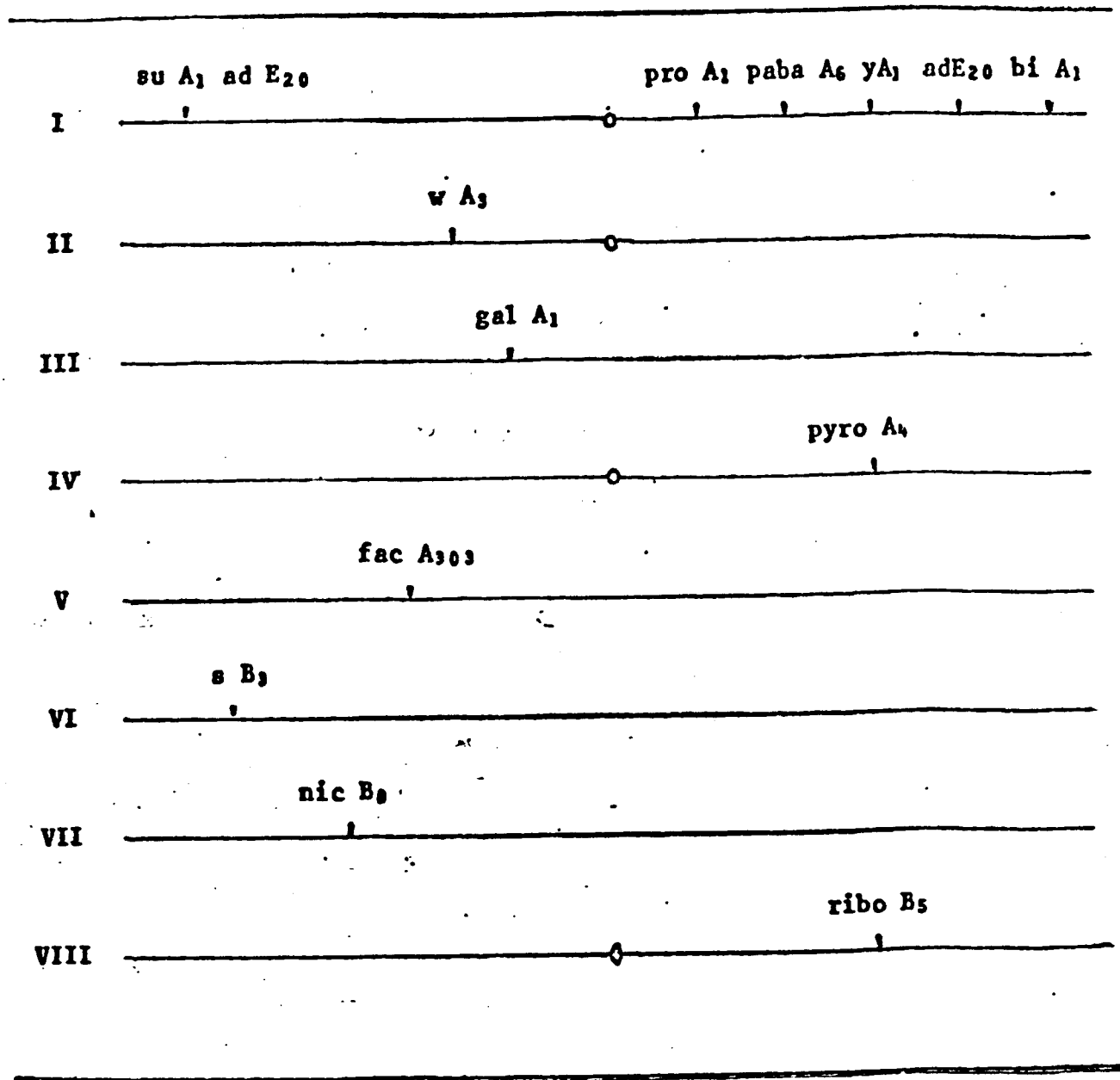


FIGURA 2 Grupos de ligação e localização dos marcadores genéticos, das linhagens de *A. nidulans* utilizadas. As distâncias dos marcadores não estão em escala no mapa. 0 = centrômero.

3.2. MEIO DE CULTURA.

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

Caracteriza-se por apresentar uma fonte de nitrogênio [NaNO₃], uma fonte de carbono [glicose], sais minerais e àgar de acordo com as especificações abaixo:

NaNO ₃	6.0 gramas
KH ₂ PO ₄	1.5 gramas
KCl	0.5 gramas
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 gramas
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Glicose	10.0 gramas
Água destilada	1 litro

pH ajustado para 6.5 com NaOH 4% ou HCl 1N.

3.2.2. Meio Mínimo líquido + 2% meio completo

Foi adicionado 2% de meio completo líquido ao meio mínimo líquido . A mistura foi distribuída em tubos (2.5 ml em cada tubo) sendo posteriormente autoclavados .

3.2.3. Meio Completo (PONTECORVO *et alii* . 1953)

Apresenta este meio a seguinte constituição:

Adicionou-se ao meio mínimo :

Peptona	2.0 gramas
Caseína hidrolizada	1.5 gramas
Extrato de leveduras	0.5 gramas
Solução de vitaminas	1.0 mililitro

** pH ajustado para 6,5 com NaOH 4% ou HCl 1N

O meio assim constituído foi autoclavado à 120 graus centígrados a uma atmosfera de pressão por 20 minutos e conservado à temperatura ambiente.

3.2.4 . Meio Sólido

Foi adicionado , ágar em pó , na concentração final de 1,5 % para fazer o meio sólido.

3.3. SOLUÇÕES:

3.3.1. Solução de vitaminas

Ácido p-aminobenzóico	10.0 mg
Ácido nicotínico	100.0 mg
Aneurina	50.0 mg
Biotina	0.2 mg
Piridoxina	50.0 mg
Riboflavina	100.0 mg
Água destilada	100.0 ml

A solução foi colocada em banho maria por 15 minutos por 3 dias consecutivos e guardada em frasco escuro, sobre clorofórmio e conservada na geladeira.

3.3.2. Solução de salina:

Formaram esta solução :

Cloreto de sódio	8.5 gramas
Água destilada	1000 ml

Coloca-se 9.0 ml da solução em frascos para facilitar os experimentos autoclava-se a uma atmosfera de pressão 120 graus centígrados por 15 minutos. Conservou-se os frascos à temperatura ambiente.

3.3.3. Solução de "Tween"

Adicionou-se "Tween" 80 à água destilada numa concentração de 0.1% (v/v).

Foram colocados 2.5 ml da solução em tubos de ensaio, os quais foram autoclavados e mantidos à temperatura ambiente.

3.3.4 Solução de Cloroneb em água

1,4 dicloro -2-5	
dimetoxibenzeno	0,5mg
Água esterelizada	100,0 ml

3.3.5. Solução de Cloroneb em Metanol

1,4 dicloro -2-5	
dimetoxibenzeno	0,25mg
Metanol	25ml

Desta solução foram retirados 2ml e adicionados a 2ml de salina ,esterelizada em banho maria à temperatura de 60 graus por 15 minutos, durante 3 dias consecutivos..

3.3.6. Solução de Benlate em água

metil -1-butyl-carbamil	
-2-benzimidazol-carbamato	2 mg
Água esterelizada	100 ml

3.3.7. Solução de Benlate em Acetona

metil-1-butyl -carbamil	
-2-benzimidazol-carbamato	0.25mg
Acetona	25ml

Desta solução foram retirados 1ml e adicionados a 2ml de salina.esterelizado em banho maria à temperatura de 60 graus por 15 minutos.por 3 dias consecutivos..

3.3.8. Solução de Vitavax em água

5,6. dihidro-2-metil-1,4

oxatim-3-carboxanalide

20mg

Água esterelizada

100ml

3.3.9. Solução de Vitavax em Acetona

5,6.dihidro-2-metil-1,4

oxatim-3-carboxanalide

0.4mg

Acetona

1 ml

Água esterelizada

25ml

3.3.10. Solução de Plantavax em água

5,6-dihidro-2-metil-1,4

oxatim-3-carboxanalide-4.4 dióxido

0,01 ug

Água esterelizada

50ml

3.3.11. Solução de Peptona

Peptona

0,5mg

Água esterelizada

25ml

3.3.12. Solução de Extrato de Levedura

Extrato de levedura

2gr

Água esterelizada

100ml

3.3.13. Solução de Verde Malaquita

Verde Malaquita

0,5mg

Água esterelizada

200ml

3.3.14. Solução de Fucsina Básica

Fucsina Básica	30mg
Água esterelizada	100ml

3.3.15. Solução de Sacarina

Sacarina	100mg
Água esterelizada	25ml

3.4. SUBSTÂNCIAS ADICIONADAS AO MEIO MÍNIMO

Substâncias	Concentração final (ug/ml)
Ácido nicotínico	0.25
Ácido aminobenzóico	0.25
Biotina	0.10
Metionina	50.00
Piridoxina	0.25
Prolina	30.00
Riboflavina	0.50
Tiosulfato	100.00

3.5. MARCADORES GENÉTICOS E FENOTÍPICOS DAS MARCAS UTILIZADAS

Marcador	Fenótipo
ad	requisito para adenina
bi	requisito para biotina
nic	requisito para ácido nicotínico
paba	requisito para ácido p-aminobenzóico
pro paba	requisito para prolina.
pyro	requisito para piridoxina
ribo	requisito para riboflavina
s	requisito para tiosulfato
su ad ₂₀	supressor para adenina

Símbolos utilizados para indicarem cor dos conídios

Símbolo	Fenótipo
w	branco
y	amarelo

Os seguintes símbolos indicam :

· fac-não crescimento em meio de acetato como fonte de carbono
· gal-não crescimento em meio de galactose como fonte de carbono

3.6. ESTERILIZAÇÃO E INCUBAÇÃO

Os meios de cultura foram esterelizados em autoclaves por 15 minutos à 120 graus centígrados . As soluções as quais não foi indicado modo de esterelização foram esterelizadas em banho maria à 60 graus por 15 minutos, durante 3 dias consecutivos.

A temperatura de incubação foi de 37 graus centígrados para as linhagens de *Aspergillus nidulans* e de 28 graus para as linhagens de *Aspergillus niger*.

3.7. TÉCNICA GERAL

3.7.1. Obtenção de heterocário

Para obtenção de heterocário procedeu-se de acordo com a técnica descrita por PONTECORVO *et alii* (1953).

Os conídios de duas linhagens com marcadores genéticos diferentes foram colocados em 2.5 ml de meio mínimo líquido + 2% de meio completo .

Este meio completo favorece um pequeno crescimento para que possa ocorrer anastomose das hifas. A suspensão foi incubada durante 4-6 dias após a qual a massa micelial formada na superfície do meio de cultura foi removida, cortada e transferida para placas com meio mínimo.

3.7.2. Isolamento de Diplóides

O diplóide heterozigoto foi obtido usando-se a técnica de ROPER (1952). Cerca de 10^7 conídios de um heterocário balanceado foram semeados em meio mínimo .Os conídios haplóides não se desenvolvem neste meio . entretanto, com a fusão de núcleos haplóides há formação de núcleos diplóides heterozigotos que originam os conídios capazes de crescer em meio mínimo . As colônias diplóides isoladas foram purificadas e mantidas em meio mínimo inclinado.

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

3.7.3 Medida dos diâmetros de conídios

Conídios em suspensão foram colocados em uma lâmina com uma gota de lisol 10% e observados ao microscópio óptico, sendo então medido o diâmetro de cadeias de 5 conídios , utilizando-se para isso uma ocular micrométrica.

3.8. ANÁLISE DA INSTABILIDADE :

22

3.8.1. Efeito de drogas:

Vários experimentos foram realizados com vista a verificar o efeito de drogas na instabilidade e esses poderiam ser grupados da maneira que segue:

- a) Estudos de setores espontâneos
- b) Estudos de fungicidas agrícolas de efeitos conhecidos na instabilidade
- c) Estudo de outras substâncias com efeito na instabilidade.

Em todos esses experimentos as linhagens eram inoculadas, por picada, no centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 20 ml de meio de cultura sólido, usando-se meio completo para as linhagens de *Aspergillus nidulans* e meio mínimo para as linhagens de *Aspergillus niger*.

Na parte externa do reverso das placas era marcado o centro, traçado o diâmetro e assinalado à esquerda, o ângulo 0 grau.

As placas eram inoculadas, reunidas em grupos, incubando-se 7-8 dias.

Depois desse período de incubação observa-se se houve formação de setores (figura 3 e 4) e nos casos positivos, anotava-se o tipo e o ângulo formado pelo diâmetro e pela linha traçada do centro da placa à origem do setor. Esse ângulo era medido com o transferidor, pelo lado externo da placa, no reverso da colônia, no sentido dos ponteiros do relógio.

Nos casos em que se procurou verificar os efeitos de compostos químicos, foi traçada uma linha paralela ao diâmetro, distante deste 2.0 cm. No meio de cultura limitado por esta linha e pela borda da placa era, então, pincelada a solução do composto químico e logo após inoculava-se o fungo e fazia-se a incubação (figura 5).

A solução dos compostos químicos eram preparados pela adição desses compostos à água destilada ou dissolvidos em metanol ou acetona como o caso do Benlate, Cloroneb e Vitavax. Sua esterilização se fazia em banho maria à 60 graus centígrados por 15 minutos, por 3 dias consecutivos.

Procurou-se usar concentrações que pela técnica adotada não produzissem grandes reduções no crescimentos das colônias.

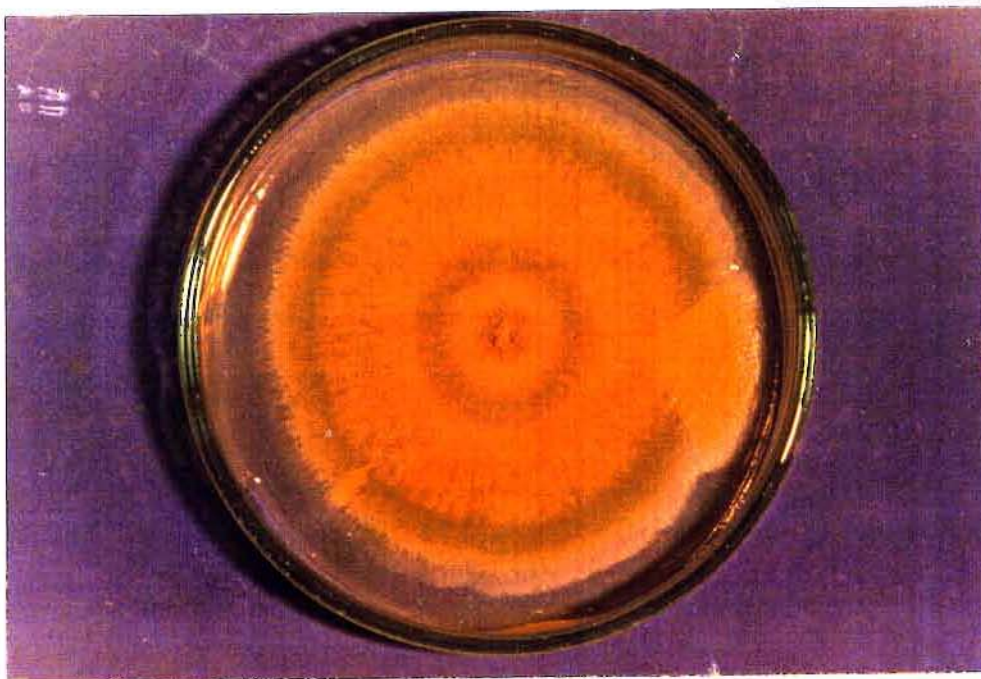


Figura 3. Linhagem duplicada A de *Aspergillus nidulans* com setor melhorado.

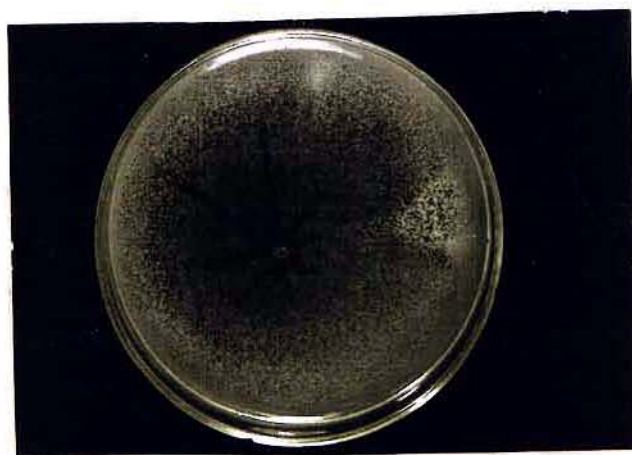


Figura 4. Linhagem 10v10 de *Aspergillus niger* com setor.

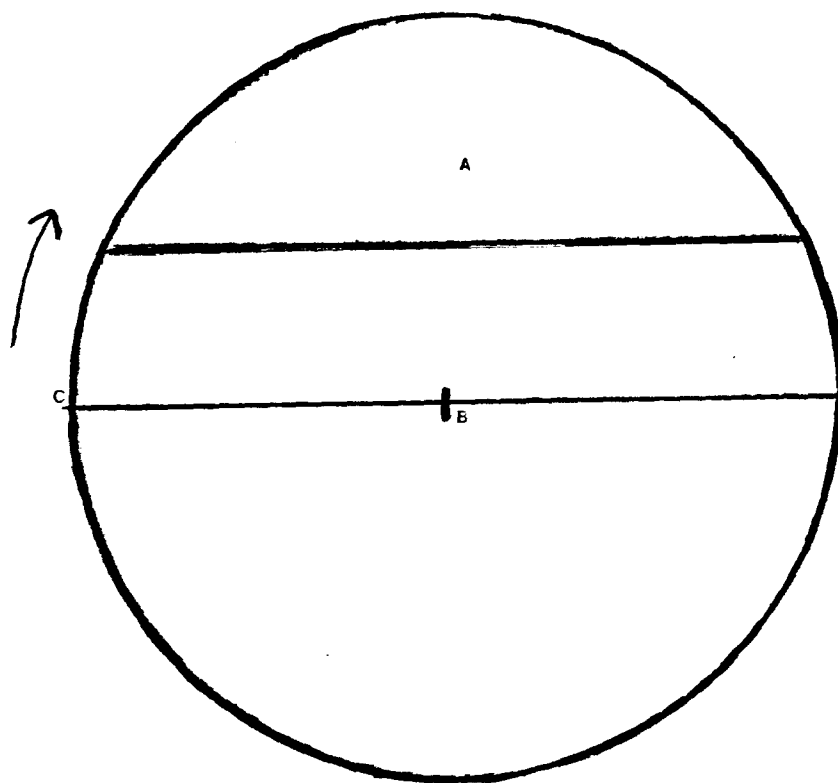


FIGURA 5. Esquema do traçado colocado no verso das placas de Petri.
A) mostrando a região onde foram pinceladas as substâncias.
B) o diâmetro e o ponto central , no qual as linhagens eram inoculadas.
C) o ângulo 0° .

3.8.2. Natureza dos setores da linhagem 10v10 , de *Aspergillus niger*.

Com o fim de verificar a natureza dos setores , apresentados pela linhagem 10v10 (BONATELLI.1977), esta linhagem foi inoculada em placas de Petri contendo meio mínimo , e dos setores que apareceram foram retirados conídios. A partir desses conídios obteve-se uma linhagem S-1, que também produziu setores dos quais se isolou uma linhagem que foi denominada S-2. Essas linhagens inoculadas no centro da placa de Petri, foram posteriormente incubadas durante 10 dias à 28 graus centígrados. A seguir contou-se os setores que apareceram e esses dados foram transformados e analisados por análise de variância. (PIMENTEL GOMES, 1966)

3.0. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram analisados estatisticamente pelos métodos da Estatística Circular, uma vez que foram determinados as direcções em que surgiram os setores os quais se distribuem em colônias circulares.

As distribuições circulares são casos especiais das distribuições bidimensionais. No caso de uma distribuição teórica de probabilidade, a probabilidade total se distribui sobre toda a circunferência, enquanto que se pode obter uma distribuição empírica, se cada observação foi representada por um ponto na circunferência.

Nos casos dos setores, a distribuição circular é originada da observação da direcção em que surgem esses setores, sem se considerar as distâncias destes ao centro da colônia.

A análise estatística dos dados obtidos, nesses experimentos, foi feita pelo teste de Rayleigh.

O teste de Rayleigh permite verificar se a população apresenta uma concentração significativa. A concentração em torno de uma direcção preferencial, pode ser medida pelo comprimento de um vetor médio que se pode denominar de ρ para a população e de r para a amostra.

Considerando como hipótese nula que a população apresenta uma distribuição uniforme o que implica em $\rho = 0$. Lord Rayleigh (1880, 1905, 1919a, 1919b), levantou o problema de quanto deve r desviar-se de zero, para que se possa rejeitar a hipótese nula da distribuição uniforme. PEARSON (1905) generalizou o problema e KLUYVER (1905) desenvolveu a fórmula precisa da distribuição de r . Destes estudos resultou o teste de probabilidade que é usualmente conhecido como Teste de RAYLEIGH.

Se os ângulos $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n$, constituem uma amostra casualizada, considere-se os vetores unitários com componentes $\cos \alpha_i$ e $\sin \alpha_i$. Os componentes e o comprimento do vetor resultante são dados por:

$$V = E \cos \alpha$$

$$W = E \sin \alpha$$

$$R = \sqrt{V^2 + W^2}$$

Dividindo-se essas quantidades por n , obtêm-se os componentes e o comprimento do vetor médio.

$$x = V/n \quad ; \quad y = W/n \quad ; \quad r = R/n$$

O teste de Rayleigh é R , ou para maior conveniência :

$$Z = R^2 / n ;$$

que pode ser escrito:

$$Z = n \cdot r^2$$

GREENWOOD & DURANT (1955) publicaram tabelas de valores críticos de Z_p para 5% e 1% de probabilidade

A conclusão para o teste de Rayleigh é a seguinte :

Se $Z > Z_p$ a hipótese nula da distribuição é rejeitada, isto é, p é significamente diferente de zero . Se ao contrário $Z \leq Z_p$ a suposição $p = 0$ é consistente com os dados.

4. RESULTADOS :

28

4.1. DIPLÓIDE OBTIDO

Um diplóide heterozigoto foi isolado de acordo com o item 3.7.2. obtido a partir da combinação de dois mutantes auxotróficos de *Aspergillus nidulans* (item 3.1.). Os diâmetros dos conídios dessas linhagens são mostrados na tabela 1. Os resultados representam a média de 50 conídios.

O diplóide será designado por pro A_1 ; paba A_6 ; y A_1 //MSE ou para simplificação y pro paba //MSE.

Tabela 1 . Diâmetro dos conídios das linhagens haplóides e do diplóide obtido a partir delas (média de 50 conídios medidos).

Linhagem	Diâmetro em micra
pro A_1 ; paba A_6 : y A_1 // MSE	4.06
pro A_1 ; paba A_6 : y A_1	3.45
MSE	3.17

4.2. SETORES ESPONTÂNEOS

Foram analisados setores espontâneos que aparecem na linhagem 10v10 de *Aspergillus niger*, linhagem A e na linhagem diplóide y pro paba//MSE de *Aspergillus nidulans* com o fim de verificar se o aparecimento de setores não diferia de uma distribuição circular uniforme .

Com referência aos setores da linhagem 10v10 de *Aspergillus niger* , procurou-se analisar a natureza desses setores e para isso foram isoladas as linhagens S-I e S-II . conforme item 3.8.2.. O

número de setores produzidos por essas linhagens foi determinado e o resultado é apresentado na tabela 2. Estes dados foram transformado . pela transformação $\sqrt{x + 0.5}$, e aos dados transformados foi aplicada a análise de variância . O resultado dessa análise de variância se encontra na tabela 3. onde se constata que não há diferença entre as linhagens quanto ao número de setores produzidos.

A direção de aparecimento dos setores espontâneos de linhagem 10v10 se encontra na tabela 4. Esses dados foram analisados pelo Teste de Rayleigh e o resultado é mostrado na Tabela 5 . onde se pode constatar um resultado não significativo.

A tabela 6. mostra a direção de aparecimento de setores espontâneos na linhagem A. A tabela 7 mostra o resultado da análise estatística onde se pode constatar o valor não significativo de Z.

A tabela 8 mostra a direção onde aparecem os setores espontâneos na linhagem diplóide y pro A_1 ; paba A_6 //MSE. A tabela 9 mostra os resultados desta análise onde se pode constatar o efeito não significativo .

4.3. EFEITO DE DROGAS

4.3.1. Efeitos de drogas em *Aspergillus niger*.

Duas drogas foram testadas em *Aspergillus niger* : o extrato de levedura e a peptona.

A tabela 10 apresenta a direção onde aparecem os setores, na linhagem 10v10, na presença do extrato de levedura. Esses dados foram analisados pelo teste de Rayleigh. O resultado desta análise é mostrado na tabela 11. onde se pode constatar o efeito significativo da droga como indica o valor de Z. A tabela 12 mostra a direção onde aparecem os setores na linhagem 10v10, na presença da droga (peptona). Esses dados foram analisados pelo teste de Rayleigh, e o resultado desta análise é mostrado na tabela 13. onde se pode constatar o efeito significativo da droga como indica o valor de Z.

Tabela 2. Quantidade de colônia em relação à quantidade de setores, das linhagens 10v10. S-1 e S-2.

Quantidade de setores	Linhagem		
	10v10	S-1	S-2
0	8	6	1
1	2	3	6
2	1	5	5
3	5	5	2
4	2	0	3
5	2	0	2
6	0	1	1

Tabela 3. Análise de variância para os dados da tabela 2. transformados.

Causa da variação	G.L.	S. Q.	Q. M.	F
Linhagem	2	0,83349	0,41674	1,37 n.s.
Resíduo	57	17,36795	0,30470	
Total	59	18,20144		

n.s. - Não significativo ao nível de 5 %

Tabela 4. Direção de aparecimento de setores da linhagem 10v10 de *A. niger* na ausência da droga

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)	Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
1	217	4	201
1	332	4	60
1	8	5	259
3	350	5	350
3	100	5	104
3	161	6	152
3	211	6	235
3	30	6	110
4	78	-	-

Tabela 5. Teste de Rayleigh para os dados da tabela 4.

Soma

Tratamento	n	seno	coseno	Z
sem droga	17	2.0805	-0.5230	0.2707 ns

n.s. = não significativo ao nível de 5 %.

Tabela 6. Direção de aparecimento de setores da linhagem A de *A. nidulans* ausência da droga.

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)	Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
1	66	12	6
1	321	12	159
2	45	12	176
2	313	12	198
3	83	13	5
3	65	14	7
4	345	14	41
5	81	14	94
5	130	14	317
6	205	15	67
6	237	15	90
6	285	15	209
7	36	15	275
8	345	16	87
9	105	16	142
9	304	16	217
10	41	16	264
11	127	17	177
11	267	17	17

Tabela 7. Teste de Rayleigh para os dados da Tabela 6.

Soma

Tratamento	n	seno	coseno	Z
sem droga	38	4.5672	3.0398	0.7920 n. s.

n. s. = não significativo ao nível de 5 %.

Tabela. 8..Direção de aparecimento de setores da linhagem
y pro paba//MSE de *A. nidulans* na ausência da droga.

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)	Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
1	109	3	274
1	188	3	299
1	210	4	21
1	257	4	39
1	312	4	70
1	326	4	117
1	333	4	137
2	17	4	145
2	42	4	201
2	57	4	252
2	111	4	264
2	121	4	303
2	138	5	29
2	147	5	49
2	4	5	101
2	318	5	113
2	341	5	211
3	14	5	289
3	19	5	319
3	61	6	12
3	87	6	17
3	89	6	29
3	98	6	118
3	130	6	225
3	150	6	247
3	214	6	264
3	251	6	319

Tabela 8. continuação.

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)	Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
7	12	7	239
7	60	7	258
7	65	7	308
7	91	7	320
7	106	7	350
7	143	8	103
7	151	8	316

Tabela-9. Teste de Rayleigh para os dados da Tabela 8.

Soma

Tratamento	n	seno	coseno	Z
sem droga	68	7.0569	7.0457	1.46 n.s.

n.s. - não significativo ao nível de 5 %.

Tabela 10 . Direção de aparecimento de setores da linhagem 10v10 de *A. niger* na presença da droga (extrato de levedura).

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
1	318
2	0
2	300
3	0
3	229
3	286
4	0
4	248
4	308
5	295
6	245
6	333
7	328

Tabela 11. Teste de Rayleigh para os dados da Tabela 10.

Soma

Tratamento	n	seno	coseno	Z
com droga	13	-7.7492	5.8589	7.2597*

* significativo ao nível de 5%.

Tabela 12. Direção de aparecimento de setores da linhagem 10v10 de *A. niger* na presença da droga (peptona).

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)	Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
1	25	3	75
1	83	3	120
2	12	4	52
2	106	4	89
2	127	4	150
2	169	4	160
2	195	4	178
3	310	-	-

Tabela 13. Teste de Rayleigh para os dados da tabela 12.

Soma

Tratamento	n	seno	coseno	Z
com droga	15	7.0455	-2.5889	3.755*

* significativo ao nível de 5%.

4.4. EFEITOS DE FUNGICIDAS AGRÍCOLAS EM LINHAGENS DE *Aspergillus nidulans* .

4.4.1. Efeito no diplóide

Foram analisados os efeitos de quatro fungicidas :
Benlate , Vitavax, Cloroneb e Plantavax.

Os resultados são mostrados nas tabelas 14, 16, 18, 20, 22;
onde se indica também as concentrações das soluções utilizadas
. O valor de Z mostrado nas tabelas 15, 17 19, 23 ; correspondem
ao teste de Rayleigh (ítem 3.9.) , onde se pode constatar o
efeito significativo das drogas ,exceto na tabela 21,na qual é
analisado o efeito do Cloroneb na concentração de 0.005 mg diretamente
na água.

4.4.2. Efeito na linhagem A

Na linhagem A apenas o Benlate ,Cloroneb, Vitavax foram
utilizados

Os resultados são mostrados nas tabelas 24, 26, 28, 30, onde
se indica também as concentrações utilizadas. Os resultados da
análise estatística são mostrados nas tabelas 25, 27, 29,31, onde
se pode constatar apenas na tabela 25 o efeito não significativo da
droga, onde foi usado Benlate na concentração de 2mg em 100 ml de
água.

Tabela 14. Direção de aparecimento de setores da linhagem y pro-
paba // MSE de *A. nidulans* na presença de droga
(Benlate 2mg /100ml H₂O).

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)	Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
1	6	6	222
1	17	7	291
1	31	8	57
1	58	8	89
1	240	8	94
1	288	8	111
2	18	8	118
2	95	8	335
2	278	9	231
2	329	9	338
3	104	9	350
4	18	10	340
4	64	11	18
4	72	12	41
4	84	12	136
5	136		

Tabela 15. Teste de Rayleigh para os dados da Tabela 14.

		Soma		
Tratamento	n	seno	coseno	Z
com droga	31	6,298	9,2378	4,0323*

* significativo ao nível de 5%.

-Tabela 16. Direção de aparecimento de setores da linhagem y pro
paba//MSE de *A. nidulans* na presença de droga
(Vitavax-20mg/100ml H₂O).

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)	Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
1	9	6	46
1	84	6	89
1	102	6	182
1	125	6	236
1	241	6	241
1	249	6	259
1	261	6	315
2	36	7	201
2	136	7	206
2	179	7	230
2	201	7	245
2	312	7	248
2	318	8	49
2	355	8	136
3	49	8	151
3	104	8	199
3	150	8	237
3	206	8	246
3	226	8	317
4	72	8	336
4	83	9	22
4	201	9	208
5	21	9	216
5	105	9	243
5	199	9	246
5	242	10	251
5	250		

Tabela 17. Teste de Rayleigh para os dados da Tabela 16.

Soma				
Tratamento	n	seno	coseno	Z
com droga	53	-9.3159	-10.982	3.913*

* significativo ao nível de 5 %.

Tabela 18. Direção de aparecimento de setores da linhagem y pro
 paba//MSE de *A. nidulans* na presença da droga
 (Plantavax-0.01mg/ 100 ml H₂O).

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)	Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
1	28	3	201
1	47	3	241
1	69	3	276
1	84	3	331
1	124	4	217
1	132	4	241
1	238	4	277
1	315	4	343
1	326	4	353
1	340	5	9
1	26	5	151
2	76	5	218
2	125	5	281
2	221	5	287
2	239	5	339
2	250	5	352
2	270	5	132
2	300	6	83
3	15	6	86
3	20	6	152
3	39	6	215
3	46	6	275
3	84	6	274
3	124	6	286
3	182	6	317

continuação T 18.

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)	Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
6	334	8	315
6	345	8	345
7	45	9	29
7	120	9	44
7	200	9	152
7	248	9	217
7	275	10	269
7	275	10	310
7	278	10	340
7	283	11	59
8	345	11	125
8	349		

Tabela 19. Teste de Rayleigh para os dados da Tabela 18.

SOMA

Tratamento	n	seno	coseno	Z
com droga	73	-10,3289	11,547	3,2878*

* significativo ao nível de 5%.

Tabela 20. Direção de aparecimento de setores da linhagem y propaba//MSE₁ de *A. nidulans* na presença da droga (Cloroneb 0.5 mg /100 ml H₂O)

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)	Placa de Petri (ângulo)	ângulo (grau)
1	17	7	346
2	13	7	45
2	51	7	50
2	55	7	94
2	227	7	160
2	276	7	260
3	167	7	274
3	236	7	288
4	130	7	297
4	140	8	16
4	291	8	20
4	325	8	67
5	40	8	110
5	86	8	257
5	101	9	26
5	345	9	217
6	95	9	308
6	144	9	357
6	286	9	336

Tabela 21. Teste de Rayleigh para os dados da tabela 20.

Soma				
Tratamento	n	seno	coseno	Z
com droga	38	1.510	2.2819	1,8370 n. s.

n. s. = não significativo ao nível de 5 % .

Tabela 22. Direção de aparecimento de setores na linhagem y pro paba// MSE de *A. nidulans* na presença da droga (0,25mg de Cloroneb/25ml de metanol).

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)	Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
1	19	2	120
1	24	2	156
1	33	3	170
1	89	3	67
1	162	3	90
1	171	3	39
1	191	4	22
1	338	4	60
2	5	4	102
2	28	4	149
2	43	4	177
2	108	4	183
2	30	5	100
		5	131

Tabela 23. Teste de Rayleigh para os dados da tabela 22.

SOMA

Tratamento	n	seno	coseno	Z
com drogas	27	13.33	-0.733	6.60*

* significativo ao nível de 5 %.

Tabela 24. Direção de aparecimento de setores da linhagem A de *A. nidulans* na presença da droga (Benlate 2mg/100ml H₂O).

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)	Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
1	161	9	281
2	97	10	54
3	59	11	101
3	167	11	333
4	52	12	184
4	98	12	272
5	89	13	299
6	119	14	230
7	225	15	165
8	188	15	210

Tabela 25. Teste de Rayleigh para os dados da tabela 24.

Soma				
tratamento-	n	seno	coseno	Z
com droga	20	3.4857	-5.1736	1.9458 n.s.

n.s. = não significativo ao nível de 5 %.

Tabela 26. Direção de aparecimento de setores da linhagem A de *A.nidulans* na presença da droga (0,25 mg Benlate/ 25ml de acetona)

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)	Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
1	206	4	111
2	105	4	143
3	82	4	171
3	141	4	193
4	17	5	14
4	69	5	35
4	95	5	162

Tabela 27. Teste de Rayleigh para os dados da tabela 26,

SOMA				
Tratamento	n	seno	coseno	Z
Com droga	14	6.9606	-2.8487	4.04*

* significativo ao nível de 5 %.

Tabela 28. Direção de aparecimento de setores na linhagem A de *a. nidulans* na presença da droga (0,25mg de Cloroneb/25ml de acetona).

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)	Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
1	91	3	175
1	115	3	195
1	149	3	356
1	162	4	70
2	23	4	131
2	71	4	145
2	169	5	18
2	350	5	62
3	2	5	91
3	7	5	128
3	13	5	179
3	39	6	52
3	87	6	80
3	119		

Tabela 29. Teste de Rayleigh para os dados da Tabela 28.

SOMA				
Tratamento	n	seno	coseno	Z
Com droga	27	13,76	2,1031	7,18*

* significativo ao nível de 5 %.

Tabela 30. Direção de aparecimento de setores da linhagem A de *A. nidulans* na presença da droga (0,4mg Vitavax/25ml H₂O / 1ml acetona).

Placa de Petri (Número)	ângulo (grau)
1	177
2	256
3	128
3	209
4	206
4	304
5	225

Tabela 31. Teste de Rayleigh para os dados da tabela 30.

SOMA				
Tratamento	n	seno	coseno	Z
com droga	7	-2.5893	6.3668	6,7486 *

* significativo ao nível de 5 %.

4.5. EFEITO DE OUTRAS SUBSTÂNCIAS

4.5.1. Efeitos na linhagem A

As substâncias: Verde Malaquita, Sacarina , Fucsina Básica, foram ensaiadas na linhagem A. Para todos esses experimentos a análise realizada através do teste de Rayleigh mostrou um valor significativo das drogas (tabela 33, 35,37).

A ação do Verde Malaquita em linhagem com duplicação é conhecida (PALMER e ROPER, 1970) e a constatação aqui verificada apenas reforça a possibilidade de uso da metodologia aqui proposta.

4.5.2. Efeito no diplóide

Nesse grupo apenas o Verde Malaquita foi analisado , em diplóide . Os dados são apresentados na Tabela 38, .A análise destes dados revelou um valor de Z significativo, indicando um efeito da droga na linhagem diplóide . (tabela 39).

Tabela 32. Direção de aparecimento de setores da linhagem A de *A. nidulans* na presença da droga (0,5mg Verde malaquita mg/200 mlH₂O)

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
1	19
1	279
2	295
3	15
3	305
4	353

Tabela 33. Teste de Rayleigh para os dados da Tabela 32.

Tratamento	n	Soma		
		seno	coseno	Z
com droga	6	-2,2506	4,0565	3,5867*

* significativo ao nível de 5 % .

Tabela 34. Direção de aparecimento de setores da linhagem A de *A. nidulans* na presença da droga (Sacarina 100mg/25ml de H₂O).

Placa de Petri (Número)	ângulo (grau)
1	214
2	19
3	270
4	281
5	264
6	271
7	265

Tabela 35. Teste de Rayleigh para os dados da tabela 34.

Tratamento	n	Soma		
		seno	coseno	Z
com droga	7	-5.2057	0.1331	3.87*

* significativo ao nível de 5 %.

Tabela 36. Direção de aparecimento de setores da linhagem A de *A. nidulans* na presença da droga (30 mg Fucsina básica / 50 ml de H₂O.).

Placa de petri (número)	ângulo (grau)
1	81
2	21
2	49
3	109
3	74
4	88
4	101
5	90
6	9

Tabela 37. Teste de Rayleigh para os dados da tabela 36.

Soma				
Tratamento	n	seno	coseno	Z
com droga	9	8.2159	1.6986	7.82*

* significativo ao nível de 5 %.

Tabela 38. Direção de aparecimento de setores da linhagem y pro
 paba // MSE de *A. nidulans* na presença da droga
 (Verde malaquita 0.5mg/ 200 ml H₂O)

Placa de Petri (número)	ângulo (grau)	Placa de Petri (número)	ângulo (grau)
1	8	5	241
1	43	5	245
1	199	5	323
1	303	6	44
1	331	6	130
2	11	6	140
2	21	6	219
2	40	6	311
2	55	6	327
2	242	7	228
2	246	7	276
3	150	7	291
3	323	8	174
3	332	8	224
3	341	8	265
3	346	8	316
4	125	9	332
4	196	9	347
4	214	10	146
4	257	10	234
4	316	10	302
4	346	10	357
5	135	11	88
5	214	11	221
5	235	11	236
5	315	11	326

Tabela 39. Teste de Rayleigh para os dados da tabela 38.

Soma				
Tratamento	n	seno	coseno	Z
Com droga	52	-14.45	6.509	4.83*

* significativo ao nível de 5 %.

5. DISCUSSÃO :

5.1. USO DA ESTATÍSTICA CIRCULAR

As distribuições circulares são casos especiais de distribuições. Elas podem originar-se de observações de direção em um plano, quando as distâncias não são ou não podem ser consideradas

A instabilidade de fungos filamentosos, observada através do aparecimento de setores, que surgem em colônias, que se apresentam em forma de círculo, pode constituir uma distribuição circular desde que sejam consideradas unicamente as direções em que surgiram os setores.

Teoricamente o surgimento espontâneo de setores, nesses casos, deveria seguir uma distribuição circular uniforme, desde que não havendo direção preferencial, a probabilidade total teria de se distribuir por toda a circunferência, com densidade constante em cada parte.

Os experimentos realizados, neste trabalho e apresentados nas tabelas 8.8 e 10, efetivamente demonstram que a distribuição dos pontos de aparecimento de setores não diferem de uma distribuição circular uniforme.

É evidente que submetida as colônias a determinados tratamentos, que inibam ou estimulem o aparecimento de setores em certos pontos, a distribuição teria de assumir outras formas e diferir de uma distribuição circular uniforme. Isso, certamente, poderia permitir análise dos efeitos de substâncias no aparecimento de setores, ou até mesmo análise dos efeitos de agentes físicos, quando alguma forma de ação localizada pudesse ser estabelecida.

Efetivamente os resultados apresentados neste trabalho, vieram mostrar que certas substâncias aplicadas em algumas partes da colônias (tabela 40) determinaram concentração de setores em pontos preferenciais, levando a distribuição a diferir da distribuição circular uniforme. Isto constitui evidência de que o método de análise da instabilidade, aqui investigado, em que pese algumas limitações que devem ser consideradas, é perfeitamente utilizável.

É indiscutível , portanto diante dos experimentos aqui empreendidos , que, na análise da instabilidade em fungos filamentosos , a estatística circular pode e deve ter um papel importante.

Os experimentos parecem indicar que o método utilizado , é um método rápido e adequado para testar substâncias com efeito na instabilidade de fungos filamentosos , substâncias essas que em certos casos, são mutagênicos ou carcinogênicos.

Tabela 40: Valores de Z para todas as substâncias testadas nas diversas linhagens utilizadas.

Substância testada	Fungo		<i>A. nidulans</i>		<i>A. niger</i>	
	Linhagem A		y pro paba/MSE		10v10	
	n	Z	n	Z	n	Z
s/substância	38	0.7920 n.s	68	1.48n.s.	17	0.2707n.s
extrato de levedura	—	—	—	—	11	7.2597
peptona	—	—	—	—	15	3.755*
2mg Benlate + 100ml H ₂ O	20	1.9458n.s.	31	4.0323*	—	—
0.25mg Benlate +25ml acetona	11	4.04*	—	—	—	—
0,5mg Cloroneb + 100ml H ₂ O	—	—	39	0.1968n.s.	—	—
0,25mg Cloroneb + 25ml metanol	27	7.18*	27	6.60*	—	—
20mg Vitavax + 100ml H ₂ O	—	—	53	3.913*	—	—
0,4mg Vitavax + 1ml acetona	7	6.7486*	—	—	—	—
0,01mg Plantavax 50ml H ₂ O	—	—	73	3.2978*	—	—

continuação da tabela 40 .

Substância tostada	<i>A. nidulans</i>				<i>A. niger</i>	
	Linhagem A		y pro paba//MSE		10v10	
	n	Z	n	Z	n	Z
Verde malaquita	6	3.58*	52	4.83*	—	—
Fucsina básica	9	7.83*	—	—	—	—
Sacarina	7	3.87*	—	—	—	—

n - número de setores

Z = valor do teste de Rayleigh

— - não testada

n. s. - não significativo

* - significativo ao nível de 5 %.

5.2. . SETORES ESPONTÂNEOS

Os experimentos cujos resultados são apresentados nas tabelas 6.8 e 10 mostram que as direções dos pontos de aparecimento espontâneo de setores nas colônias . produzem distribuição que não diferem estatisticamente da distribuição circular uniforme .

Esses experimentos foram realizados com a linhagem A .com a linhagem diplóide y pro A₁; paba A₂// MSE de *Aspergillus nidulans* e com a linhagem 10v10 de *Aspergillus niger* .

A linhagem 10v10 de *Aspergillus niger* em certos meios de cultura e principalmente em meio mínimo (BONATELLI, JR.1977) produz um tipo de setor que se apresenta como uma parte micelial branca, distinta da colônia e na qual se destaca poucas cabeças conidiais escuras típicas da linhagem.

BONATELLI, JR (1977) investigando esse tipo de setor pelos métodos de inoculação e de microcolônias . encontrou . respectivamente . 1.875 e 2.128 setores por placa. Neste trabalho encontramos uma média de 2.83 de setores por placa..

SILVA e AZEVEDO (1978). depois de submeterem a linhagem 10v10 a sucessivas irradiações com raio γ , compararam o número de colônias com setores em amostras provenientes de esporos irradiados e não irradiados . O menor número de colônias com setores foi encontrado na amostra proveniente de esporos que sofreram uma única irradiação .

Da linhagem A de *Aspergillus nidulans* pode-se obter três tipos básicos de setores que são comumente denominados de setores melhorados . setores deteriorados e setores heterocarióticos .

Os setores melhorados são estáveis e de crescimento melhor do que a linhagem original (NGA & ROPER . 1968). Dependendo da deleção eles podem apresentar coloração verde ou amarela .

Os setores deteriorados são instáveis . com grau de instabilidade variável e várias nuances de coloração. A sua ocorrência pode estar relacionada com inversões . novas duplicações em tandem e transposição do segmento duplicado (NGA e ROPER, 1968; AZEVEDO e ROPER.1970).

Os setores heterocarióticos constituem uma mistura de cabeças conidiais amarelas e verdes . (ROPER e NGA. 1960).

Em relação a esses setores a tabela 41 apresenta a frequência que foram obtidos em vários experimentos de diversos autores. Considerando o total de setores essas frequências variaram de 0.79 a 3.36 setores por placa. A variação de setores amarelos por placa foi de 0.48 a 2.48 ; de setores verdes foi de 0.07 a 0.90 , enquanto os deteriorados variaram de 0.04 a 0.25. Todos estes autores trabalharam com linhagem derivada do mesmo estoque e quase todos com métodos e condições semelhantes . o que faz supor que as diferenças encontradas decorram da variabilidade inerente a esse tipo de experimento. É interessante ressaltar esse aspecto tendo em vista a tendência frequentemente observada, no inferir ,sobre efeitos de tratamentos,com apoio em evidências estatísticas.

Tabela 41. Frequência de setores espontâneos produzidos pela linhagem A de *A. nidulans* obtidos em experimentos realizados por diversos autores.

Autores	Frequência de setores por placa			
	A	V	D	TOTAL
AZEVEDO, 1971	2.42	0.63	0.08	3.13
AZEVEDO, SANTANA e BONATELLI, 1977	2.50	0.75	0.11*	3.36
BARACHO (neste trabalho) 1993	0.72	0.90	0.09	1.71
BONATELLI, JR e AZEVEDO, 1977	2.48	0.76	0.10*	3.34
COOKE, ROPER e WATMOUGH, 1970	0.50	0.35	—	—
MAJERFIELD e ROPER, 1978	0.50	0.30	—	—
MENEZES, 1974**	1.71	0.07	0.11	1.89
NIFFINEGER e SOUZA, 1979				
experimento a	1.44	0.24	0.25	2.00
experimento b	1.37	0.45	0.15	2.12
ROPER, PALMER e WATMOUGH, 1972	0.48	0.27	0.04	0.79

A = Amarelo
V = Verde
D = Deteriorado

** = Usando técnica de microcolônia
* = Incluindo outros setores
— = Não calculada

5.3. FUNGICIDAS AGRÍCOLAS

Alguns fungicidas agrícolas mostram uma ação efetiva na instabilidade de *Aspergillus nidulans*, ao alterarem as frequências de setores em linhagens diplóides ou duplicadas. Entre estes estão o Benlate, Cloroneb, Vitavax, Plantavax.

O princípio ativo do Benlate é o benomil (metil 1 butil carbamil 2 benzimidazol carbamato). Este que é um fungicida bastante estudado, tem em comparação com outros compostos ações fungitóxicas em concentrações bastante baixas (BORK e BRAYMER, 1974). Em solução aquoso segundo CLEMONS E SISTER (1969), o benomil é dissociado em metil benzimidazol carbamato (M B C). E apesar de efeitos tóxicos adicionais serem frequentemente referidos como ocorrentes na prática, o sítio primário de ação desse fungicida parece ser no mecanismo da mitose (DAVIDSE, 1973, 1974, 1975 e TUYL, 1977).

A base genética da resistência a esse fungicida foi estudada em *Aspergillus nidulans* (HASTIE e GEOGOPOULOS, 1971; TUYL, 1975, 1977), *Ceratocystis ulmi* (BRASIOR e GIBBS, 1975), *Neurospora crassa* (BORCK e BRAYMER, 1974) e *Ustilago hordei* (BEN-YEPHET et alii, 1974, 1975).

Estes estudos de um modo geral justificaram a hipótese de que os altos níveis de resistência a benzimidazoles, frequentemente verificados são devidos a mutações nucleares em apenas um locus (TUYL, 1977).

Quanto à ação do benlate na instabilidade do *Aspergillus nidulans* HASTIE (1972), verificou que esse fungicida atuava no diplóide aumentando a frequência de segregantes, principalmente a de segregantes haplóides, apresentando portanto um tipo de ação bem parecida com a da p-fluorfenilalanina (MORPUGO, 1961).

Esse tipo de ação do benlate também foi analisado por EDWARDS, NORMENSELL e HOLT (1975), em *Aspergillus nidulans* e *Penicillium chrysogenum* tendo esses autores verificado que os padrões de segregação após tratamento com benlate e pFA, eram semelhantes.

Cloroneb (1-4 dicloro-2,5-dimetoxibenzeno), é o princípio ativo do Demosan. Esse fungicida que pertence ao grupo dos hidrocarbonetos aromáticos, pode inibir síntese de DNA como foi demonstrado em *Rhizoctonia solani* (HOCK e SISLER, 1969) e em *Ustilago maydis* (TILLMAN e SISLER, 1973).

Admite-se que os hidrocarbonetos aromáticos, de uma maneira geral, possam interferir com processos hereditários tendo em vista sua ação no aparecimento de setores em linhagens diplóides de *Aspergillus nidulans* (GEOGOPOULOS et alii, 1976). Dentro desse aspecto é que se enquadra o uso do cloroneb para obter segregantes haplóides de diplóides heterozigotos de *Aspergillus nidulans* como fora proposto por AZEVEDO e SANTANA (1974).

KAPPAS e GEOGOPOULOS (1975) estudando a ação do cloroneb, PCNB e SOPP em *Aspergillus nidulans*, verificaram que esses fungicidas afetavam a instabilidade de linhagens, aumentando o número de segregantes brancos e amarelos em colônias originadas de conídios de linhagens diplóides verdes. Constataram que havia aumento da haploidização com aumento da concentração de fungicidas e concluíram que esses fungicidas causavam não disjunção. AZEVEDO, SANTANA, e BONATELLI, verificaram que cloroneb aumentava o número de setores não apenas em linhagens diplóides de *Aspergillus nidulans* mas também em linhagens duplicadas.

Vitavax 75 P M cujo princípio ativo é o Carboxin (5,6-dihidro-2-metil-1,4-oxatim-3-carboxamido) é um fungicida, considerado especialmente tóxico para basidiomicetos (EDGINGLOV e BARRON, 1967; SNEL et alii, 1970) e que atua inibindo a produção de energia (MATHRE, 1968, 1970; RASGALE e SISLER, 1970). Sua capacidade de inibir a respiração mitocondrial foi demonstrada por MATHRE (1971) e WHITE (1971), enquanto estudo posterior de GUMATILLEKE, AST e SCAZZOCHIO (1976), vieram mostrar que a inibição de crescimento pelo carboxin está relacionada com a capacidade de impedir a oxidação de succinato.

AZEVEDO, SANTANA & BONATELLI JR. (1977) . estudaram a ação do Vitavax na instabilidade do *Aspergillus nidulans* e verificaram que Vitavax não apenas diminui a recombinação mitótica em diplóides , mas também reduz a instabilidade de linhagens duplicadas .

Plantavax 75 P A cujo princípio ativo é o oxicarboxin (4,4-dióxido -5,6-dihidro-2metil-1,4-axatin) é um fungicida sistêmico com alta atividade contra fungos da classe dos basidiomicetos (GUIA DOS FUNGICIDAS , 1976).

No presente trabalho a ação do Benlate foi analisado na linhagem diplóide e na linhagem duplicada de *Aspergillus nidulans* utilizando-se 2 soluções diferentes (item 3.3.6. e 3.3.7.) . A solução de Benlate em água foi testada na linhagem diplóide e na linhagem duplicada (tabela 14 e 24) , mas apenas o efeito significativo foi observado na linhagem diplóide (tabela 15).

No caso da solução de Benlate com acetona . esta foi testada apenas na linhagem A. na qual mostrou um valor significativo como pode ser visto na Tabela 27.

Pode-se explicar o resultado negativo para a solução de Benlate em água, pelo fato de Benlate ter um princípio ativo pouco solúvel na água.

O Cloroneb foi ensaiado também na linhagem diplóide e na linhagem duplicada de *Aspergillus nidulans* . utilizando-se 2 soluções diferentes (item 3.3.4. e 3.3.5.)

A solução de Cloroneb em água foi testada apenas na linhagem diplóide (tabela 20), e pode-se observar na tabela 21 . o valor não significativo de Z.

No caso da solução de Cloroneb em metanol, esta foi testada na linhagem diplóide e na linhagem duplicada (tabelas 22 e 28); as tabelas 23 e 29 mostra o efeito significativo da droga.

A solução de Vitavax em água (item 3.3.8.)foi ensaiada apenas na linhagem diplóide (tabela 16), e o resultado do teste de Rayleigh mostrado na tabela 17 foi significativo.

A solução de Vitavax em acetona (item 3.3.9.)foi testada apenas na linhagem A. e a tabela 31 mostra o valor de Z que foi significativo .

No caso do Plantavax, que foi ensaiado apenas em linhagem diplóide, o resultado do teste de Rayleigh foi significativo.

Pelo resumo apresentado na Tabela 41, pode-se então verificar que quase todas as soluções testadas, tiveram como consequência um valor de Z significativo, indicando portanto um efeito da droga, como era esperado. As exceções foram a solução de 2mg de Benlate + 100ml de H₂O que embora tenha apresentado efeito significativo na linhagem diplóide, não apresentou efeito significativo na linhagem A; e a solução de 0.5 mg Cloroneb + 100ml de H₂O que foi testada apenas na linhagem diplóide e não apresentou efeito significativo.

Esses resultados negativos podem ser explicados pelo tipo de solução usada ou pelo uso de concentrações inadequadas da droga.

5.4.. EFEITO DE OUTRAS SUBSTÂNCIAS

Os dados apresentados nas tabelas 11 e 13 evidenciam o efeito do extrato de levedura e da peptona na instabilidade da linhagem 10v10 de *Aspergillus niger*. Eles mostram de maneira clara, a possibilidade do uso do teste de Rayleigh, para comprovar ação de certas substâncias na instabilidade de fungos filamentosos.

O efeito do extrato de levedura e da peptona neste caso já fora constatado por BONATELLI JR. (1977) que também discutiu amplamente a causa desta instabilidade. Entre as possíveis causas o autor relaciona a heterocariose, a diploidia, a presença de genes mutadores, aberrações cromossômicas e inclusive o envolvimento de fatores citoplasmáticos.

A hipótese da heterocariose foi sugerida baseada em duas constatações, de um lado a baixa viabilidade dos conídios, do outro a presença de elevada porcentagem de conídios binucleados. Efetivamente a linhagem 10v10 tende a produzir cerca de 60 % de conídios binucleados (BARACHO e COELHO, 1978a, 1978b) e como os conídios de *Aspergillus niger* podem ser heterocarióticos (CHANG *et alii*, 1974), essa elevada porcentagem de conídios binucleados facilmente poderia manter uma condição heterocariótica da linhagem.

A comparação da viabilidade dos conídios, em meio mínimo e em meio completo, mostrou uma baixa viabilidade da linhagem em meio mínimo. Verificou-se também que essa viabilidade aumentava quando o meio mínimo era suplementado com caseína hidrolisada, solução de vitamina, peptona, extrato de levedura, o que poderia indicar a presença de um núcleo com deficiência nutricional, que se mantinha graças a um outro tipo que não portava essa deficiência (BONATELLI JR. 1977).

HAAS *et alii* (1956) já haviam analisado fenômeno semelhante em *Penicillium chrysogenum*. Em *Aspergillus niger* casos semelhantes tinham sido descrito por YUILL (1953) e NGA *et alii* (1975).

O fato de ter obtido mutantes auxotróficos e de ter constatado que todos os setores isolados apresentavam crescimento em meio mínimo, fez com que BONATELLI JR. (1977), pelo menos em princípio rejeitasse a hipótese da linhagem 10v10 ser diplóide.

Apoiado na hipótese da heterocariose SILVA e AZEVEDO, (1978) formularem a explicação para o fato de terem obtido um número mais baixo de colônias com setores após a primeira irradiação com raios γ . Para esses autores poder-se-ia supor o aparecimento de um sistema de letais balanceados, depois da primeira irradiação, sistema este, onde cada núcleo continha um letal recessivo. Conídios com letais balanceados dariam origem a colônias estáveis, uma vez que a homocariose seria letal.

A natureza dessa instabilidade da linhagem 10v10, do *Aspergillus niger* resta desconhecida apesar das hipóteses formuladas. Mas um fato possivelmente, um dos mais importantes deve ser considerado. Os setores voltam a produzir colônias semelhantes as originais, as quais também voltam a produzir setores do mesmo tipo (BONATELLI JR. 1977). Neste trabalho foi isolada a linhagem S-I, provinda de setores da linhagem 10v10, e a linhagem S-II, provinda de setores da linhagem S-I. A comparação do número de setores dessas linhagens não apresentam diferença estatística, como se pode ver nas tabelas 2 e 3. Isso é uma indicação de que a natureza genética do setor, não difere da natureza genética da linhagem.

As hipóteses aqui relacionadas ficam comprometidas diante desse fato.

O aparecimento de setores em uma colônia de fungo, é, indiscutivelmente, um processo de diferenciação. E embora esse processo possa estar ligado à segregação de núcleos, é inegável que ele também pode decorrer de regulação gênica.

Os setores produzidos pela linhagem 10v10, possivelmente são casos dessa natureza e provavelmente decorrem de uma alteração eventual na regulação gênica, que alguma substância contida no extrato de levedura ou peptona pode corrigir. Aliás o extrato de levedura e a peptona parecem ter uma ação importante não apenas nesse tipo possível de diferenciação, mas no próprio crescimento do *Aspergillus niger* (STEINBERG, 1939).

Outras substâncias foram testadas neste trabalho como o Verde Malaquita, Fucsina Básica e Sacarina .

A Sacarina e a Fucsina Básica foram testadas apenas na linhagem A (tabelas 34 e 36).

O Verde Malaquita foi testado na linhagem A e na linhagem diplóide (tabelas 32 e 38).

O teste de Rayleigh aplicado a esses experimentos mostrou o efeito significativo dessas drogas.

A Sacarina tem propriedades carcinogênicas , teratogênicas e toxicológicas (KRAMERS .1975). Testada em bactérias , leveduras ,mosca de fruta , plantas , células "in vivo" e "in vitro" de mamíferos, revelou-se mutagênico para esses organismos.

Em bactéria VOODG *et alii*.(1973) testaram a Sacarina em: *Klesbsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes* e *Salmonella typhimurium*. Somente em *Salmonella typhimurium* obtiveram um aumento na taxa de mutação.

ARATI DAS (1979) . relatou efeitos de alteração no metabolismo celular causando atrasos na germinação de conídios de *Aspergillus niger* crescidos em meio de cultura com sacarina nas concentrações de 3 e 7 mg/ml. Relatou também efeitos de diminuição no tamanho das colônias assim como no número de conidióforos formados, sugerindo que a sacarina tem efeito mutagênico.

PALMER e ROPER (1970) . estudaram a ação do Verde Malaquita e verificaram que essa substância aumenta a frequência de deleções.

Quanto à Fucsina Básica verificou-se que ela age como mutagênico em levedura, atuando sobre o DNA mitocondrial e produzindo mutantes *petite* (BARRERE e MOUMOLLI .1975).

6. CONCLUSÃO

- 1- Os pontos de aparecimento de setores em colônias de fungos filamentosos que se apresentam em forma de círculo pode constituir uma distribuição circular, desde que sejam consideradas unicamente as direções de aparecimento desses pontos.
- 2- Os pontos de aparecimento de setores que surgem, tendem a constituir uma distribuição circular uniforme, desde que não há direção preferencial e a probabilidade total tende a se distribuir por toda a circunferência com densidade constante em cada parte.
- 3- Quando se submete as colônias a tratamento que inibe ou estimula o aparecimento de setores em determinados pontos, a distribuição dos pontos de aparecimento de setores tende a diferir de uma distribuição circular uniforme.
- 4- É plenamente justificável o uso da estatística circular para analisar efeitos de substâncias que atuam na instabilidade de fungos filamentosos.
- 5- O método utilizado neste trabalho revelou-se um método rápido e adequado para testar certas substâncias com efeito na instabilidade de fungos filamentosos, substâncias essas, que em certos casos são mutagênicas e carcinogênicas.

7. RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar a possibilidade de aplicação da estatística circular para detectar efeitos de drogas na instabilidade dos fungos *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus niger*.

Várias substâncias cujos efeitos já eram conhecidos, e certamente podiam aumentar ou diminuir a instabilidade, foram testadas.

Em *A. nidulans* foram testadas substâncias como o Benlate, Cloroneb, Plantavax, Vitavax, Verde Malaquita, Fucsina Básica e Sacarina. Em *A. niger* foram testadas Peptona e Extrato de Levedura.

Para aplicação da estatística circular foram medidos os ângulos de aparecimento de setores na presença ou ausência da droga, e os dados analisados pelo Teste de Rayleigh.

Os resultados apresentados neste trabalho, vieram mostrar que certas substâncias aplicadas em algumas partes da colônia determinaram concentração de setores em pontos preferenciais, levando a distribuição a diferir da distribuição circular uniforme.

Com relação aos fungicidas, Benlate e Cloroneb, obteve-se alguns resultados negativos que podem ser explicados pelo tipo de solução usada ou pelo uso de concentrações inadequadas.

Quanto ao Teste de Rayleigh tudo indica que pode ser útil para detectar o efeito de droga na instabilidade de fungos filamentosos.

Quanto ao uso da estatística circular podemos concluir que, apesar de alguns resultados negativos encontrados no trabalho, sua aplicação parece aceitável, podendo vir a constituir um método rápido e adequado para testar substâncias com efeito na instabilidade de fungos filamentosos, substâncias estas que, em certos casos são mutagênicas e carcinogênicas.

8. ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the possibility of applying circular statistics to detect the effects of certain drugs on the instable strains of fungi *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*.

Various substances, with previously known effects which could easily augment or reduce the fungi instability were tested.

In *Aspergillus nidulans*, various substances were tested such as Benlate, Chloroneb, Plantavax, Vitavax, Malachite green, Basic Fuchsin and Saccharin. In *Aspergillus niger*, the substances Peptone and Yeast extract were tested.

In order to apply circular statistics, we measured the angles of the appearing sectors either in the presence or absence of the drugs, and the data were analysed by the Rayleigh test.

The results presented in this study showed that certain substances applied to some parts of the colony, determined a concentration of sectors in preferential points, making the distribution differ from the uniform circular distribution.

In relation to the fungicides Benlate and Chloroneb, we obtained some negative results which can be explained by the type of solution used or through the use of inadequate concentration.

Regarding the Rayleigh Test, everything, leads us to believe that it could be useful in detecting the effect of the drugs on the instability of the filamentous fungi.

We can conclude that, despite finding some negative results in our study, the application of circular statistics seems acceptable, capable of constituting a quick and adequate method of testing substances which affect the instability of filamentous fungi substances which, in certain cases, are mutagenics and carcinogenics.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

73

- ALMEIDA, L. M. .1978. Obtenção de linhagens com duplicações cromossômica em *Aspergillus nidulans*. Tese de mestrado /ESALQ
- ANDERSON, R.P. e J.R. ROTH, 1978. Tandem chromosomal duplications in *Salmonella typhimurium* : Fusion of histidine genes to novel promoters . *Journal of Molecular Biology* 119 (1) : 146-166.
- ARATI DAS . 1979. Mutagenic Effects of Saccharin on *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, 114,(2):221-222.
- AZEVEDO, J.L. e J.A. ROPER. 1970. Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: sucessive and transposable genetic changes. *Genetical Research*. 16: 79-93.
- AZEVEDO, J.L., 1971 . Mitotic non conformity in *Aspergillus nidulans*. England . University of Sheffield 240 p(Ph D -Thesis).
- AZEVEDO, J.L. e E.P. SANT'ANA. 1975. The use of Chloroneb to obtain haploid segregants from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter* , 13 :6
- AZEVEDO, J.L., E.P. SANTANA e R. BONATELLI, JR, 1977. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1.4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research* , 48: 163-172.
- BALL, C, 1966. Instability associated with chromosome translocation in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*. 21:531.
- BALL, C, 1971. Haploidization analysis in *Penicillium chrysogenum* . *Journal of General Microbiology*. 66: 63-69.
- BARACHO, I.R. e W.R. COELHO. 1978a. Proporção de conídios binucleados em *Aspergillus niger*. *Ciência e Cultura*. 30: 605-608.

- BARACHO, I.R. e W.R. COELHO. 1978b. Influência da idade e origem da colônia . na proporção de conídios binucleados em *Aspergillus niger*. *Revista de Microbiologia*, 9 :1-3.
- BARNETT, W E e F.J. De SERRES. 1963. Fixed genetic instability in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 48: 717-723.
- BARRERE, G e J. C. MONOULOU. 1976. Yeast mutants resistant to Basic Fuchsin: A genetic approach to the integration of nuclear and mitochondrial information. *Mutation Research* , 35: 39-52.
- BEN-YEPHET, Y; Y, HENIS e A. DINOOR. 1974. Genetic studies on tolerance of carboxin and benomyl at the sexual phase of *Ustilago hordei* . *Phytopathology*, 64: 51-56.
- BEN-YEPHET, Y, HENIS e A. DINOOR .A . 1975. Inheritance of tolerance to carboxin and benomyl in *Ustilago hordei*. *Phytopathology*, 65: 563-567.
- BOLLON, A.P. 1975. Gene duplication and fusion genesis of the IVL-1 multi functional gene in *S. cerevisiae*. *Genetics*: 80 (3 part I).
- BONATELLI JR. R. 1977. Estabilidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba . Esalq/USp. Tese de Mestrado
- BONATELLI JR. R e J.L. AZEVEDO . 1977. Effects of ethidium bromide in diploid and duplication strains of *Aspergillus nidulans* . *Experientia* .33: 311-312.
- BORCK, K e H.D. BRAYMER. 1974. The genetic analysis of resistance to benomyl in *Neurospora crassa* . *Journal of Microbiology*, 85: 51-56.
- BURR, K.W. J.A. ROPER e J. RELTON , 1982. Modification of chromosome instability in *Aspergillus nidulans* . *Journal of Microbiology*, 128: 2899-2907.
- BURNS, J.A. e D.U. GERSTEL , 1967. Flower color variegation and instability of a block of heterochromatin in *Nicotiana*. *Genetics*. 57: 155-167.

- BRASIER, C.M e J.N. GIBBS.1975. MBC tolerance in aggressive and non-aggressive isolates of *Ceratocystis ulmi*. *Annals of Applied Biology*, 80: 231-235.
- BRIDGES, B.A., R.E. DENNIS, R.J. MUNSON e M.A. ROTHWELL.1971. A mutational instability associated with an ochre suppressor in *Escherichia coli*. *Heredity*, 27:(3) : 485-486.
- CAMPBELL, D.A. .S. FOGEL e K. LUSNAK. 1975. Mitotic chromosome loss in a disomic haploid of *S. cerevisiae*. *Genetics* 79(3) : 383-396.
- CASE, B.L. e J.A. ROPER, 1981. Mitotic processes which restore genome balance in *Aspergillus nidulans* . *Journal of General Microbiology* ,124: 9-16.
- CHANG, L.T;TERRY e R.W.TUVESON.1974. The influence of heterokaryotic conidia on the selective recovery of somatic diploids in *Aspergillus niger* .*Mycologia*. 66: 67-72.
- CLEMONS, G.P. e H.D. STISLER.1969. Formation of a fungitoxic derivative from benlate. *Phytopathology*. 59:705-706.
- CLUTTERBUCK, A.J, 1970. A variegated position effect in *Aspergillus nidulans* . *Genetical Research*, 16:303-316.
- COOKE, P. J.A. ROPER e W. WATMOUGH, 1970. Trypan blue-induced deletions in duplications strains of *Aspergillus nidulans* .*Nature*,226: 276-277.
- CROFT, J.H. 1966. A reciprocal phenotypic instability affecting development in *Aspergillus nidulans* *Heredity* . 21: 565.
- DARLINGTON, O . 1966. Instabilities in *Salmonella typhimurium*.*Heredity* 21: 527-528.

- DAVIDSE, L. C. 1973. Antimitotic activity of methyl benzimidazol-2-yl-carbamate (M.B.C.) in *Aspergillus nidulans*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 3: 317-325.
- DAVIDSE, L. C. . 1974. Mode of action of methyl benzimidazol-2-yl-carbamate (M.B.C.) and some biochemical aspects of acquired resistance against this fungicide in *Aspergillus nidulans*. *Sytemfungizide*, 137-144.
- DAVIDSE, L. C. . 1975 .Antimiotic activity of methyl benzimidazol-2-yl-carbamate in fungi and its binding to cellular protein. *Microtubules and microtubule inhibitors*, North Holland Public C.o. . Amsterdam. 483-495.
- DAWSON, G.W.P e P.F. SMITH-KEARY. 1963. Episomic control of mutation in *Salmonella thyphimurium*. *Heredity*, 18:1-20.
- DEMEREK, M .1931. Behavior of two mutable genes in *Delphinium ajacis*. *Journal of genetics* , 24: 179-193.
- DEMEREK . M. 1932. Effect of temperature on the rate of change of the unstable miniature 3-gamma gene of *Drosophila virilis*. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.* 18: 430-434.
- DEMEREK, M. 1937. Frequency of spontaneous mutations in certain stocks of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 22: 469-478.
- DEMEREK, M. 1941. Unstable genes in *Drosophila* .Cold Spring Harbor *Symposia on Quantitative Biology*, 9: 145-150.
- EDGINGTON, L.V. e G.L. BARRON. 1967. Fungitoxic spectrum of oxathiim compounds. *Phytopathology*, 57: 1256-1257.
- EDWARDS, G. F. S. L. . NORMANSELL, I. D. e HOLT, G. , 1975 Benlate induced haploidization in diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum* . *Aspergillus news Letter I₂*. 12.

- EMERSON, R.A. .1914. The inheritance of a recurring somatic variation in variegated ears of maize. *American Naturalist*, 48: 87-115.
- ELLIOTT, C.G. 1960. The cytology of *Aspergillus nidulans* . *Genetical Research* .1:462-476.
- EPHRATI-ELIZUS, E e S. LUTHER-DAVIES. 1977. Phenotypic instability in a tip-2 mutant of *Escherichia coli* III Supression of thermo induction and filamentation. *Molecular General Genetic*, 155 (2): 163-170.
- FAVRAUD, L. 1984. Instabilidade mitótica em linhagem de *Aspergillus nidulans* com duplicação cromossômica . ESALQ/USP.
- GABRIELLI, AC. e J.L. AZEVEDO. 1980. A strain of *Aspergillus nidulans* producing a high frequency of disomics. *Transactions of the British Mycological Society*, 75: 15-20.
- GAVAZZI, G, M. SANDRI, G. ANZANI e A. GHIDONI. 1977. Chromosomal instability associated with duplications in maize. *Heredity*, 38(3): 349-359.
- GEOGOPOULOS, S. G ; A. KAPPAS e A. C. HASTIE. 1976. Induced sectoring in diploid *Aspergillus nidulans* as a criterion of fungitoxicity by interference with hereditary processes. *Phytopathology*, 66: 217-220.
- GOLDSTEIN, A. e J. S. SMOOT. 1955. A strain of *Escherichia coli* with an unusually high rate of auxotrophic mutation. *Journal of Bacteriology*, 70 : 588-595.
- GUIA DOS FUNGICIDAS. 1976. Editora Série.
- GREEN, M. M. 1967 The genetics of a mutable gene at the white locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 56: 467-482.

- GREEN, M.M. 1969. Controlling element mediated transpositions of the white gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 61: 429-441.
- GREEN, M.M., 1973. Some observations and comments on mutable and mutator genes in *Drosophila*. *Genetics supplement*, 73 : 187-194.
- GREENBLATT, I.M. e R.A. BRINK, 1962. Twin mutations in medium variegated pericarp in maize. *Genetics*: 47: 489-501.
- GREENBLATT, I.M. e R.A. BRINK, 1963. Transpositions of modulator in maize into divided and undivided chromosome segments. *Nature*: 197: 412-413.
- GREENBLATT, I.M. , 1966. Transposition and replication of modulator in maize . *Genetics*, 53: 361-369.
- GREENBLATT, I.M. , 1968. The mechanism of modulator transposition in maize. *Genetics*: 58: 585-597.
- GREENWOOD, J.A. e D.DURANT , 1955. The distribution of the length and components of the sum of n random unit vectors . *Ann. Math. Stat.* 26; 233-234.
- GUNATI LLEKE, I. A. V. N. ; G. SCAZZOCHIO e H.N. ARST, 1975. Cytoplasmic and nuclear mutations to chloramphenicol resistance in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 137: 269-276.
- HAAS, F.L. ; T.A. PUGLISI, A.J. MOSES e J. LEIN, 1956. Heterokaryosis as a cause of culture rundown in *Penicillium*. *Applied Microbiology* 4: 187-195.
- HABER, J.E. 1974. Bisexual mating behavior in a diploid of *S. cerevisiae* evidence for genetically controlled non-random chromosome loss during vegetative growth . *Genetics* , 78: 843-858.
- HANSCHKE, P. E. 1975. Gene duplication as a mechanism of genetic adaptation in *S. cerevisiae*. *Genetics* 79(4) : 661-674.

- HANSCHÉ, P.E. ,V. BERES e P. LANGE. 1978. Gene duplication in *Saccharomyces cerevisiae* Genetics , 88:(4) 673-687.
- HARRISSON. B.J.. 1971 Association of three highly mutable genes in *Antirrhinum majus* . Heredity. 27(3):448
- HARRISSON. B.J. e R. CARPENTER. 1977. Somatic crossing-over in *Antirrhinum majus*. Heredity. 38(2): 169-189.
- HASTIE. A.C. 1970. Benlate induced instability of *Aspergillus* diploids . Nature. 226: 771.
- HASTIE ,A.C. and S.G. GEOGOPOULOS . 1971 . Mutational resistance to fungitoxic benzimidazole derivatives in *Aspergillus nidulans* Journal of General Microbiology 67: 371-373.
- HOCK. W.K.e SISLER. H.D., 1969. Specificity and mechanism of antifungal action of chloroneb. Phytopathology , 59: 627-632.
- HUGHES, D.T. e S. AUSTIN. 1966. Karyotype instability in the syrian hamster "in vivo " and "in vitro" Heredity 21: 531-532.
- JINKS. J.L. 1966. Extranuclear inheritance. In : AINSWORTH. G.C. e A.S.SUSSMAN. ED . The Fungi An advanced treatise. New York. Academic Press, v.2. 619-629.
- KAFER. E. 1960. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans* . Nature 186: 619-620.
- KAFER . E. 1961 .The process of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans* .Genetics. 46: 1581-1609.

- KAPPAS, A ; S.G. GEOGOPOULOS e A.C. HASTIE. 1973. Genetic instability of *Aspergillus nidulans* diploids induced by benzimidazole and thiophanate fungicides. *Mutation Research*, 21: 190-191.
- KAPPAS, A and S.C. GEORGOPOULOS. 1975. Fungicides causing mitotic segregation in *Aspergillus diploids* . *Mutation Res.* 26: 236.
- KINGSMAN, A.J. D.A. SMITH e M.D. HULANICKA, 1978. Genetic instability in auxotrophs of *Salmonella typhimurium* requiring cysteine or methionine and resistant to inhibition by 1,2,4-triazole . *Genetics* 89: (3) 419-437.
- KLUYVER, J.C. .1905 . A local probability problem. *Ned . akad. Wettersh. Proc , Ser . A.* 8: 341-350.
- KRAMER, P.G.N. 1975. The mutagenicity of Saccharin. *Mutation Research* 32: 81-92.
- LATEN, H.M. J. GORMAN, F. WEBB e R.M. BOCK. 1976. Genetic analysis of a transposable supressor genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* , 73(12): 4623-4627.
- LEE, Y.T. e B.H. NGA . 1973. Meiotic segregation behavior of translocation haploids in *Aspergillus nidulans* . *Genetics (supplement)* . 74: 153-154.
- LIEBER, M.M. 1976. The effects of temperature on genetic instability in *Aspergillus nidulans* . *Mutation Research* 34: 93-122.
- MACDONALD, K.D. 1968. The selection of auxotrophs of *Penicillium chrysogenum* with nystatin. *Genetical Research* 11: 327-330.
- MAYNE, R.Y., J.W. BENNETT e J. TALLANT. 1971. Instability of an aflatoxin-producing strain of *A. parasiticus*. *Mycologia*, 63: 644-648.

- MAJERFELD . I.H. e J.A. ROPER. 1978. The effect of coumarin on the frequency of deletions in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 159: 203-209.
- MATHRE, D.E. . 1968. Uptake and binding of oxathiin systemic fungicides by resistant and sensitive fungi. *Phytopathology*, 58:1464-1469.
- MATHRE , D.E. 1970 . Mode of action of oxathiin systemic fungicides I Effect of carboxin and oxycarboxin on the general metabolism of several Basidiomycetes. *Phytopathology*, 60: 671-676.
- McCLINTCOK.B. 1951. Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 16:13-47.
- McCLINTOCK. B, 1953. Induction of instability at selected loci in maize. *Genetics* 38: 579-599.
- McCLINTOCK.B.1955. Intranuclear systems controlling gene action and mutation. *Brookhaven Symposia Biology*, 8:58-71
- Mc CULLY. K .S.e E. FORBES . 1965. The use of p-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups . *Genetical Research* . Cambridge: 6:352-359.
- MENEZES . E.M. . 1974. Análise Genética de variantes deteriorados e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (EINDAM Winter . Piracicaba. ESALQ -USP, 114 p (Dissertação do Mestrado) .
- MENEZES . E. M. e J.L..AZEVEDO . 1978, Reversion in variants from a duplication strain of *Aspergillus nidulans* . *Molecular General Genetics* . 164: 255-258.
- MERCER. B e N.R. MORRIS. 1975. The effect of chloral hydrate upon mitosis in *Aspergillus nidulans* . *Journal of General Microbiology*, 88:197-199.

- MORPUGO, G. 1961 .Somatic segregation induced by p-fluorophenylalanine . *Aspergillus News Letter* , 2: 10 .
- NEWMEYER,D. 1965. Somatic instability in *Neurospora* resulting from a pericentric inversion. *Genetics* 52: 462-463.
- NEWMEYER,D e C.W. TAYLOR. 1967. A pericentric inversion in *Neurospora* with unstable duplication progeny. *Genetics*:56: 771-791.
- NEWMEYER,D e D.R.GALEAZZI, 1977. The instability of *Neurospora* duplications (Dp (I L- I R) H 4250, and its genetic control. *Genetics*, 85: 461-488.
- NIFFINEGGER e D.R.SOUZA, 1979. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans* . Piracicaba 244p. Dissertação de Mestrado ESALQ/USP.
- NGA,B.H.e J.A.ROPER . 1966. A chromosomal process giving rise to vegetative instability in *Aspergillus nidulans* *Heredity*,21;530-531.
- NGA,B.H.e J.A.ROPER.1968.Quantitative intrachromosomal changes arising at mitoses in *Aspergillus nidulans* .*Genetics*; 58: 193-209.
- NGA,B.H e J.A.ROPER .1969. A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*.*Genetical Research*. 14: 63-70.
- NGA, B.H.;SIEW POH e G.LIM. 1975. The occurrence in nature of a diploid strain of *Aspergillus niger*.*Journal of General Microbiology*, 88: 364- 366.
- FACCOLA, L.D. 1982. Estudos genéticos e citológicos em variantes deteriorados de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba . ESALQ/USP 131p . Dissertação de Mestrado.

- PALMER, H.M e J.A. Roper . 1970. Induced deletions in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus news Letter*, 11:20.
- PARAG, Y e J.A. ROPER. 1975. Genetic control of chromosome instability in *Aspergillus nidulans* as a mean for gene amplification in eukariotic microorganism. *Molecular General Genetics*, 140:(4)275-287.
- PEARSON, K. 1905 . The problem of the random walk . *Nature* 74: 294-302.
- PERLMAN . D. . R.B. GREENFIELD e E.O'BRIEN. 1954. Degeneration of a *Streptomyces griseus* mutant on repeated transfer. *Applied Microbiology* 2: 199
- PERLMAN, D e C.J. SIH. 1960. Fungal synthesis of citric . fumaric and itaconic acids . *Progress in Industrial Microbiology*, 2: 168-194.
- PIMENTEL GOMES. 1966. Curso de estatística experimental 3ª edição. Piracicaba. Sp. 436p.
- PIZZIRANI-KLEINER. A.A. 1981. Efeito do gene bin A₁ na formação de conídios de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba. ESALQ/USP 141p. Tese de Dotoramento.
- PIZZIRANI-KLEINER e J.L. AZEVEDO. 1986. Characterization and genetical analysis of an *Apergillus nidulans* strain that produces multinucleate conidia. *Transfactions of General Microbiology* 33: 238-246.
- PONTECORVO. G; J.A. , ROPER; D.M .HEMMONS . K.D. Mac DONALD e A.W.J. BUFTON .1953 .The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* ;5 :141-238.
- PONTECORVO .G. ; E. TARR GLOOR; e E. FORBES. 1954. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Genetics* . 52: 226-237.

- PONTECORVO . G e E. KAFER. 1988. Genetic analysis based on mitotic recombination . *Advances in Genetics* 9: 71-104.
- QUEIRÓS, M.V.1988. O efeito da protoplastização na instabilidade mitótica de *Aspergillus nidulans*.1988 ESALQ/USP Tese de Mestrado.
- RASGADALE.N.N. and H.D. SISLER, 1970. Metabolic effects related to fungitoxity of carboxin . *Phytopathol*, 60: 1422-1427.
- RAPER, K.B. e D.I. FENNEL. 1965. The Genus *Aspergillus*. William and Welkins Baltimore ,685p
- RAYLEIGH, LORD .1880. On the resultant of a large number of vibrations of the same pitch and of arbitrary phase. *Phil. Mag*, 10: 73-78;also . *Sci papers* . 1: 491-496.
- RAYLEIGH. LORD . 1905 . The problem of randow walk . *Nature* 72: 318: *Sci papers* . 5: 256.
- RAYLEIGH. LORD . 1919a . On the problem of random vibrations of random flights in one two or three dimensions . *Phil. Mag*, 6th Ser .37: 321-347; also *Sci. papers*, 6 : 694-626.
- RAYLEIGH. LORD . 1919b. On the resultant of a numberof unit vibrations whose phase are at random over a range not limited to an integral number of periods. *Phil. Mag* 6th Ser . 37; 498-515: also . *Sci papers* , 6: 627-647.
- REUSSER.F. ; H.J. KOEPESELL e G.M. SAVAGE. 1961 . degcneration of *Streptomyces niveus* with repeated transfers. *Applied . Microbiology*. 9: 342-345.
- RIYASATY, S. 1966. Instability and selective mutations in the aromatic genes of *Salmonella typhimurium*. *Heredity*.21: 528.

- ROPER , J.A. 1952 . Production of heterozygous diploids in filamentous fungi . *Experientia* , 8 , 14-15.
- ROPER, J.A. e B.H. NGA . 1969. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans* : the production of hypodiploid and hypohaploid nuclei. *Genetical Research* , 14: 127-136.
- ROPER, J. A. ; PALMER, H. M. e WATMOUGH, W. A. 1972. Mitotic non conformity in *Aspergillus nidulans* : the effects of caffeine. *Molecular General Genetics*, 118: 125-133.
- ROSATO . Y.B. 1973. Efeitos do etil-metano sulfonato e acriflavina na instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans* . Piracicaba , ESALQ/USP 74 p (Dissertação de Mestrado).
- ROSATO, Y.B. e J.L.. AZEVEDO. 1978. Acriflavine and ethyl methanosulfonate-induced mutants of *Aspergillus nidulans* strains with chromosome duplication . *Revista Brasileira de Genética* 1: 247-262.
- RHOADES, M.M. . 1941. The genetic control of mutability in maize. *Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology*, 9: 138-144.
- SANTANA , E.P. 1974. Alteração na frequência de recombinação mitótica e mutantes resistentes a fungicidas em *Aspergillus nidulans* . ESALQ/USP- Dissertação de Mestrado
- SEXTON , C.E e J.A. ROPER . 1987. Spontaneous duplications and transpositions of a large chromosome segment in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 130: 583-595.
- SILVA, J.C. 1977. Seleção e estabilização de *Aspergillus niger* para produção de ácidos através da radiação gama. Campinas . 91p. Tese de Mestrado /UNICAMP.

- SILVA, J.C. e J.L. AZEVEDO . 1978. Radiação gama e instabilidade em *Aspergillus niger*. *Revista de Microbiologia*, 9:156-158.
- SINGH, M e U. SINHA. 1976. Chloral hidrate induced haploidization in *Aspergillus nidulans*. *Experientia* 32(9):1144-1145.
- SNEL, M. B von SCHMELING e L.D. EDGINTON, 1970. Fungitoxicity and structure activity relationships of some oxathiin and thiazole derivatives . *Phytopathology* ,60: 1164-1169.
- STEIMBERG, R.A. . 1939. Relation of carbon nutrition to trace-element and accessory requirements of *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural Research*, 59: 749-763.
- TILLMAN, R.W. e H.D. SISLER ,1973. Effect of chloroneb on the growth and metabolism of *Ustilago maydis*. *Phytopathology* , 63 : 219-225.
- TUYL, J.M.VAN.1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. *Mededelingen. Landbouwhogeshool Wageningen* , 77: 1-136.
- TREFFERS, H.P. V. SPINELLI e N.O. BELSER, 1954 A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in *Escherichia coli*. *Proceedings of the national Academy of Science, U.S.A.* 40: 1064-1071.
- VOOGD, C.E., J.J. DERSTEL and J.J.J.A.A. JACOBS. 1973. Onderzoek op mutagene werking van natriumcyclamaat, natriumsaccharinaat en cyclohexylamine (Research on the mutagenic activity of sodium cyclamate, sodium saccharin and cyclohexylamine), Report 15/73. Chemo, Dutch State Institute of Public Health.
- WHITE, G.A. . 1971 A potent effect of 1.4, oxathiin systemic fungicides on succinate oxidation by a particular preparation from *Ustilago maydis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44:1212-1219.
- YUILL, J.L. 1953. Culture study of an unstable strain of *Aspergillus niger*. *Journal of general Microbiology*. 8

ZAR, JERROLD. H. -1974. Bioestatistical Analysis. Prentice Hall International, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 2^o edition.

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