

BC/15513
IB/80026

UNI CAMP



INTERAÇÃO GÊNICA E PRODUÇÃO DE GLICOAMILASE EM HÍBRIDOS
INTERESPECÍFICOS DE *Aspergillus niger* E *Aspergillus awamori*

Alfredo Luís Zangarini Grisi de Oliveira

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção
do título de Mestre em
Ciências Biológicas, área
Genética.

CAMPINAS -SP

1991

T/UNICAMP

OL4_i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	IB/11/21
N.º CHAMADA	OL 42
V.	EX
TOMBO BC	5513
PROC.	215/92
C	☐
D	☒
PREÇO	000 20.000.00
DATA	29-1-92
N.º CPD	

CM-00029344-3

Este exemplar corresponde à Redação Final
da Tese defendida pelo candidato Alfredo
Luis Zangarini Grisi de Oliveira e Aprovada
pela Comissão Julgadora

UNICAMP

Campinas, 18/12/91



INTERAÇÃO GÊNICA E PRODUÇÃO DE GLICOAMILASE EM HÍBRIDOS
INTERESPECÍFICOS DE *Aspergillus niger* E *Aspergillus awamori*

Alfredo Luis Zangarini Grisi de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Renato Bonatelli Jr.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção
do título de Mestre em
Ciências Biológicas, área
Genética.

CAMPINAS -SP

1991

À

Meus pais Deil e Marízia

Minha noiva Thaís

Dedico

AGRAGDECIMENTOS

Quero expressar meus sinceros agradecimentos às pessoas e instituições que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

Ao Prof. Dr. Renato Bonatelli Jr., pelo confiança, amizade e excelente orientação.

Aos Professores: Dr. João Lúcio de Azevedo, Dr. Ivanhoé Rodriguez Baracho e Dr. Cláudio Luís Messias, pela atenção na leitura e valiosas sugestões durante a análise prévia desta tese.

À meus pais, que me apoiaram, possibilitaram meus estudo e propiciaram meu desenvolvimento pessoal

À minha noiva, Thaís Beccaro, pelo carinho, apoio e compreensão.

À Prof^a. Dr^a. Dejanira de Franceschi de Angelis, por ter me convencido a iniciar meus estudos de Mestrado.

Aos amigos Juverlandi, Marcelo, Regina, Ingrid, Márcia, Adlane, Ricardo "*Little Richard*", Pedro, Eduardo, Maria, Cidinha, Gisa e Moraes, pelo companherismo durante todo esse caminho.

À meus irmãos Jean, Marcos, Neil e Paulo, pelo apoio.

Aos funcionários do Departamento, em especial às Meninas da

Secretaria.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) pela concessão de bolsa de Mestrado como também à Universidade de Campinas (UNICAMP) pela bolsa de incentivo acadêmico.

FICHA BIBLIOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

OL4i

Oliveira, Alfredo Luis Zangarini Grisi de
Interação gênica e produção de glicoamilase
em híbridos interespecíficos de *Aspergillus ni-*
ger e *Aspergillus awamori* / Alfredo Luis Zanga-
rini Grisi de Oliveira. -- Campinas, SP : [s.n.],
1991.

Orientador : Renato Bonatelli Jr.
. Dissertação (Mestrado) - Universidade Esta-
dual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Exo-1,4-alfa-glicosidase. 2. Protoplastos
3. *Aspergillus niger* I. Bonatelli Júnior, Re-
nato II. Universidade Estadual de Campinas, Ins-
tituto de Biologia. III. Título.

20. CDD- 574.192 483
- 574.873
- 589.23

Índice para catálogo sistemático:

1. Exo-1,4-alfa-glicosidase 574.192 483
2. Protoplastos 574.873
3. *Aspergillus* 589.23

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1 Os fungos <i>A. niger</i> e <i>A. awamori</i>	3
2.2 A enzima glicoamilase	5
2.3 Fusão de protoplastos	11
3. Material e métodos	17
3.1 Materiais	17
3.1.1 Linhagens utilizadas	17
3.1.1.1 Linhagens utilizadas para cruzamentos interespecíficos	17
3.1.1.2 Linhagens utilizadas nos teste de detecção de enzimas	
extracelulares	18
3.1.1.3 Descrição das mutações envolvidas	18
3.1.1.4 Híbridos sintetizados	19
3.1.2 Meios de cultura utilizados	20
3.1.2.1 Meio mínimo (MMD) (PONTECORVO <u>et alii</u> , 1953b)	20
3.1.2.2 Meio mínimo duas vezes forte	20
3.1.2.3 Meio completo (MC) (PONTECORVO <u>et alii</u> , 1953b,	
modificado de acordo com AZEVEDO e COSTA, 1973)	20
3.1.2.4 Meio completo duas vezes forte	21
3.1.2.5 Meio para produção de micélio (MCS) (HAMLYN <u>et alii</u> ,	
1981)	21

3.1.2.6 Meio de fermentação (MAC) (BONATELLI JR. <u>et alii</u> , 1984)	21
3.1.2.7 Meio para regeneração de protoplastos	22
3.1.2.8 Meio mínimo com amido (MMA)	22
3.1.2.9 Meio mnimo com Skim Milk (MSK) (COHEN, 1972)	22
3.1.3 Soluções utilizadas	23
3.1.3.1 Solução de vitaminas	23
3.1.3.2 Solução estoque de aminoácidos e vitaminas	23
3.1.3.3 Solução de Tween	24
3.1.3.4 Solução salina	24
3.1.3.5 Tampão fosfato 0,2M, pH 5,8	24
3.1.3.6 Solução de benlate em água	24
3.1.3.7 Solução de lisol 10%	25
3.1.3.8 Solução de amido 1% em tampão citrato 0,1M - pH 4,0 ..	25
3.1.3.9 Solução de KCl 1,2M	25
3.1.3.10 Solução de KCl 0,6M	25
3.1.3.11 Solução de PEG 30%	26
3.1.3.12 Solução de lugol (BÜCHERL, 1962)	26
3.2 Métodos	26
3.2.1 Dosagem da enzima glicoamilase	26
3.2.2 Fusão de protoplastos	27
3.2.2.1 Obtenção de protoplasto (HAMLYN <u>et alii</u> , 1981)	27
3.2.2.2 Fusão induzida de protoplastos	27
3.2.2.3 Caracterização de colônias crescidas em MM/KCl	29
3.2.3 Testes de formação de halos de hidrólise em placa	30
3.2.4 Teste de formação de halos com enzimas puras	31
3.2.5 Esterilização dos materiais utilizados	31

3.2.6 Temperatura de incubação	31
3.2.7 Análise genética dos setores	32
4. Resultados e Discussão	33
4.1 Obtenção e fusão de protoplastos	33
4.2 Seleção dos produtos de fusão	36
4.2.1 Instabilidade em híbridos interespecíficos	36
4.2.2 Diâmetro de conídios e segregação	41
4.3 Análise mitótica dos híbridos interespecíficos	43
4.3.1 O híbrido 08//lap 61	43
4.3.2 Os híbridos M_2P //SV-24	45
4.3.2.1 M_2P //SV-24 (A)	45
4.3.2.2 M_2P //SV-24 (B)	48
4.3.3 M_2P //pabA ₁ nicA ₁ olvA ₁	50
4.3.4 Os híbridos 02//lap 61	52
4.3.4.1 02//lap 61 (A)	52
4.3.4.2 02//lap 61 (B)	54
4.3.5 Considerações finais sobre a análise genética dos híbridos	56
4.4 Produção de glicoamilase	62
4.4.1 Produção de enzima nos híbridos	62
4.4.2 produção de enzima pelos setores	66
4.5 Teste de formação de halos de hidrólise	80
5. Conclusões	88

6. Abstract	91
7. Bibliografia	93
8. Apêndice	109

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - Resultados referentes à viabilidade das linhagens, frequências de fusão e regeneração nos cruzamentos realizados	34
TABELA 2 - Diâmetro de conídios ($\emptyset$), desvio padrão (σ_{n-1}) e covariância (CV %) das linhagens e híbridos, incluindo as relações híbrido/parental	42
TABELA 3 - Número de setores encontrados para cada combinação de marcas no híbrido 08//lap 61	44
TABELA 4 - Número de setores encontrados para cada combinação de marcas no híbrido M_2P //SV-24(A)	47
TABELA 5 - Número de setores encontrados para cada combinação de marcas no híbrido M_2P //SV-24(B)	49
TABELA 6 - Número de setores encontrados para cada combinação de marcas no híbrido M_2P //pab A_1 nic A_1 olva A_9	51
TABELA 7 - Número de setores encontrados para cada combinação de marcas no híbrido 02//lap 61(A)	53
TABELA 8 - Número de setores encontrados para cada combinação de	

marcas no híbrido 02//lap 61(B)	55
---------------------------------------	----

TABELA 9 - Número (n) e porcentagem de setores por classe obtidos, provenientes dos híbridos $M_2P//SV-24(A)$, $M_2P//SV-24(B)$ e $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_1$	57
---	----

TABELA 10 - Número de setores (ND) por classe, provenientes dos híbridos 08//lap 61 (H1), 02//lap 61(A)(H2) e 02//lap 61(B)(H3) ..	60
--	----

TABELA 11 - Comparação, através do teste de Tukey, das médias de produção (U GA/ml) dos híbridos interespecíficos e suas respectivas linhagens parentais	63
--	----

TABELA 12 - Comparação, através do teste de Tukey, das médias de produção (U GA/ml) dos híbridos e algumas linhagens parentais, quando cultivadas em MAC, com e sem suplementação com os requisitos nutricionais	65
--	----

TABELA 13 - Relação dos marcadores auxotróficos e morfológicos, juntamente de suas respectivas médias de produção de glicoamilase (U GA/ml), desvio padrão (σ_{n-1}) e covariância (CV), provenientes dos setores recuperados do híbrido 08//lap 61. n - número de setores que apresentavam o marcador	67
---	----

TABELA 14 - Relação dos marcadores auxotróficos e morfológicos, juntamente de suas respectivas médias de produção de glicoamilase (U GA/ml), desvio padrão (σ_{n-1}) e covariância (CV), provenientes	
--	--

dos setores recuperados do híbrido $M_2P//SV-24(A)$. n - número de setores que apresentavam o marcador 68

TABELA 15 - Relação dos marcadores auxotróficos e morfológicos, juntamente de suas respectivas médias de produção de glicoamilase (U GA/ml), desvio padrão (σ_{n-1}) e covariância (CV), provenientes dos setores recuperados do híbrido $M_2P//SV-24(B)$. n - número de setores que apresentavam o marcador 69

TABELA 16 - Relação dos marcadores auxotróficos e morfológicos, juntamente de suas respectivas médias de produção de glicoamilase (U GA/ml), desvio padrão (σ_{n-1}) e covariância (CV), provenientes dos setores recuperados do híbrido $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_9$. n - número de setores que apresentavam o marcador 70

TABELA 17 - Relação dos marcadores auxotróficos e morfológicos, juntamente de suas respectivas médias de produção de glicoamilase (U GA/ml), desvio padrão (σ_{n-1}) e covariância (CV), provenientes dos setores recuperados do híbrido 02//lap61 (B). n - número de setores que apresentavam o marcador 71

TABELA 18 - Média de produção de glicoamilase e desvio padrão das classes de setores provenientes dos híbridos $M_2P//SV-24(A)(H1)$, $M_2P//SV-24(B)(H2)$ e $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_9(H3)$ 72

TABELA 19 - Média de produção de glicoamilase (U GA/ml) e desvio padrão (σ_{n-1}) das classes de setores provenientes dos híbridos

08//lap 61 e 02//lap 61(B)	73
----------------------------------	----

TABELA 20 - Relação entre diâmetro do halo de hidrólise / diâmetro do halo da colônia em MMA, com (c/TX) e sem (s/TX) Triton - X100, quando as linhagens foram cultivadas à 30°C e, posteriormente, transferidos para 4°C	81
---	----

TABELA 21 - Relação entre diâmetro do halo de hidrólise / diâmetro do halo da colônia em MSK, com (c/TX) e sem (s/TX) Triton - X100, quando as linhagens foram cultivadas à 30°C e, posteriormente, transferidos para 4°C	82
---	----

TABELA 22 - Relação entre diâmetro do halo de hidrólise / diâmetro da colônia, em linhagens crescidas em MSK e MSK sem nitrogênio (MSKSN) após crescimento à 30°C por 48 hs e posterior estocagem à 4°C	84
---	----

TABELA 23 - Formação de halos de hidrólise em MMA por soluções puras das enzimas glicoamilase (G.A.) e α -amilase (Amil.)	86
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema provável da origem dos tipos morfológicos observados	40
FIGURA 2 - Distribuição da produção de glicoamilase dos setores e linhagens parentais do híbrido $M_2P//SV-24(A)$	75
FIGURA 3 - Distribuição da produção de glicoamilase dos setores e linhagens parentais do híbrido $M_2P//SV-24(B)$	76
FIGURA 4 - Distribuição da produção de glicoamilase dos setores e linhagens parentais do híbrido $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_3$ e das linhagens controle, $PF//NO$ ($P//N$) e NRRL 3112 (NR)	77
FIGURA 5 - Distribuição da produção de glicoamilase dos setores e linhagens parentais do híbrido $O2//lap 61(A)$	78
FIGURA 6 - Distribuição da produção de glicoamilase dos setores e linhagens parentais do híbrido $O8//lap 61$	79

ÍNDICE DO APÊNDICE

TABELA A1 - Análise das marcas auxotróficas e morfológicas, e produção de, glicoamilase pelos setores do híbrido 08//lap 61 ... 110

TABELA A2 - Análise das marcas auxotróficas e morfológicas, e produção de, glicoamilase pelos setores do híbrido 08//lap 61 ... 111

TABELA A3 - Análise das marcas auxotróficas e morfológicas, e produção de, glicoamilase pelos setores do híbrido M_2P //SV-24(A).. 112

TABELA A4 - Análise das marcas auxotróficas e morfológicas, e produção de, glicoamilase pelos setores do híbrido M_2P //SV-24(A).. 113

TABELA A5 - Análise das marcas auxotróficas e morfológicas, e produção de, glicoamilase pelos setores do híbrido M_2P //SV-24(B).. 114

TABELA A6 - Análise das marcas auxotróficas e morfológicas, e produção de, glicoamilase pelos setores do híbrido M_2P //SV-24(B).. 115

TABELA A7 - Análise das marcas auxotróficas e morfológicas, e produção de, glicoamilase pelos setores do híbrido M_2P //pab₁nic₁olv₃ 116

TABELA A8 - Análise das marcas auxotróficas e morfológicas, e produção de, glicoamilase pelos setores do híbrido

M ₂ P//pabA ₁ nicA ₁ olvA ₃	117
TABELA A9 - Análise das marcas auxotróficas e morfológicas, e produção de, glicoamilase pelos setores do híbrido 02//lap 61(A)..	118
TABELA A10 - Análise das marcas auxotróficas e morfológicas, e produção de, glicoamilase pelos setores do híbrido 02//lap 61(A)..	119
TABELA A11 - Análise das marcas auxotróficas e morfológicas, e produção de, glicoamilase pelos setores do híbrido 02//lap 61(B)..	120
TABELA A12 - Análise das marcas auxotróficas e morfológicas, e produção de, glicoamilase pelos setores do híbrido 02//lap 61(B)..	121
TABELA A13 - Produção de glicoamilase (U GA/ml) das linhagens parentais e híbridos	122
TABELA A14 - Análise de variância das médias de produção de glicoamilase das linhagens na TABELA A13	123
TABELA A15 - Produção de glicoamilase (U GA/ml) de linhagens parentais e híbridos quando cultivados em MAC com e sem suplementação	124
TABELA A16 - Análise de variância das médias de glicoamilase das linhagens na TABELA A15	125

1. INTRODUÇÃO

O estudo de híbridos interespecíficos, obtidos através de fusão de protoplastos, em fungos filamentosos, vem fornecendo informações úteis, principalmente porque é uma ferramenta de grande valia para o geneticista, que pode combinar caracteres, distantes filogeneticamente, em um único núcleo e, assim, obter tanto genótipos desejados quanto novas combinações que podem se constituir em vias metabólicas, que antes não existiam nas espécies. Esses híbridos podem permitir o estudo da interação gênica de dois patrimônios genéticos diferentes, o que pode contribuir para o nosso entendimento da regulação da expressão gênica e, até mesmo, do próprio conceito biológico de espécie. A análise genética de tais híbridos permite estudar a homologia entre grupos de ligação comparando-se os resultados com aqueles obtidos para cruzamentos intraespecíficos (PEBERDY, 1989).

Paralelamente, temos o fato de que a produção de enzimas extracelulares é uma prática crescente em todo o mundo, onde processos químicos de conversão de substrato são substituídos por processos enzimáticos. Tais processos são menos drásticos e, na maioria das vezes, recicláveis devido a utilização de enzimas imobilizadas (PRZYBYT e SUGIER, 1988a,b).

Dentro das enzimas extracelulares utilizadas encontra-se a glicoamilase (E.C. 3.2.1.3) que ocupa a segunda posição em importância e em quantidade produzida por ano (SCHMIDELL e FACCIOTI, 1984). A

importância pode ser explicada tanto pela sua utilização no bioprocessamento de amido com a obtenção de xaropes de alto teor de glicose, como pelo fato da glicoamilase atacar e hidrolizar grânulos de amido cru, o que representa uma economia de energia, pois pode-se proceder tal hidrólise sem o estágio de alta temperatura, requerida pelo processo de gelatinização (PRIEST, 1984).

A fonte biológica dessa enzima, atualmente, constitui-se principalmente de fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* (MONTENECOURT e EVELEIGH, 1985). Baseados nos fatos descritos acima, pesquisadores vêm estudando a glicoamilase em seus aspectos genéticos, bioquímicos e moleculares.

Além disso, o entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos com síntese, secreção e consequente acúmulo de enzimas extracelulares em híbridos interespecíficos, especialmente entre *A. niger* e *A. awamori*, se torna de vital importância para que se possa aumentar a eficiência de sistemas de expressão de proteínas heterólogas de interesse industrial (van BRUNT, 1986; WARD et alii, 1990).

Baseados nos fatos acima destacados o presente trabalho tem, por objetivo, estudar sob o ponto de vista genético híbridos interespecíficos de *Aspergillus niger* e *A. awamori* tanto no que diz respeito a complementação dos marcadores auxotróficos e morfológicos quanto na interação dos genes de baixa produção (lgp^-) de *A. niger* e os genes de produção normal (lgp^+) de *A. awamori* nos híbridos e nos setores recuperados dos cruzamentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OS FUNGOS *Aspergillus niger* Van Tieghem, 1867 E *Aspergillus awamori* Nakasawa, 1915.

Os fungos *A. niger* e *A. awamori* são considerados por *RAPER* e *FENNELL* (1965) como pertencentes ao grupo *niger*, apresentam ampla distribuição geográfica e ocorrem numa grande variedade de substratos. Possuem grande valor econômico, sendo largamente utilizados em processos industriais.

Colônias de *A. niger* crescem restritamente em meio de Czapek, atingindo um diâmetro de 2,5 a 3,0 cm em 10 dias de incubação à temperatura ambiente (24 a 26°C). As colônias são compactas, apresentando a coloração do micélio basal variando entre branco e amarelado. Os conidióforos são bisseriados, com seu comprimento variando, geralmente, entre 1,5 e 3,0 mm. Conídios são tipicamente pretos ou carbonários apesar de, algumas vezes, apresentarem uma coloração marrom escuro. No que diz respeito a suas formas, eles são geralmente globos na maturidade, com um diâmetro variando entre 4,0 e 5,0 μm . As paredes espessas são espessas e irregularmente enrugadas, apresentando finilações descontínuas.

Colônias de *A. awamori*, por sua vez, apresentam um crescimento rápido quando crescidas em meio de Czapek, atingindo um diâmetro de 5 a 7 cm quando cultivados à temperatura ambiente (24 a 26°C). Colônias, nessas condições, apresentam-se ligeiramente sulcadas radialmente,

com uma coloração do micélio basal usualmente branco mas, algumas vezes, amarelado. Os conidióforos são bisseriados, com um comprimento que varia de 200 a 300 μm até 2 a 3 mm, dependendo da linhagem. Conídios apresentam uma coloração inicialmente verde-amarronzado escuro tornando-se, posteriormente, marrom-chocolate escuro. Quanto a sua forma, são globosos ou sub-globosos, apresentando um diâmetro de 3,5 à 5,0 μm , algumas vezes atingindo até 6,0 μm . As equinulações são irregulares.

O *A. niger* e o *A. awamori* são classificados como pertencentes a Sub-Divisão Deuteromycota, onde encontram-se espécies de fungos que não tem o estágio sexual descrito, e que se supõe reproduzirem-se assexuadamente (BOLD, 1976).

Como alternativa de recombinação o ciclo parassexual foi descrito em *A. niger* (PONTECORVO et alii, 1953) e em *A. awamori* (VIALTA e BONATELLI JR, 1990).

Quando se o ciclo parassexual e vários marcadores em *A. niger*, foi possível determinar a existência de pelo menos oito grupos de recombinação (BOS et alii, 1988,1989; DEBETS et alii, 1990a), os quais parecem ter homologia com os de *A. awamori* (VIALTA e BONATELLI JR., 1990). O genoma de *A. niger* foi recentemente estimado como tendo um tamanho de 35,5 - 38,5 Mb, sendo que o tamanho dos cromossomos varia entre 3,5 - 6,6 Mb (DEBETS et alii, 1990b).

2.2 A ENZIMA GLICOAMILASE

A enzima glicoamilase (1,4- α -D-Glucan-Glucohidrolase - E.C. 3.2.1.3) é uma exocarboidrase, capaz de hidrolizar consecutivamente ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 originando glicose a partir das extremidades não redutoras do amido (SAHA e ZEIKUS, 1989). Essa enzima é capaz de converter totalmente a maltose, amilose e amilopectina em glicose (DIXON e WEBB, 1962). A glicoamilase é também denominada amiloglucosidase, gluc-amilase e γ -amilase (SAHA e ZEIKUS, 1989).

A glicoamilase é uma enzima produzida por vários microrganismos, tais como: *Candida tsukubaensis* (DE MOT et. al., 1985); *Corticium rolfsii* (TAKAO et. al., 1986); *Cephalosporidium chartiola* (KRZECZOWSKA e URBANEK, 1975); *Rhizopus javanicus* (WATANABE e FUKINBARA, 1973); *Tricosporum pullulans* (DE MOT e VERACHTERT, 1986); *Neurospora crassa* (MURAYAMA e ISHIKAWA, 1973); *Mucor rouxianus* (TSUBOI et alii, 1974); *Rhizopus niveus* (TAKEGAWA et alii, 1989); *Saccharomyces diastolicus* (PRETORIUS e MAMUR, 1988); *Aspergillus awamori* (HAYASHIDA, 1975); *A. niger* (ONO et alii, 1988), entre outros. A nível industrial destacam-se espécies dos gêneros *Rhizopus* e *Aspergillus* (SAHA e ZEIKUS, 1989).

UEDA (1957) observou que a glicoamilase isolada do black-koji consistia em duas formas. Posteriormente foi observado que *Aspergillus oryzae* possuía quatro formas de glicoamilase e que tais formas possuíam idênticas propriedades químicas e fisicoquímicas, exceto diferenças mínimas em suas propriedades eletroforéticas, coeficiente

de sedimentação e em pH de solubilidade (MORITA et alii, 1966; OHGA et alii, 1966). MIAH e UEDA (1977 a,b) observaram a existência de três formas de glicoamilase (I, II e III) em *A. oryzae*. Entretanto, RAZZAQUE e UEDA (1978) descreveram a linhagem RIB-40 de *A. oryzae* como também tendo três formas de glicoamilase sendo, entretanto, sua produção duas vezes maior que a linhagem de laboratório utilizada anteriormente por MIAH e UEDA (op. cit.). SAHA et alii (1979) além de confirmarem a existência de três formas de glicoamilase nesse fungo, relataram que a proporção dessas enzimas era de 5(I):3(II):1(III).

TAKAHASHI et alii (1978) relataram três formas de glicoamilase em *Rhizopus* sp mostrando existir uma similaridade muito grande entre suas propriedades enzimáticas.

O *A. niger* tem um sistema de glicoamilase composto geralmente por duas formas, a glicoamilase I (GI) e II (GII) (FLEMING e STONE, 1965; LINEBACK, 1968; FREEDBERG et alii, 1975; FINCH e LEONARD, 1978; RAMASESH et alii, 1982), as quais, segundo MANJUNATH e RAO (1980), possuem atividades enzimáticas similares e são imunologicamente indistinguíveis. Entretanto, apesar de ambas as formas de glicoamilase serem capazes de adsorver e digerir amido solúvel, apenas a glicoamilase I é capaz de fazer isso com o amido cru (SVENSON et alii, 1986).

MEDDA et alii (1982) caracterizaram do ponto de vista bioquímico a glicoamilase isolada de um *Aspergillus* preto. Tal enzima demonstrou possuir seu ponto isoelétrico ao redor do pH 3,4 e, o pH e temperatura ótimos para digestão do amido, da ordem de 4,5 e 60°C,

respectivamente. Os autores demonstraram ainda que a enzima se adsorvia quase que completamente em amido cru e era ativa sobre tal substrato. A enzima possui quase que 7.6% de seu peso em carboidratos.

UEDA e SAHA (1980), trabalhando com preparações comerciais de glicoamilase de um *Aspergillus* preto, observaram que a enzima era inibida quando em altas concentrações e que, tal inibição, era verdadeira apenas para a GI. Quando em baixas concentrações, a enzima demonstrou ser bastante efetiva tanto no que diz respeito à atividade catalítica quanto à capacidade de adsorção em amido cru. Esse fenômeno foi posteriormente caracterizado pela presença de um fator que era capaz de adsorver-se em amido cru bloqueando, assim, a ação da glicoamilase (SAHA e UEDA, 1983). Um fator de inibição foi também isolado a partir do *A. niger* 19, o qual se mostrou eficaz em bloquear a ação da GI de um *Aspergillus* preto, da glicoamilase de *Rhizopus niveus* e α -amilase bacteriana e fúngica através de sua interação com os grânulos de amido (TOWPRAYOON et alii, 1988).

MATSUMURA et alii (1988), trabalhando com preparações comerciais de glicoamilase provenientes de *Rhizopus niveus*, constatou que a adsorção é um fenômeno temperatura dependente e que a enzima era suscetível a inibição pela glicose (inibição pelo produto) em dois sítios diferentes. A inibição pelo produto era mais pronunciada em baixas temperaturas.

Ainda no que diz respeito a interação enzima substrato, HOSCHKE et alii (1980), trabalharam com várias amilases e entre elas a

glicoamilase de *A. niger*. Os autores relataram que os grupamentos tirosina ,quando acetilados, resultam num decréscimo de 87% na capacidade de ligação com o substrato e apenas um decréscimo de 10% na atividade catalítica, sugerindo então que tais grupamentos sejam os principais responsáveis pela capacidade de adsorção.

A glicoamilase de *A. niger* teve sua sequência de aminoácidos determinada por *SVENSON et alii* (1982). *BOEL et alii* (1984a,b), observaram que nessa espécie existe apenas uma cópia do gene e que a tradução em *in vitro* gerava duas formas moleculares, supostamente GI e GII, as quais deveriam surgir desta única cópia genômica. Comparando-se a sequência genômica com a obtida por cDNA, constatou-se a existência de pelo menos cinco introns e, os autores propuseram que o processamento diferencial do maior desses introns, com 169 pb, era responsável pela existência da forma GII. Posteriormente, *SVENSON et alii* (1986), comparando a sequência de aminoácidos da forma GII com a sequência de aminoácido da forma GI concluíram que o processamento diferencial do mRNA proposto por *BOEL et alii* (op. cit.) não era possível sugerindo, então, uma proteólise pós-tradução como provável mecanismo de origem do GII.

Segundo *WHITE et alii* (1984), o gene da glicoamilase de *A. awamori* possui uma suposta sequência sinal de 24 amino ácidos e quatro pequenos introns com 60 pb cada um, sendo que as sequências flangeadoras destes mostram uma considerável homologia com sequências consenso para introns de eucariotos.

A possível existência de dois mRNAs, como descrito por *BOEL*

et alii (op. cit.) para *A. niger*, foi também constatado para *A. awamori* (BHELLA e ALTOSAAR, 1987). Eles observaram que havia apenas uma cópia do gene para glicoamilase no genoma, que, a tradução *in vitro* gerava duas formas, GI e GII. Também para essa espécie foi levantada a hipótese de uma possível proteólise pós-tradução (HAYASHIDA, 1988).

MEDDA et alii (1981) observaram que a glicoamilase de um *Aspergillus* preto se adsorvia completamente em amido cru quando em seu ponto isoelétrico. Tal enzima (PM 76.000), após tratamento com protease alcalina, gerou duas formas, uma maior (PM 85.000) que não se adsorvia em amido e tinha pouca atividade catalítica e uma forma menor (PM 11.000) que reteve tanto a capacidade adsortiva quanto catalítica.

Resultados semelhantes foram obtidos por YOSHINO e HAYASHIDA (1978) que submeteram a glicoamilase de *A. awamori* var *Kawashi* a diversos tratamentos enzimáticos recuperando diferentes formas proteicas com diferentes atividades enzimáticas, entre elas formas semelhantes às formas GI e GII nativas da espécie.

Com tudo isso, pode-se notar que o mecanismo que gera essas duas formas em *A. niger* e *A. awamori*, como também em outras espécies é controvertido. Existem relatos de que até mesmo a composição do meio de cultivo tem sua influência sobre o tipo de glicoamilase produzida por *A. awamori* var *Kawashi* (HAYASHIDA, 1975).

Além de todas essas variáveis, tem-se ainda evidências de que o mecanismo de formação de ambos os tipos seja característico da

espécie em questão. PUNT et alii (1991) introduziram, via transformação, em *A. nidulans* e em uma linhagem de *A. niger* com o gene estrutural da glicoamilase deletado, o plasmídeo *pGLA6* carreando o gene estrutural da glicoamilase (*glaA*) de *A. niger* sob o controle do promotor do gene *gpdA* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e observaram que, em *A. nidulans*, apenas a forma GI foi detectada, enquanto que, em *A. niger*, as formas GI e GII ocorriam como na linhagem parental.

No que diz respeito a regulação dessa enzima, sabe-se que em *A. awamori*, esta é principalmente a nível transcricional (NUMBERG et alii, 1984). BHELLA e ALTOSAAR (1988) constataram repressão catabólica pela glicose, que pode ser mediada por AMP cíclico (cAMP).

Os dados obtidos por FOWLER et alii (1990) sugerem que em *A. niger* também ocorre regulação ao nível de transcrição. Porém, ao contrário de *A. awamori*, a glicose parece funcionar como um indutor pois não reduz significativamente a produção ao ser fornecida juntamente com amido ou maltose e, consegue reverter o efeito repressor observado quando xilose é fornecida como fonte de carbono. O nível da enzima observado na presença de glicose é, no entanto, 34 à 37% do observado na presença de amido ou maltose, o que sugere que a indução seria menos efetiva.

GHOSH et alii (1990), observaram que em *A. terreus* cepa 4, a glicoamilase sofre repressão catabólica pela glicose. A linhagem, quando cultivada em amido, teve a produção de enzima diminuída na medida que glicose foi sendo adicionada ao meio de cultivo. Por outro

lado, nessa espécie, a glicoamilase parece ser induzida por maltose e outros carboidratos contendo unidades de maltose, de modo semelhante ao observado para *A. niger*.

DOWHANICK *et alii* (1990), estudaram a expressão e regulação de glicoamilase pela levedura *Schwanniomyces castellii*. A partir de seus resultados, os autores concluíram que a enzima nessa espécie também é induzida por maltose e amido e é regulada ao nível de transcrição. A transcrição não ocorria quando células são expostas a glicose ou 2-deoxiglicose sendo que, nessas condições, haveria também degradação da enzima tanto intracelularmente quanto extracelularmente. Na presença de açúcares como celobiose, galactose, lactose e xilose, ou na falta de qualquer carboidrato, somente o nível basal da pré-glicoamilase é detectado.

2.3 FUSÃO DE PROTOPLASTOS

Os primeiros relatos sobre a técnica de obtenção de protoplastos foram feitos por EDDY e WILLIAMSON (1957,1959) e BACHMANN e BONNER (1959). Os protoplastos têm sido utilizados para facilitar a manipulação genética, permitindo realizar cruzamentos que dificilmente ocorreriam utilizando as técnicas convencionais (PEBERDY, 1979, 1980).

A obtenção de protoplastos foi relatada, desde então, em ensaios usando vários complexos líticos diferentes. Entre eles temos a utilização de suco gástrico de *Helix pomatia* (EDDY e WILLIAMSON, 1957, 1959); enzimas líticas de *Streptomyces satsumaensis* (SIETSMA *et alii*,

1967) e enzimas líticas de *Trichoderma viride* (DE VRIES e WESSELS, 1973), entre outros.

Após a obtenção dos protoplastos, parte-se para a fase de fusão. LOPEZ-BELMONTE *et alii* (1966) descreveram pela primeira vez a fusão espontânea de protoplastos em *Fusarium culmorum*.

Várias tentativas foram feitas posteriormente utilizando-se de uma grande variedade de agentes fusogênicos (FERENCZY *et alii*, 1974; BINDING, 1974). Entretanto, passo importante foi dado por CONSTABEL e KAO (1974), quando introduziram o polietilenoglicol (PEG) como agente fusogênico, ao trabalharem com protoplastos de plantas.

Estudos foram feitos posteriormente no sentido de se estabelecer algumas variáveis relacionadas com a utilização do PEG em fungos (ANNÉ e PEBERDY, 1975), culminando em uma metodologia que pode ser utilizada com sucesso em várias espécies de fungos filamentosos (ANNÉ e PEBERDY, 1976) e , inclusive, no cruzamento entre linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com o mesmo tipo de reação sexual (SVOBODA, 1978).

A utilização do PEG como agente fusogênico permitiu a recuperação de produtos de fusão entre *A. nidulans* e *A. rugulosus* (KEVEI e PEBERDY, 1977). Do produto de fusão heterocariótico foi recuperado o híbrido interespecífico com conídios marrons. Segregantes foram obtidos via haploidização em Benlate e a análise genética de tais setores sugeriu um alto grau de homologia entre as duas espécies.

FERENCZY et alii (1977), relataram a obtenção de produtos de fusão, posteriormente caracterizados como híbridos interespecíficos entre *A. nidulans* e *A. fumigatus*. O heterocário recuperado após a fusão possuía um crescimento amorfo com conidiação pouco frequente. Citologicamente, as hifas apresentavam-se com deformações. Apesar de conídios germinarem em meio mínimo, os autores sugerem que, nesse caso, devido a incompatibilidade entre as espécies, a complementação seja consequência de uma aneuploidia.

BRADSHAW e PEBERDY (1984) obtiveram produtos de fusão entre *A. nidulans*, produtor de penicilina, e *A. rugulosus*, não produtor do antibiótico. Quatro híbridos foram sintetizados utilizando-se diferentes linhagens dessas espécies e, os segregantes, foram induzidos através de haploidização com Benlate. Aproximadamente 50% dos segregantes de cada cruzamento produziram penicilina, indicando segregação de um ou diversos genes ligados essenciais para a produção do antibiótico. A análise da produção dos setores de dois dos híbridos revelou uma dispersão relativamente grande indicando a existência de um sistema poligênico controlando a produção do antibiótico. Baseado nesses resultados, os autores sugerem que *A. rugulosus* é deficiente em um ou mais genes ligados, os quais são essenciais para a produção de penicilina e que, apesar disso, alguns genes não funcionais de *A. rugulosus*, quando combinados com outros de *A. nidulans*, podem resultar em um fenótipo melhorado, visto que, em um dos híbridos, foi possível recuperar segregantes com produção significativamente superior ao das linhagens parentais.

FUNGARO (1984) recuperou, em baixa frequência, produtos de fusão entre *A. niger* e *A. awamori*. O autor observou que o agente fusogênico, PEG, apresentava uma toxicidade preferencialmente contra o *A. niger* e atribuíram a baixa frequência de fusão observada a essa toxicidade.

KIRIMURA et. al. (1986), obtiveram diplóides entre linhagens de *A. niger* através de fusão de protoplastos induzida por PEG e posterior tratamento com *d*-cânfora. O diplóide obtido possuía produção de ácido cítrico intermediária em relação aos parentais, tanto quando cultivado em meio sólido quanto em meio líquido sob agitação. Posteriormente, tal diplóide foi submetido a haploidização com Benlate (KIRIMURA et alii, 1988c), onde observou-se que fatores envolvidos com a produção de ácido em cultivo sólido pareciam segregar independentemente daqueles envolvidos com a produção em meio líquido sob agitação.

VIALTA (1987), após tentar exaustivamente o cruzamento entre linhagens de *A. niger* e *A. awamori* através do ciclo parassexual, conseguiu, através de fusão de protoplastos induzida com PEG, obter produtos de fusão heterocaróticos. De um destes, surgiu um setor prototrófico preto crescendo vigorosamente em meio mínimo que, posteriormente, foi caracterizado através de diâmetro de conídios, dosagem de DNA e segregação em Benlate, como sendo o híbrido interespecífico entre as duas espécies. Tal híbrido apresentou complementação entre marcadores auxotróficos e morfológicos envolvidos, segregação desses mesmos marcadores nas combinações esperadas, demonstrando uma possível homologia entre os cromossomos

das duas espécies. O halo de hidrólise de amido do híbrido foi intermediário entre os encontrados para as linhagens parentais e, a produção de enzima do híbrido, era similar à apresentada pela linhagem da parental de *A. niger*.

Em experimento posterior, *KIRIMURA et alii*(1988b) recuperaram 50 diplóides provenientes de diversas fusões entre as linhagens YANG N^o 2 e WU-2223L. Tais diplóides apresentaram uma grande variação em seu índice de produção de ácido cítrico quando cultivados tanto em meio sólido (40 - 100 mg/ml) quanto em meio líquido sob agitação (10 - 50 mg/ml) sendo que, alguns desses diplóides, ultrapassavam em cerca de 50% a produção das linhagens parentais.

OGAWA (1989) utilizou a técnica de fusão induzida de protoplastos com PEG para recuperar produtos de fusão entre *A. niger* e *A. usamii* mut *shirousamii*. Segregantes prototróficos haplóides, recuperados do híbrido através de habloidização com Benlate, foram considerados recombinantes com alta produtividade de amilase e ácido cítrico, inclusive maior que a das parentais. Tais dados demonstram que o Benlate pode gerar recombinantes afetando a produção da enzima e ácido cítrico.

DAS e GHOSH (1989) utilizaram a fusão de protoplastos por PEG para obterem diplóides entre linhagens incompatíveis de *A. niger*. Setores foram obtidos do diplóide através de haploidização com Benlate. Tais setores foram então analisados quanto à produção de glicoamilase, onde observou-se que apresentavam uma média de produção de até 68% maior que a das linhagens parentais.

KIYOHARA et alii (1990) também utilizando-se de técnicas de fusão induzida de protoplastos pro PEG conseguiram obter produtos de fusão entre *A. oryzae* e *Monascus anka*. Foi observada a complementação das auxotrofias a nível de heterocário e, o híbrido foi recuperado após tratamento com luz UV. Este, produziu etanol antes das linhagens parentais porém, a quantidade de amilases, proteases e ácido kojico produzidos era intermediária em relação às parentais.

Seguindo a linha de cruzamento intergenérico por fusão de protoplastos induzida por PEG temos o trabalho de KIRIMURA et alii (1988a), que descreve a obtenção e caracterização de um híbrido entre *A. niger* e *Trichoderma viride*. Dessa fusão, foi possível recuperar dois tipos distintos de fusionantes sendo que, o obtido em menor frequência, (25%), era fenotipicamente semelhante a linhagem parental de *A. niger* e o de maior frequência (75%) de morfologia híbrida entre as duas espécies.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS.

3.1.1 LINHAGENS UTILIZADAS

3.1.1.1 Linhagens utilizadas para cruzamentos interespecíficos.

Foram utilizadas, nos cruzamentos interespecíficos, as linhagens de *A. niger* e *A. awamori* descritas abaixo:

A. awamori :

08 : $argA_1$ $proA_1$ $morA_1$ $cspA_1$ $greA_1$

M₂P : $leuA_1$ $proA_1$ $morA_1$ $cspA_1$ $bwnA_1$

02 : $argB_1$ $proA_1$ $morA_1$ $cspA_1$ $greA_1$

As linhagens de *A. awamori* foram descritas por VIALTA (1987).

A. niger :

lap 61 : $pabA_1$ $lgsA_{61}$ $fwnA_1$ (VALENT, 1985)

SV-24 : $pabA_1$ $nicA_1$ $lgsB_{72}$ $olvA_2$ (MASIERO, dados não publicados)

3.1.1.2 Linhagens utilizadas nos testes de detecção de enzimas extracelulares.

A. awamori :

NRRL 3112 : Linhagem selvagem, parental dos mutantes utilizados. Apresenta, quando cultivada em meio completo, conidióforos baixos.

A. niger :

lap 05 : $pabA_1 nic_1 lgpC_{05}$ (CALIL, 1988).

lap 73 : $pabA_1 nicA_1 snuA_1 lgpB_{73}$ (VALENT, 1985).

pab fwn : $pabA_1 fwnA_1$ (BONATELLI JR. et alii, 1983).

nic olv : $nicA_1 olvA_9$ (BONATELLI JR. et alii, 1983).

$pabA_1 nicA_1 olvA_9$: $pabA_1 nicA_1 olvA_9$ (VALENT, 1985)

snu^- : $pabA_1 nicA_1 snuA_1 olvA_9$ (MASIERO, dados não publicados).

3.1.1.3 Descrição das mutações envolvidas:

$argA_1$ - deficiência para síntese de arginina, responde também para citrulina;

$proA_1$ - deficiência para síntese de prolina;

$leuA_1$ - deficiência para síntese de leucina;

$argB_1$ - deficiência para síntese de arginina;

$pabA_1$ - deficiência para síntese de ácido *p*-aminobenzóico;

$nicA_1$ - deficiência para síntese de ácido nicotínico;

$greA_1$ - conídios com coloração verde;

- bwnA₁* - conídios com coloração marrom;
- olvA₃* - conídios com colorção oliva;
- funA₁* - conídios com coloração marrom;
- morA₁* - colônias com crescimento radial semelhante as com o alelo selvagem e massa micelial menos densa;
- morA₂* - colônias enrrugadas, possuem uma elevação na região central, crescimento radial mais lento e formação de conídios mais tardia. Os conídios dessas colônias possuem coloração mais clara;
- cspA₁* - colônias com conidióforos baixos;
- lgpA₆₁* - confere produção de glicoamilase entre 1 a 2 U GA/ml com crescimento normal em amido;
- lgpB₇₃* - confere produção de glicoamilase entre 3 a 4 U GA/ml com crescimento normal em amido;
- lgpC₀₅* - confere produção de glicoamilase entre 1 a 2 U GA/ml com crescimento tardio em amido;
- snuA₁* - confere produção de glicoamilase ao redor de 0 U GA/ml com crescimento tardio em amido;

3.11.4 Híbridos sintetizados

H.1 : 08//lap 61;

H.2 : 02//lap61;

H.3 : M₂P//SV-24;

Foi utilizado também o híbrido M₂P//pabA₁nicA₁olvA₃ sintetizado por VIALTA (1987).

3.1.2 MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS.

3.1.2.1 MEIO MÍNIMO(MM) (PONTECORVO et alii, 1953b).

Nitrato de Sódio	6,00 g
Cloreto de Potássio	0,52 g
Sulfato de Magnésio + 7 H ₂ O	0,52 g
Fosfato Dihidrogenado de Potássio	1,52 g
Sulfato de Ferro + 7 H ₂ O	traços
Sulfato de Zinco	traços
Glicose	10,00 g
Água Destilada	1000,00 ml

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 4% ou HCl 1N, quando o meio foi necessário sólido, adicionou-se 15 g de agar por litro.

3.1.2.2 MEIO MÍNIMO DUAS VEZES FORTE .

Foi preparado de maneira semelhante ao item 3.1.2.1, onde todos os componentes tiveram sua quantidade dobrada.

3.1.2.3 MEIO COMPLETO (MC) (PONTECORVO et alii,1953b, modificado de acordo com AZEVEDO e COSTA, 1973).

Adicionou-se a um litro de MM :

Peptona	2,0 g
Caseína Hidrolisada	1,5 g

Extrato de Leveduras	0,5 g
Solução de Vitaminas (ítem 3.3.1)	1,0 ml

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 4% ou HCl 1N, quando o meio foi necessário sólido, adicionou-se 15 g de ágar por litro.

3.12.4 MEIO COMPLETO DUAS VEZES FORTE .

Foi preparado de modo semelhante ao ítem 3.1.2.3, onde todos os componentes tiveram suas quantidades dobradas.

3.12.5 MEIO DE PRODUÇÃO DE MICÉLIO (MCS) (HAMLYN et. al., 1981).

Ao meio mínimo acrescentou-se :

Caseína Hidrolisada	2,0 g
Extrato de Levedura	5,0 g

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 4% ou HCl 1N. O meio foi suplementado com as substâncias para as quais as linhagens eram deficientes.

3.12.6 MEIO DE FERMENTAÇÃO (MAC) (BONATELLI JR. et. al., 1984)

Farinha de Raspa Integral de Mandioca	20,0 g
Nitrato de Sódio	1,0 g
Fosfato Dihidrogenado de Potássio	1,0 g
Sulfato de Magnésio	0,5 g

O pH foi ajustado para para 5,5 com NaOH 4% ou HCl 1N. O meio, quando necessário, foi suplementado com as substâncias para as quais as linhagens eram deficientes.

3.1.2.7 MEIO PARA REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS.

Misturou-se , assepticamente iguais volumes de MM ou MC duas vezes forte e KCl 1,2M (item 3.1.3.9). Foi mantido à temperatura de 50 - 60°C até o momento do uso.

3.1.2.8 MEIO MÍNIMO COM AMIDO (MMA).

O MMA, para observação de halo de hidrólise por amilases, foi feito de modo semelhante ao MM (item 3.1.2.1), substituindo-se a glicose por igual concentração de amido solúvel. Quando necessário acrescentou-se Triton X-100 ao meio, concentração final de 0,1% (MMA+TX100). Para as linhagens com deficiências nutricionais o meio foi suplementado com os requisitos nutricionais necessários.

3.1.2.9 MEIO MÍNIMO COM SKIM MILK (MSK) (COHEN, 1972)

O MSK, para observação do halo de hidrólise por proteases, foi preparado de modo semelhante ao MM (item 3.1.2.1), substituindo-se o nitrato de sódio por Skim Milk, concentração final de 1%. Quando necessário acrescentou-se Triton-X100 ao meio, concentração final de 0,1% (MSK+TX100). Para as linhagens com deficiências nutricionais o

meio foi suplementado com os requisitos nutricionais necessários.

3.13 SOLUÇÕES UTILIZADAS

3.13.1 SOLUÇÃO DE VITAMINAS

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

A solução foi esterilizada em vapor fluente e guardada em frasco escuro a 4°C sobre clorofórmio.

3.13.2 SOLUÇÕES ESTOQUE DE AMINOÁCIDOS E VITAMINAS.

Arginina	10,0 mg/ml
Prolina	10,0 mg/ml
Leucina	10,0 mg/ml
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	250,0 µg/ml
Ácido nicotínico	250,0 µg/ml

As soluções foram esterilizadas por autoclavagem e estocadas à 4°C.

3.13.3 SOLUÇÃO DE TWEEN.

Foram adicionados 0,1 ml Tween 80 em 99,9 ml de água destilada. Aliquotas de 2,5 ml dessa solução foram colocadas em tubos de ensaio, autoclavadas e então estocadas à 4°C.

3.13.4 SOLUÇÃO SALINA.

Cloreto de Sódio	8,5 g
Água destilada	1,0 l

Frascos contendo 9 ml dessa solução foram preparados e autoclavados.

3.13.5 TAMPÃO FOSFATO 0,2M PH 5,8.

Solução A - Fosfato Dihidrogenado de Potássio	24,0 g/l
Solução B - Fosfato Hidrogenado de Sódio	71,6 g/l

Foram adicionados 920 ml da solução A em 80 ml da solução B. A solução foi estocada em frasco escuro à 4°C.

3.13.6 SOLUÇÃO DE BENLATE EM ÁGUA.

Foram colocados 60 mg de Benlate (fungicida, metil-1-butil-carbomoil-2-benzimidazole-carbamato) em um frasco escuro previamente esterilizado. Ao Benlate foi acrescentado 1 ml de acetona. Com auxílio de um bastão de vidro, a solução foi homogeneizada e a ela

adicionou-se 99 ml de água destilada esterilizada. A solução foi então agitada e conservada à temperatura ambiente.

3.13.7 SOLUÇÃO DE LISOL 10%.

Foi adicionado 1 ml de lisofórmio a 9ml de água destilada esterilizada. A solução foi estocada a temperatura ambiente.

3.13.8 SOLUÇÃO DE AMIDO 1% EM TAMPÃO CITRATO 0,1M - PH 4,0.

Dissolveu-se 1 g de amido solúvel, à quente, em aproximadamente 40 ml de água destilada. Misturando-se 33 ml de uma solução 0,1M de ácido cítrico em 17 ml da solução 0,1M de citrato de sódio $2 \text{ H}_2\text{O}$; adicionou-se o amido dissolvido e completou-se o volume para 100 ml com água destilada. O pH foi ajustado para 4,0 .

3.13.9 SOLUÇÃO DE KCL 1,2M.

Dissolveu-se 89,47 g de KCl em 500 ml da solução A (item 3.3.6), com agitação e aquecimento. O pH final foi ajustado para 5,8, adicionando-se a solução B. Acertou-se o volume para 1 litro com tampão fosfato pH 5,8 (item 3.1.3.5).

3.13.10 SOLUÇÃO DE KCL 0,6M.

Misturou-se iguais volumes de KCl 1,2M e tampão fosfato pH 5,8 (item 3.1.3.5).

3.13.11 SOLUÇÃO DE PEG 30% .

Solução A: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 14,6 g em 1 litro de água destilada.

Solução B: Glicina - 3,75 g em 1 litro de água destilada.

Foram adicionados 10 ml da solução A em 10 ml da solução B, e o volume completado para 100 ml com água destilada. O pH foi ajustado para 8,0 com NaOH 4% e adicionado PEG 8000 (Sigma) em concentração final de 30%

3.13.12 SOLUÇÃO DE LUGOL (BÜCHERL, 1962)

Iodo metálico	2,0 g
Iodeto de potássio	3,0 g
Álcool etílico 90%	100,0 ml

A solução foi estocada em frasco escuro à temperatura ambiente.

3.2 MÉTODOS.

3.2.1 DOSAGEM DA ENZIMA GLICOAMILASE

As linhagens, cuja produção de glicoamilase era de interesse se determinar, foram inoculadas em MC e crescidas por sete dias. Após isso conídios foram coletados com auxílio de alça de platina, inoculados em meio de fermentação MAC (ítem 3.1.2.6) e incubados por

96hr. Findo esse período, alíquotas foram coletadas e, após devidamente diluídas, 0,5 ml foram incubados com igual volume de solução de amido 1% em tampão citrato 0,05M pH 4,0 a 60°C por 60 minutos.

Essa mistura foi deixada 5 minutos à 100°C para inativação da enzima presente. Açúcares redutores foram dosados pelo método da o-toluidina (Kit BRIOBRÁS e DOLES). Uma unidade de glicoamilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 100 mg de glicose por ml em 60 minutos à 60°C.

3.2.2 FUSÃO DE PROTOPLASTOS

3.2.2.1 OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS (HAMLYN et alii, 1981)

Conídios de colônias crescidas por sete dias em MC foram suspensos em salina (ítem 3.1.3.4), transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250ml com 50ml de MCS e incubados por 18 hr. O micélio obtido foi coletado por filtração e lavado com KCl 1,2M (ítem 3.1.3.9). Dessa biomassa, 250 mg foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 125 ml contendo 5ml de KCl 0,6M (ítem 3.1.3.10) onde adicionou-se 25 mg de NOVOZYM 234 (NOVO Industria do Brasil) e igual quantidade de CELULASE CP (John and Sturge Ltd , Selby, UK). A mistura foi deixada sob agitação (150rpm) por 2 hr à 30°C.

3.2.2.2 FUSÃO INDUZIDA DE PROTOPLASTOS

Após o período de digestão do micélio, a mistura foi primeiro

filtrada em membrana de Nylon (100 μ m de diâmetro) para se eliminar as *pellets* de micélio ainda intactas ou parcialmente digeridas.

Fragmentos menores de micélio, resultantes da digestão, foram eliminados centrifugando-se o filtrado por 15 segundos na posição 1 da centrífuga Excelsa Baby. O sobrenadante foi recuperado, o volume completado com KCl 0,6 M (ítem 3.1.3.11) e centrifugado por 10 minutos na posição 4. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de protoplastos ressuspensionado em KCl 0,6M e novamente centrifugado como anteriormente. O *pellet* foi recuperado e lavado mais duas vezes como descrito no passo anterior para que fossem eliminados, o máximo possível, os resíduos de enzimas ainda restantes provenientes da digestão.

Após a última centrifugação o *pellet* foi ressuspensionado em 1,5 ml de KCl 0,6M. Desse volume alíquotou-se 0,5 ml que foi devidamente diluído em KCL 0,6M e plaqueado em MC e MC/KCl (ítem 3.1.2.7) para avaliação do número de protoplastos viáveis, fragmentos de micélio e conídios não germinados. O número de protoplastos totais foi estimado através de contagem em câmara de Neubauer.

Avaliado o número total de protoplastos, quantidades aproximadamente iguais de ambas as espécies foram misturadas e centrifugadas por 10 minutos na posição 4. O sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1ml de solução de PEG (ítem 3.1.3.11). A suspensão foi incubada à 30°C por 10 minutos.

Finda a incubação, a suspensão teve seu volume completado a 10ml com KCL 0,6M e foi centrifugada por 10 minutos, posição 4. O

pellet foi ressuspensionado em 1,5ml de KCL 0,6M e distribuído em 4 a 5 placas descartáveis . O espalhamento foi feito vertendo-se MM/KCl sobre a suspensão de protoplastos.

A frequência de fusão foi estimada de duas maneiras:

I - Baseando-se no total de protoplastos empregados (N° de colônias crescidas em MM/KCl / N° de protoplastos totais empregados)

II-Baseando-se no número de protoplastos viáveis (N° de colônias crescidas em MM/KCl / N° de protoplastos viáveis da parental que teve menor número).

3.2.2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS COLÔNIAS CRESCIDAS EM MM/KCL

As colônias crescidas em MM/KCl foram então repicadas para MC e MM cortando-se as pequenas colônias em duas partes, sendo uma transferida para MC e a outra para MM.

Este procedimento foi mantido até que surgisse pelo menos um conidióforo demonstrando complementação para *côr*, no caso, com conídios pretos. Os conídios foram então transferidos para MM inicialmente por estria e, em um segundo passo, por plaqueamento em baixa densidade de conídios por placa, até a purificação do suposto híbrido.

A partir desse ponto, foi seguida a caracterização através da

avaliação do diâmetro de conídios em solução de lisol 10% (ítem 3.1.3.7). Confirmada a evidência do diâmetro de conídios, o suposto híbrido foi então submetido à segregação em MC + Benlate (HASTIE, 1970) em uma concentração de 1.5 µg/ml. Para tanto, utilizou-se uma suspensão de conídios em Tween 80 (ítem 3.1.3.3), a qual foi plaqueada em uma densidade nunca superior a 300 conídios por placa.

Os setores recuperados eram então purificados em MC e, em seguida, caracterizados quanto a auxotrofia(s) e morfologia(s). Tanto o híbrido quanto os setores dele recuperados tiveram sua capacidade de acúmulo de enzima quantificada como descrito no ítem 3.2.1.

3.2.3 TESTES DE FORMAÇÃO DE HALO DE HIDRÓLISE EM PLACA

As linhagens de interesse foram inoculadas em MMA, MMA+TX100, MSK e MSK+TX100 objetivando a detecção de halos de hidrólise em amido e proteína. Após tempos regulares de incubação as placas foram retiradas da estufa e o diâmetro da colônia e dos halos, revelados com solução de Lugol (ítem 3.1.3.12), medidos.

Dessa avaliação surgiu um número adimensional resultante de divisão do diâmetro apresentado pela colônia mais o halo de hidrólise (ao qual nos referiremos sumariamente como halo de hidrólise), pelo diâmetro da colônia, que foi então utilizado para comparações entre as linhagens. Das colônias crescidas à 30°C algumas foram aleatoriamente separadas e estocadas à 4°C para após tempos regulares terem, então, seus halos de hidrólise foram revelados com Lugol e quantificados.

3.2.4 TESTE DE FORMAÇÃO DE HALO COM ENZIMAS PURAS.

Enzimas puras comerciais foram utilizadas para se testar a possibilidade de atividade à 4°C. As enzimas utilizadas foram glicoamilase de *Rhizopus* sp. (Diazyme L100, 100 DU/ml), e a α -amilase de *A. oryzae* (Claras 40, 40.000 SKBU/gr). Ambas da Miles Enzimes.

Em placas com MMA confeccionou-se, com auxílio de pipeta de Pateur, orifícios dentro dos quais foram pipetados volumes iguais da preparação estoque de enzimas assim como as suas respectivas diluições. As placas, cujos orifícios continham tanto glicoamilase como α -amilase e água destilada esterilizada como controle, foram então incubadas tanto à 30°C quanto à 4°C. Após 24 hr foram reveladas com solução de Lugol. Um teste quantitativo foi realizado coletando-se pedaços do meio de cultura tanto da região onde houve a suposta degradação do amido quanto do meio de cultura antes do contato com a enzima e colocando-os para reagir com o teste de glicose oxidase existente nas fitas Multistix 10 SG, (AMES).

3.2.5 ESTERILIZAÇÃO DOS MATERIAS UTILIZADOS.

Todos os meios e soluções utilizados foram autoclavados à 1 atmosfera por 20 minutos. As vidrarias foram esterilizadas em forno de Pasteur a 180°C por 2 hr.

3.2.6 TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO

Todos os cultivos quando não especificados, foram realizados à

30°C.

3.2.7 ANÁLISE GENÉTICA DOS SETORES

A análise genética dos setores foi realizada com o auxílio do programa Genecalc 1.0 (OLIVEIRA e BONATELLI JR., 1991).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO E FUSÃO DE PROTOPLASTOS

Pelos resultados apresentados na TABELA 1, pode ser observado que há variação tanto entre como dentro de linhagens com relação ao número e a viabilidade dos protoplastos obtidos apesar das condições bastante similares utilizadas nos experimentos (O caso típico foi observado com a lap 61, que foi cruzada com a 08 e 02).

Os resultados parecem indicar que, um fato importante na obtenção de prováveis produtos de fusão entre as duas espécies, é a viabilidade dos protoplastos da linhagem de *A. niger*. No caso do cruzamento 02 vs lap 61, observamos que a lap 61 apresentou maior viabilidade (32,2%) do que no cruzamento 08 vs lap 61 (4,6%), o que pode ser um dos fatores responsáveis pelo aumento de 30 vezes na frequência de fusão observada, quando esta foi calculada em função dos protoplastos viáveis e 8 vezes com relação ao total de protoplastos empregados.

Esse fenômeno pode estar relacionado com observações feitas anteriormente (FUNGARO, 1984; VIALTA, 1987; WARWAR, 1990) de que o PEG tem a toxicidade maior para os protoplastos de *A. niger*. Um fator que não pode ser inteiramente descartado é que foram utilizadas diferentes linhagens de *A. awamori* o que pode, também, ter sua contribuição.

A variação na frequência de regeneração já é um fato estabelecido pois, em *Neurospora crassa* foram observadas frequências

TABELA 1 Resultados referentes à viabilidade das linhagens, frequências de fusão e regeneração nos cruzamentos realizados.

linhagens	N ^o de protoplastos totais	N ^o de protoplastos viáveis	% de regeneração.	PPF ¹	freq. de fusão ²	
					A	B
08	9,6x10 ⁵	1,2x10 ⁵	12,5	6	6,2x10 ⁻⁶	9,9x10 ⁻⁵
lap 61	1,3x10 ⁶	6,0x10 ⁴	4,6			
M ₂ P	1,0x10 ⁶	n.d. ³	--	29	3,8x10 ⁻⁵	--
SV-24	7,5x10 ⁵	n.d.	--			
02	1,2x10 ⁶	1,0x10 ⁴	0,83	30	5,0x10 ⁻⁵	3,0x10 ⁻³
lap 61	6,0x10 ⁵	1,9x10 ³	32,3			

1- Prováveis produtos de fusão observados em MM com KCl.

2- Frequências de fusão calculados segundo item 3.2.2.2:

A: protoplastos totais;

B: protoplastos viáveis.

3- n.d.: o n^o de protoplastos viáveis não foi estimado devido à contaminação das placas de MC e MC/KCl.

que variavam entre 20 a 80% (BACHMANN e BONNER, 1959) e, em *Fusarium culmorum* ela variou entre 5 a 82% (LOPEZ-BELMONTE et alii 1966). Em *A. niger*, DAS et alii (1989) observaram uma variação entre 3,1 a 38,1%. VIALTA (1987) trabalhando com as linhagens pabA₁nicA₁olvA₂ de *A. niger* e M₂^F de *A. awamori* (item 3.1.1) observou que as porcentagens de regeneração foram de 14,4% e 17% para a primeira e, 7,5% e 19% para a segunda, nos dois experimentos de fusão realizados.

Apesar do expressivo aumento da frequência de fusão do experimento acima relatado as frequências apresentaram-se relativamente baixas e extremamente variáveis, situando-se entre 10⁻⁸ a 10⁻⁵. Tal variação pode ser devido a vários motivos, entre eles temos o próprio fenômeno de agregação causado pelo agente fusogênico (PEG) que pode, teoricamente, diminuir o número de unidades formadoras de colônias observadas em MM/KCl. Outro fator que pode ser levantado é a estabilidade da membrana dos protoplastos no momento do plaqueamento,

Uma última hipótese seria a ausência de elementos citoplasmáticos de forma a diminuir a viabilidade do próprio produto de fusão. Deve-se levar em conta que protoplastos liberados no início do processo de digestão (1 a 3 hrs) tendem a ter, pelo menos em *A. nidulans*, até 50% de anucleados (PEBERDY, 1979a).

No que diz respeito a frequência de fusão, primeiramente, há de se salientar que o cálculo feito neste trabalho utiliza a viabilidade dos protoplastos antes do tratamento com PEG sendo que a maioria dos trabalhos publicados utilizam a viabilidade após o

tratamento com o agente fusogênico. De qualquer modo, as frequências de fusão relatados se encontram na casa de 10^{-3} (DAS *et alii*, 1989; KIYOHARA *et al.*, 1990) a 10^{-2} (OGAWA, 1989; VIALTA, 1990).

4.2 SELEÇÃO DOS PRODUTOS DE FUSÃO

4.2.1 INSTABILIDADE EM HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS

Após a fusão de protoplastos, foi observado, nos três cruzamentos realizados, que os prováveis produtos de fusão (PPF) desenvolvidos em MM/KCl tinham a forma da colônia irregular, crescimento restrito e não formavam conidióforos, o que concorda com observações de VIALTA (1987) e VIALTA e BONATELLI JR.(1990). Estes foram repicados para MM e MC, de acordo com o item 3.2.2.3, até que fossem constatados conidióforos com coloração preta, o que indicaria complementação das mutações para coloração de conídios e provável fusão de núcleos (VIALTA, 1987).

No caso do cruzamento entre as linhagens 08 e lap 61, o conidióforo identificado produziu conídios que formaram colônias com as características esperadas para o híbrido interespecífico, isto é, com crescimento regular e não restrito em MM, além de abundante formação de conidióforos curtos, característicos da linhagem de *A. awamori* utilizada, com conídios pretos (VIALTA e BONATELLI JR, 1990).

Contudo, no caso dos cruzamentos M_2P vs SV-24 e 02 vs lap 61,

os conidióforos com conídios pretos resultaram em colônias com crescimento lento e irregular em MM. Estas, no entanto, produziram conidióforos com conídios pretos, o que as diferenciava dos prováveis produtos de fusão isolados inicialmente além do que, a quantidade de conidióforos era menor que a esperada para os híbridos de acordo com o anteriormente relatado.

No caso do cruzamento entre M_2P e SV-24, uma suspensão de conídios foi preparada e semeada em MM e MC, para que o número de colônias nos dois meios de cultura pudesse ser estimado. A porcentagem do número de colônias crescidas em MM pelo número em MC foi de 37,3%, o que sugere mais fortemente que as colônias obtidas no passo anterior não sejam híbridos e sim, heterocáricos, que apresentam coloração não autônoma dos conídios e um número de conídios diplóides superior ao usualmente detectado. A não autonomia foi descrita anteriormente em cruzamentos intraespecíficos nestas espécies (PONTECORVO et alii, 1953; BONATELLI JR. et alii, 1983; VIALTA, 1987).

Desse plaqueamento, isolou-se 100 colônias ao acaso crescidas em MC para estudos posteriores. Entre estas, observou-se 3 classes morfológicas distintas, A, B e C, com uma porcentagem de 15,5%, 13,4% e 71,1% respectivamente.

O tipo A é caracterizado como tendo um crescimento vigoroso e regular em MM, conídios pretos e conidióforo alto como o *A. niger*. O tipo B possui uma morfologia semelhante ao tipo A, exceto no tamanho do conidióforo, que nesse caso é baixo, semelhante a linhagem de *A. awamori*, o que é determinado pelo alelo $cspA_1$. O tipo C pareceu ser

muito semelhante ao heterocário originalmente isolado, principalmente devido a morfologia da colônia e a escassa formação de conídios.

Caracterizados os três tipos morfológicos observou-se que, através dos sucessivos plaqueamentos em MM, o tipo C desaparecia permanecendo apenas os tipos A e B. Através plaqueamentos similares, observou-se também que o tipo A dava origem a ele mesmo e ao tipo B, em uma porcentagem de até 6%. O tipo B, por sua vez, dava origem apenas a colônias com a mesma morfologia. Deste modo, supôs-se que os tipos A e B deveriam ser híbridos, e que, o tipo C deveria ser um heterocário.

Os prováveis híbridos, A e B, foram submetidos à caracterização proposta no item 3.2.3 aonde a natureza híbrida de ambos foi confirmada, tanto por intermédio de diâmetro de conídios quanto por haploidização em Benlate (item 4.2.2).

Fatos semelhantes foram observados durante o isolamento do híbrido no cruzamento 02 vs lap 61. Neste caso também foi possível a recuperação de dois tipos morfológicos A e B, também distinguíveis pela altura dos conidióforos, como no caso anteriormente descrito. Entretanto, a porcentagem com que o tipo A origina o tipo B, neste caso é de 30%, refletindo uma instabilidade 5 vezes maior.

A semelhança observada entre esses dois casos, associado ao fato de que os híbridos 08//lap 61 e o $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_2$ (VIALTA e BONATELLI JR., 1990) terem conidióforos baixos, semelhante ao *A. awamori*, nos permite supor que isso talvez possa ser um fato relativamente comum na hibridização interespecífica entre *A. niger* e

A. awamori. Talvez os dois primeiros híbridos isolados tenham surgido também de um precursor tipo A, não evidenciado durante o processo de repicagem do provável produto de fusão.

Uma possível sequência dos eventos relatados nos cruzamentos interespecíficos entre *A. niger* e *A. awamori* estão sumarizados na FIGURA 1.

Os fatos acima relatados nos levaram a especular se, na realidade, o verdadeiro híbrido interespecífico não seja recuperado, devido a uma instabilidade bem maior que a observada no caso dos tipos A e que, algumas divisões após a cariogamia, já temos o núcleo híbrido rearranjado de modo que se torne muito difícil a recuperação do híbrido original.

Outro fato é que, assim como identificamos os tipos morfológicos PPF, A, B e C, os quais são de fácil visualização, é possível que existam outros tipos, porém sem diferenças morfológicas, que possam tornar mais fácil a sua recuperação.

A recuperação de tipos morfológicos distintos também foi relatado no cruzamento entre espécies de *Penicillium*, *P. chrysogenum* e *P. baarnense* (MELLON, 1985), *Saccharomyces cerevisiae* e *S. diastaticus* (HOFFMAN et alii, 1987) e, entre *A. niger* e *Trichoderma reesei* (KIRIMURA et alii, 1988a). Provavelmente, maiores informações sobre



Legenda:

PPF - Provável produto de fusão;

A, B, C - Tipos morfológicos observados durante a obtenção dos híbridos;

1 - $M_2P \times SV-24$; $02 \times lap\ 61$.

2 - $08 \times lap\ 61$; $M_2P \times pabA_1nicA_1olvA_9$

FIGURA 1 Esquema provável da origem dos tipos morfológicos observados.

diferenças entre os dois híbridos isolados neste trabalho poderiam ser obtidas através de cruzamentos planejados com linhagens com todos os grupos de ligação marcados e análise dos cromossomos através de cariótipos eletroforéticos (MILLS e McCLUSKEY, 1990).

4.2.2 DIÂMETRO DE CONÍDIOS E SEGREGAÇÃO

A caracterização dos prováveis híbridos foi feita através dos seguintes parâmetros:

- i- Diâmetro de conídios;
- ii- Segregação em Benlate.

O diâmetro de conídios constitui-se em uma avaliação indireta da ploidia de uma determinada linhagem, entretanto, apesar de não dar segurança absoluta, é uma evidência de fácil obtenção.

Os resultados referentes ao diâmetro de conídios podem ser observados na TABELA 2 aonde se nota que todos os híbridos apresentaram um diâmetro de conídios da ordem de 6 μ m, o que concorda com VIALTA e BONATELLI JR. (1990). Podemos notar que em todos os híbridos isolados a relação diâmetro do híbrido / diâmetro da parental não foi menor que 1,2, o que reflete pelo menos o dobro do volume do conídio híbrido em relação ao dos parentais. Nos casos onde houve o envolvimento da linhagem lap 61 tivemos uma relação entre 1,3 e 1,4. Entretanto, podem ser valores apenas aparentemente maiores devido ao menor diâmetro dos conídios da linhagem de *A. niger*.

TABELA 2 Diâmetro de conídios ($\bar{\phi}$), desvio padrão (σ_{n-1}) e covariância (CV %) das linhagens e híbridos, incluindo as relações híbrido/parental

Linhagem	$\bar{\phi}$ μm	σ_{n-1}	CV (%)
lap 61	4,5	0,4	8,8
02	5,0	0,4	8,0
1- 02//lap61(A)	6,5	0,3	4,6
2- 02//lap61(B)	6,1	0,5	8,2
(1)/02 : 1,3 (1)/lap 61 : 1,4 (2)/02 : 1,2 (2)/lap 61 : 1,3			

lap 61	4,8	0,4	8,3
08	5,2	0,4	7,7
08//lap61	6,7	0,3	4,4
08//lap61 / 08 : 1,3 08//lap61 /lap 61 : 1,4			

M_2P	4,8	0,6	12,5
SV-24	5,0	0,4	8,0
1- M_2P //SV-24(A)	5,9	0,5	8,4
2- M_2P //SV-24(B)	6,1	0,4	6,5
(1)/ M_2P : 1,2 (1)/SV-24 : 1,2 (2)/ M_2P : 1,3 (2)/SV-24 : 1,2			

Após a constatação citológica, partiu-se para a caracterização genética dos híbridos. Esta é uma evidência primária ou direta pois, com a recuperação de recombinantes, pode-se deduzir que houve a cariogamia e posterior segregação em Benlate. Os resultados das TABELAS 3 a 8 mostram que segregantes recombinantes, onde marcas de *A. awamori* foram recuperadas juntamente com marcas de *A. niger*, puderam ser constatados em todos os híbridos isolados.

Os resultados observados aqui são condizentes com aqueles relatados por outros pesquisadores. VIALTA (1987), trabalhando com linhagens de *A. niger* e *A. awamori*, observou que o híbrido interespecífico apresentava um diâmetro de conídios 1,2 vezes maior que as linhagens parentais, evidência posteriormente constatada através da análise genética associada à quantificação de DNA por núcleo.

4.3 ANÁLISE MITÓTICA DOS HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS

4.3.1 O HÍBRIDO 08//LAP 61

No caso desse híbrido, quase todas as combinações possíveis foram recuperadas com excessão do $proA_1fwnA_1$ (TABELA 3, A1 e A2), o que poderia ser explicado como um problema de amostragem pois só foram recuperados seis setores $fwnA_1$ (12%). Entretanto tal possibilidade tem suas ressalvas visto que, no que diz respeito aos marcadores $argA_1$ e $pabA_1$, ambos foram encontrados associados a este marcador de cor em uma distribuição próxima do 1:1 esperado.

TABELA 3 Número de setores encontrados para cada combinação de marcas no híbrido 08//lap61.

		arg*		pro		fvn gre		cep	
		+	-	-	+			-	+
pab	-	9	14	5	18	4	19	23	0
	+	13	14	7	20	2	25	27	0

		arg		fvn gre		cep	
		+	-			-	+
pro	-	11	1	0	12	12	0
	+	11	27	6	32	38	0

		fvn gre		cep	
				-	+
arg	+	3	19	22	0
	-	3	25	28	0

		fvn gre	
		+	-
cep	+	0	0
	-	6	44

* - 0 significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

Quando analisamos a segregação do gene selvagem em relação ao alelo mutante, vemos que os genes $argA_1$ e $argA_1^+$ tem uma segregação que não difere estatisticamente de 1:1 ($\chi^2_{0.05} = 0.7$) assim como os alelos $pabA_1$ e $pabA_1^+$ ($\chi^2_{0.05} = 0.3$). No caso dos genes para côr, $greA_1$ e $fwnA_1$, os poucos setores $fwnA_1$ recuperados apresentam o marcador de *A. niger*. Os alelos $proA_1$ e $proA_1^+$, por sua vez, apresentaram um desvio de segregação que não diferiu estatisticamente de 1:3 ($\chi^2_{0.05} = 0.01$), o que pode ser devido a uma possível segregação preferencial do alelo de *A. niger*.

Na TABELA 3 observa-se que quase todas as combinações apresentam uma distribuição que não difere estatisticamente de 1:1. Apenas nos casos de $proA_1$ vs $argA_1$ e $proA_1$ vs côr temos um desvio de segregação (1:3, $\chi^2_{0.05} = 0.00$; 1:2, $\chi^2_{0.05} = 0.19$ respectivamente), reforçando a hipótese de que parece haver uma segregação preferencial de algumas combinações. Não foi detectada ligação entre nenhum dos marcadores. Apesar do cruzamento ser $cspA_1$ vs $cspA_1^+$, todos os setores recuperados carreavam o marcador de *A. awamori*, $cspA_1$, sugerindo uma homozigose desse alelo no híbrido que pode ser devida a uma não disjunção ou permuta mitótica.

4.3.2 OS HÍBRIDOS $M_2P//SV-24$

4.3.2.1 $M_2P//SV-24(A)$

Neste híbrido, todos os marcadores auxotróficos e morfológicos envolvidos foram recuperados em todas as combinações possíveis, como

pode ser observado nas TABELAS 4, A3 e A4. Com excessão do $pabA_1$, que teve uma segregação que não difere estatisticamente de 1:1 ($\chi^2_{0.05}=1.6$), todos os outros apresentaram algum desvio de segregação. Os marcadores $proA_1$ e $nicA_1$ e $côr$ apresentaram uma segregação que não diferiu estatisticamente de 3:1 ($\chi^2_{0.05}=0.01$).

Apenas um setor carreando o marcador $leuA_1$ foi recuperado, repetindo o padrão observado anteriormente por VIALTA (1987). Nesse híbrido, o alelo $leuA_1^+$ de *A. niger* parece ter sido favorecido.

Analisando-se mitoticamente o híbrido, observa-se que a distribuição de 1:1 esperada foi constatada apenas nas combinações envolvendo o marcador $pabA_1$. Nas demais associações a distribuição variou entre 3:1 ($leuA_1$ vs $proA_1$, $leuA_1$ vs $nicA_1$ - $\chi^2_{0.05}=0,09$; $leuA_1$ vs $côr$ - $\chi^2_{0.05}=0,8$) e 2:1 ($proA_1$ vs $nicA_1$ - $\chi^2_{0.05}=0,34$; $proA_1$ vs $côr$ - $\chi^2_{0.05}=0,22$). Foi evidenciado a ligação entre $nicA_1$ e $olvA_3$ ($\chi^2_{0.05}=0,2$), como havia sido sugerido anteriormente por VIALTA (1987).

O marcador $cspA_1$ teve uma distribuição que não diferiu estatisticamente de 1:1 ($\chi^2_{0.05}=0,9$) com relação ao seu alelo $cspA_1^+$ de *A. niger*. Sobre sua distribuição em relação aos demais marcadores foi constatado o 1:1 esperado, com excessão do $pabA_1$, com o qual observou-se uma distribuição que não diferia estatisticamente de 1:2 ($\chi^2_{0.05}=0,23$).

TABELA 4 Número de setores encontrados para cada combinação de marcas no híbrido M₂P//SV-24(A).

		pro*		pab		nic		brv olv		csp	
		-	+	+	-	+	-			-	+
leu	-	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0
	+	12	36	27	21	12	36	9	39	19	27

		pab		nic		bvn olv		csp	
		-	+	+	-			-	+
pro	-	5	7	3	9	3	9	7	5
	+	15	22	9	29	6	31	13	22

		nic		olv bvn		csp	
		-	+			-	+
pab	-	17	3	18	2	4	16
	+	20	9	22	7	16	11

		olv bvn		csp	
		-	+	-	+
nic	-	37	0	18	17
	+	3	9	2	10

		olv bvn	
		-	+
csp	+	20	7
	-	18	2

* - O significado dos marcadores esta no item 3.1.1.3.

4.3.2.2 M₂P//SV-24(B)

Como mais uma diferença a ser levantada entre os dois híbridos encontramos agora diferentes padrões de segregação (TABELAS 5, A5 e A6). Neste caso dos marcadores *pab*A₁, *nic*A₃ e os genes de cor apresentam uma segregação que não difere estatisticamente de 1:1 ($\chi^2_{0.05} = 3.4$, 0.6 e 0.6, respectivamente). Os marcadores *leu*A₁ e *pro*A₁ apresentaram um acentuado desvio da segregação visto que nenhum setor *leu*A₁ foi recuperado do cruzamento e apenas seis (9,7%) carregando o marcador *pro*A₁. Pode-se observar que a segregação novamente é preferencial em favor dos marcadores de *A. niger* *leu*A₁⁺ e *pro*A₁⁺, como já havia sido observado nos setores dos híbridos 08//lap 61 e M₂P//SV-24(A).

A análise genética desse híbrido demonstrou que os genes *leu*A e o *pro*A apresentam uma porcentagem de recombinação da ordem de 9,6% sugerindo uma possível ligação entre eles. Tal fato não foi constatado no híbrido anterior, M₂P//SV-24 (A). O marcador *pab*A₁, tanto associado ao *nic*A₁ quanto aos marcadores de cor, apresentou uma segregação que não diferiu estatisticamente de 2:1 ($\chi^2_{0.05} = 0,08$ e 0,53 respectivamente). A evidência de ligação entre *nic*A₁ e *olv*A₃ também foi verificada nesse híbrido. As demais combinações apresentaram-se dentro do 1:1 esperado.

Como observado para o 08//lap 61, aqui também todos os setores recuperados carregavam o marcador de *A. awamori* *csp*A₁, sugerindo uma homozigose de alelo no híbrido (fato anteriormente observado no híbrido 08//lap 61).

TABELA 5 Número de setores encontrados para cada combinação de marcas no híbrido M₂P//SV-24(B).

	pro*		pab		nic		bvn olv		cep	
	-	+	+	-	+	-			-	+
-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
+	6	56	37	25	30	32	30	32	62	0

	pab		nic		bvn olv		cep	
	-	+	-	+			-	+
-	3	3	2	4	2	4	6	0
+	34	22	28	28	28	28	56	0

	nic		olv bvn		cep	
	-	+			+	-
-	17	7	17	7	0	24
+	15	23	15	23	0	38

	olv bvn		cep	
	-	+	+	-
-	32	0	0	32
+	0	30	0	30

	olv bvn	
	-	+
+	0	0
-	32	30

* - 0 significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

4.3.3 M₂P//PAB₁ NICA₁ OLVA₃

Todos os marcadores auxotróficos e morfológicos envolvidos foram recuperados na maioria das combinações esperadas (TABELA 6, A7 e A8). O marcador *leuA*₁ de *A. awamori* foi recuperado em apenas um dos setores (2,04%), mostrando novamente ser de difícil recuperação. Os marcadores *proA*₁ e *pabA*₁ apresentaram uma distribuição que não diferiu estatisticamente de 3:1 ($\chi^2_{0,05} = 0,16$ e 0,0 respectivamente) quando comparados com seus respectivos alelos. Ambos os marcadores *nicA*₁ e genes para *côr* apresentaram uma distribuição que não diferiu estatisticamente de 1:1 ($\chi^2_{0,05} = 2,08$) nas mesmas condições.

A análise genética deste híbrido revelou que as associações entre os marcadores *leuA*₁ e *proA*₁ apresentava uma distribuição que não difere estatisticamente de 2:1 ($\chi^2_{0,05} = 0,0$) e que a combinação entre *leuA*₁ e *pabA*₁ não diferia do 1:2 ($\chi^2_{0,05} = 0,16$). As demais combinações apresentaram uma distribuição dentro do 1:1 esperado.

Os marcadores *nicA*₁ e *olvA*₃ apresentaram novamente evidência de ligação ($\chi^2_{0,05} = 0,02$). Todos os setores recuperados desse híbrido apresentaram o marcador *cspA*₁ de *A. awamori*, sugerindo novamente uma homozigose desse alelo.

TABELA 6 Número de setores encontrados para cada combinação de marcas no híbrido $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_3$.

pro*		pab		nic		bvn		olv		cep	
-	+	+	-	+	-					-	+
-	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	
+	12	35	36	11	19	28	19	28	47	0	

pab		nic		bvn		olv		cep	
-	+	+	-					-	+
-	3	10	4	9	5	8	13	0	
+	9	26	15	20	15	20	35	0	

		nic		olv bvn		cep	
		-	+			-	+
pab	-	9	3	8	4	12	0
	+	20	16	20	16	36	0

		olv bvn		esp	
				-	+
nic	-	28	1	29	0
	+	0	19	19	0

olv bvn	
+	-
0	0
28	20

* - 0 significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

4.3.4 OS HÍBRIDOS O2//LAP 61

4.3.4.1 O2//LAP 61 (A)

Todos os marcadores auxotróficos e morfológicos envolvidos foram recuperados (TABELAS 7, A9 e A10). O marcador $proA_1^+$ apresentou um desvio considerável em relação ao 1:1 esperado, visto que apenas 14,6% dos setores apresentavam o marcador de *A. awamori*, $proA_1$. Marcadores morfológicos apresentaram uma distribuição que não difere estatisticamente de 3:1 ($\chi^2_{0,05} = 0,11$) em favor dos genes $cspA_1$ e $fwnA_1$, o primeiro de *A. awamori* e o segundo de *A. niger*. Os marcadores $argB$ e $pabA$ também apresentaram um desvio de segregação considerável, entretanto, tal ocorrência pode ser atribuída à ligação detectada entre esse dois loci.

No que diz respeito a interação entre marcadores, observa-se que a segregação 1:1 esperada foi constatada entre os genes $cspA$ e marcadores de cor ($\chi^2_{0,05} = 1,9$) e entre $cspA$ e $pabA$ ($\chi^2_{0,05} = 2,9$). Nas demais combinações observou-se combinações que não diferiam estatisticamente de 2:1 ($argB$ vs cor, $\chi^2_{0,05} = 0,01$; $argB$ vs $cspA$, $\chi^2_{0,05} = 0,01$; $pabA$ vs cor, $\chi^2_{0,05} = 0,06$); 3:1 ($proA$ vs $pabA$, $\chi^2_{0,05} = 0,01$; $proA$ vs $cspA$, $\chi^2_{0,05} = 0,11$). As combinações $argB$ vs $proA$ e $proA$ vs cor apresentam desvio de sergergação.

Como foi comentado acima, os marcadores $argB$ e $pabA$ apresentaram evidência de ligação, sendo a proporção Parental : Recombinante, nesse caso, igual a 40:1.

TABELA 7 Número de setores encontrados para cada combinação de marcas no híbrido 02//1ap 61(A).

		arg*		pro		fvn gre		csp	
		+	-	+	-			-	+
pab	-	37	0	31	6	27	10	26	11
	+	1	3	4	0	3	1	4	0

		arg		gre fvn		csp	
		-	+			-	+
pro	-	0	6	6	0	3	3
	+	3	32	5	30	27	8

		fvn		gre		csp				fvn		gre		
						+		-						
arg	+	27		11		11		27		+	8		3	
	-	3		0		0		3		-	22		8	

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

4.3.4.2 02//LAP 61 (B)

Todos os marcadores auxotróficos e morfológicos envolvidos foram recuperados (TABELAS 8, A11 e A12). Novamente observa-se um desvio na segregação dos marcadores genéticos envolvidos, sendo que os únicos alelos a apresentarem uma distribuição que não diferia estatisticamente de 1:1 são os marcadores de cor $greA_1$ e $funA_1$ ($\chi^2_{0.05} = 0.09$). Os alelos do gene $proA$ apresentaram um desvio que não diferia estatisticamente de 3:1 ($\chi^2_{0.05} = 0.0$), novamente favorecendo o alelo de *A. niger*.

A análise genética revelou que apenas nos casos do $argB_1$ vs cor e $pabA_1$ vs cor foi possível se observar uma distribuição que não diferia estatisticamente de 1:1. No caso das associações entre $argB_1$ vs $proA_1$, $proA_1$ vs $pabA_1$ e $proA_1$ vs cor nota-se um desvio que não difere estatisticamente de 2:1 ($\chi^2_{0.05} = 0,18$; 0,18 e 1,63 respectivamente), o que sugere que o marcador $proA_1$ seja responsável por esse desvio, pois é o fator comum em todos os casos. No caso do $argB_1$ vs $pabA_1$, não foi possível observar nenhum setor carregando uma combinação recombinante, sugerindo que esses dois genes possam estar ligados.

Nesse híbrido, assim como no 08//lap 61, M_2P //SV-24 (B) e M_2P // $pabA_1$ $nicA_1$ $olvA_2$, não foi recuperado nenhum setor carregando o marcador $cspA_1^+$ de *A. niger*, sugerindo que também nesse caso estar ocorrendo homozigose nesse alelo.

TABELA 8 Número de setores encontrados para cada combinação de marcas no híbrido 02//lap 61(B).

		pre*		pab		cep		côr	
		+	-	-	+	+	-	fvn	gre
arg	+	22	10	42	0	0	42	0	42
	-	0	1	0	1	0	1	0	1

		pab		cep		côr	
		-	+	+	-	fvn	gre
pro	+	22	0	0	22	21	12
	-	10	1	0	11	2	9

		cep		côr		côr	
		-	+	gre	fvn	fvn	gre
pab	+	1	0	1	0	0	0
	-	42	0	20	22	22	21

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

4.3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A ANÁLISE GENÉTICA DOS HÍBRIDOS

Como pode ser observado, a diferença morfológica observada entre os dois tipos A e B se reflete também a nível de segregação nos setores analisados. Em ambos os casos observamos que, nos desvios de segregação, o marcador da parental de *A. niger* é favorecido. Com o objetivo de se complementar a análise, novos setores foram recuperados do híbrido $M_2P//pabaA_1\ nicA_1\ olvA_3$ e, estes, caracterizados quanto a seus marcadores auxotróficos e morfológicos envolvidos no cruzamento. Os resultados comparativos entre esses híbridos ($M_2P//SV-24(A\ e\ B)$ e $M_2P//pabaA_1\ nicA_1\ olvA_3$) podem ser observados na TABELAS 9.

Nesta Tabela podemos observar que existe uma variação na segregação de um híbrido para o outro e inclusive entre o padrão de segregação observado por *VIALTA e BONATELLI JR.* (1990) e o padrão encontrado em nosso trabalho no mesmo híbrido ($M_2P//pabaA_1\ nicA_1\ olvA_3$) especialmente em relação a marca $proA_1$ que, em nosso caso, apresentou uma segregação que não diferiu estatisticamente de 3:1 ($\chi^2_{0.05} = 0,17$) e no trabalho de *VIALTA e BONATELLI JR.* (op. cit.) uma segregação que não difere estatisticamente de 2:1 ($\chi^2_{0.05} = 0,27$).

Como pode ser observado nas TABELAS 4,5 e 6, o marcador $leuA_1$ é de difícil recuperação sendo encontrado em apenas dois casos, um no híbrido $M_2P/SV-24 (A)$ e o outro no híbrido $M_2P//pabaA_1\ nicA_1\ olvA_3$. De um modo geral, quando as combinações entre as marcas não se encontram em uma distribuição do tipo 1:1, apresentam um desvio favorecendo a combinação parental, o único caso que exclui-se dessa generalização

TABELA 9 Número (n) e porcentagem (%) de setores obtidos, provenientes dos híbridos $M_2P//SV-24(A)$ e $M_2P//SV-24(B)$ e $M_2P//pabA_{11}nicA_{11}olvA_3$.

Classes de Setores					Híbridos							
leu*	pro	pab	nic	côr	(A)		(B)		$M_2P//PNO^1$		$M_2P//PNO^2$	
					n	%	n	%	n	%	n	%
+	+	-	-	olv	13	(26,5)	14	(22,6)	6	(12,5)	12	(25,5)
+	+	+	-	olv	14	(28,6)	14	(22,6)	14	(29,2)	7	(14,9)
+	-	+	+	bwn	2	(4,1)	2	(3,2)	4	(8,3)	7	(14,9)
+	-	-	-	olv	4	(2,2)	3	(4,8)	2	(4,2)	1	(2,1)
+	-	+	-	olv	5	(10,2)	1	(1,6)	6	(12,5)	1	(2,1)
+	+	+	+	olv	2	(4,1)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)
+	+	+	+	bwn	5	(10,2)	20	(32,3)	12	(25,0)	7	(14,9)
+	+	-	+	bwm	1	(2,0)	8	(12,9)	3	(6,2)	1	(2,1)
-	+	+	-	olv	1	(2,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)
+	-	-	+	bwn	1	(1,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	5	(10,6)
-	-	-	-	bwn	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(2,1)	0	(0,0)
+	+	-	+	olv	1	(2,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)

1- Setores obtidos no presente trabalho.

2- Dados obtidos por VIALTA (1987).

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

foi entre $leuA_1$ e $pabA_1$ do $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_3$ nos setores provenientes de nossos estudos.

Levando-se em consideração a idéia corrente de haploidização (KAFFER, 1960, 1961), naturalmente em diplóides e, provavelmente em híbridos, é possível se observar o fenômeno da não disjunção ocasionando o subsequente isolamento de setores haplóides. Tal fenômeno de haploidização pode ser acentuado com a utilização de agentes haploidizantes como o Benlate.

Tomando-se isoladamente os híbridos $M_2P//SV-24$ (A e B) e $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_3$, pode-se notar que em todos os casos os alelos $leuA_1^+$ e $proA_1^+$ de *A. niger* foram favorecidos. Em relação aos demais marcadores nota-se que a região com os genes de *A. niger*, $nicA_1olvA_3$, foi recuperada com maior frequência no híbrido $M_2P//SV-24$ (A), apresentando uma distribuição de 1:1 nos demais híbridos. O gene $pabA_1$ apresentou uma distribuição que não diferiu estatisticamente de 1:1 nos híbridos $M_2P//SV-24$ (A e B). No caso do $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_3$, o alelo favorecido foi o de *A. awamori* $pabA_1^+$.

Retornando a Tabela 9, observamos que as marcas favorecidas, de um modo geral, são aquelas referentes às auxotrofias de amino ácidos sendo que de 70 a 80% dos setores recuperados pertencem às classes $leuA_1^+$ $proA_1^+$ e que as classes $pabA_1nicA_1olvA_3$ e $nicA_1olvA_3$ congregam ao redor de 50% de todos os setores isolados, estando os demais setores distribuídos em até 10 classes adicionais. A classe de setor prototrófico com coloração $bwnA_1$ tem sua frequência variando de 10,2% ($M_2P//SV-24(A)$) à 32,7% ($M_2P//SV-24(B)$) sendo que, se essa

classe for incorporada as classes $pabA_1nicA_1olvA_2$ e $nicA_1olvA_2$ teremos de 65 à 75% de todos os setores recuperados nessas três categorias.

No caso do 08//lap 61 pode-se notar, através da TABELA 10, que ambos os setores prototróficos, $greA_1$ e $fwnA_1$, apresentam as menores porcentagens, discordando do observado nos híbridos anteriores. Setores carreando ambos os marcadores selvagens dos loci $argA$ $proA$, apresentaram uma frequência de 17%. Entre esses dois loci, a combinação que apresentou a maior frequência foi a $argA_1 proA_1^+$, representando 50% de toda a amostragem de setores desse híbrido sendo que, destes, 67% carreavam o alelo $pabA_1^+$ sendo, portanto, setores $argA_1 proA_1^+ pabA_1^+$.

No que diz respeito aos híbridos 02//lap 61 (A e B) (TABELA 10), apenas cinco das possíveis classes de setores foram recuperadas. Destas, três são comuns aos dois híbridos e duas não. Em ambos os casos, a classe de maior frequência foi a $pabA_1 fwnA_1$, que no tipo (A) atingiu 66% e no (B) 48%. Nenhum dos tipos prototróficos ($greA_1$ e $fwnA_1$) foi recuperado, provavelmente, devido à ligação entre os loci $argB$ e $pabA$. Setores carreando ambos os alelos selvagem $argB_1^+$ e $proA_1^+$ foram encontrados em 78% (02//lap 61(A)) e 75% (02//lap 61(B)) dos setores analisados.

Resultados como esses sugerem que as marcas prototróficas para amino ácidos são favorecidas nos híbridos estudados. Tal fenômeno pode ser explicado, talvez, por uma concentração não adequada dos amino ácidos no MC, de modo que marcas selvagens passam a ser recuperadas mais facilmente. Além desse fator, não podemos descartar

TABELA 10 Número de setores (N) por classe provenientes dos híbridos
08//lap61 (H1), 02//lap 61(A) (H2) e 02//lap 61(B) (H3).

Setores				H1	H2	H3
arg*	pro	pab	côr	N	N	N
+	+	-	gre	5	4	12
-	-	+	gre	7	0	1
-	+	-	gre	7	0	0
-	-	-	gre	3	0	0
-	+	+	gre	12	0	0
+	-	+	gre	1	0	0
+	-	-	gre	4	6	8
+	+	+	gre	1	1	0
-	+	+	fwn	4	3	0
-	+	-	fwn	1	0	0
+	+	-	fwn	1	27	21
+	+	+	fwn	1	0	0
-	-	-	fwn	1	0	0
+	-	-	fwn	-	0	2

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

inteiramente que exista um problema de tamanho de amostra, o que não permitiria recuperar combinações que ocorram em menor frequência. Finalmente, uma outra hipótese seria a existência de incompatibilidade entre os grupos de ligação, nos quais estão localizados os marcadores para auxotrofia que observamos em menor frequência nos segregantes dos híbridos. Esta incompatibilidade poderia não ser devida aos marcadores utilizados, porém a outros fatores.

Analisando-se os cruzamentos interespecíficos desde seus estágios iniciais, observamos que a cariogamia entre essas duas espécies parece ocorrer numa frequência bem inferior àquela observada em cruzamentos intraespecíficos (BONATELLI JR *et al.*, 1983; VIALTA e BONATELLI JR, 1990). Após a fusão de núcleos, a célula passa por uma fase de adaptação onde rearranjos devem ocorrer de modo a promover a interação dos dois genomas em contato. Desse período de adaptação surge o híbrido do tipo B, o qual é aparentemente mais estável, porém apresenta uma série de diferenças tanto morfológicas quanto genéticas. Algumas dessas variações, descontando aquelas que podem ser geradas apenas pela amostragem, são mostradas nesse trabalho. Tais variações devidas a amostragem são marcantes quando comparamos nossos resultados da análise genética do $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_1$ com os de VIALTA e BONATELLI JR (1990), TABELA 9.

Maiores informações poderiam ser obtidas desses híbridos através de estudos adicionais como recuperação de setores em MC suplementado, uma maior amostragem de setores e cruzamentos entre linhagens de *A. awamori* e *A. niger* com todos os grupos de ligação

marcados.

4.4 PRODUÇÃO DE GLICOAMILASE

4.4.1 PRODUÇÃO DA ENZIMA NOS HÍBRIDOS

Após obtenção e caracterização dos produtos de fusão como híbridos interespecíficos, estes tiveram sua produção de glicoamilase quantificada, (TABELAS 11, A13 e A14). Como pode-se observar, em todos os casos envolvendo genes de baixa produção de *A. niger* ($lgpA_{61}$ e $lgpB_{79}$) e genes de produção normal de *A. awamori*, os híbridos não recuperaram a produção do selvagem nem de uma nem da outra espécie, pelo contrário, a produção permaneceu próximo à média do parental *A. niger*, ou em um nível intermediário entre as duas linhagens parentais. No caso do $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_3$, um cruzamento do tipo $lap^+//lap^+$, o híbrido não diferiu significativamente de sua parental *A. niger*, assim como do diplóide intraespecífico PF//NO, diferindo entretanto da linhagem selvagem de *A. awamori* NRRL 3112 e da parental M_2P , confirmando observações de VIALTA e BONATELLI JR. (1990)

Podemos também observar que não há diferença significativa entre as médias dos híbridos cujo genótipo era $lgp^-//lgp^+$. O fato se repete inclusive no caso do cruzamento 08 vs lap 61 onde, apesar das linhagens parentais apresentarem uma média de produção ao redor de 1,5 U GA/ml, o híbrido apresentou uma produção no mesmo nível dos demais. Com o objetivo de se testar a possibilidade de marcas auxotróficas não terem sido totalmente complementadas, e estarem influenciando a

TABELA 11 Comparação, através do teste de Tukey, das médias de produção (U GA/ml) dos híbridos interespecíficos e suas respectivas linhagens parentais.

Linhagens	U GA/ml			
NRRL 3112	21,5	a		
pabA ₁ nicA ₁ olvA ₉	13,6	b		
M ₂ P//pabA ₁ nicA ₁ olvA ₉	11,9	b		
PF//NO	11,4	b		
M ₂ P	6,8	c		
O2	5,8	c	d	
M ₂ P//SV-24 (B)	3,9	c	d	e
O2//lap 61 (A)	3,8		d	e
SV-24	3,7		d	e
M ₂ P//SV-24 (A)	3,6		d	e
O2//lap 61 (B)	3,4		d	e
O8//LAP 61	3,1			e
lap 61	1,5			e
O8	1,1			e
DMS = 2,9 U GA/ml.				

Os valores seguidos das mesmas letras , não são diferentes significativamente à nível de 5%.

produção de glicoamilase, alguns híbridos foram cultivados em MAC com e sem suplementação do meio com os requisitos nutricionais envolvidos. Os resultados observados nas TABELAS 12, A15 e A16 mostram que não há diferença significativa da produção de enzima pelos híbridos cultivados em ambas as condições. Tais resultados sugerem que a baixa produção observada nos híbridos do tipo $lgp^-//lgp^+$ não deve ser devida a efeito pleiotrópico de marcador parcialmente complementado.

Baseados em tais resultados pode-se sugerir que, em híbridos interespecíficos entre *A. niger* e *A. awamori*, os genes de produção de glicoamilase não apresentam uma boa complementação, podendo ocasionar a dominância sugerida no $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_3$ e a baixa produção apresentada pelos demais híbridos.

Talvez um possível mecanismo para explicar tal dominância possa ser a repressão alélica, descrita em híbridos de eucariotos superiores por WILSON et alii (1974a,b), onde observou-se que, para alguns loci, apenas o produto gênico de um ou de outro parental era possível de se detectar, fenômeno esse que sugeria uma possível interação a nível de genes regulatórios entre as espécies estudadas. Baseado nessa teoria, poder-se-ia supôr a repressão de importante(s) fator(es) regulatório(s) de *A. awamori* pelo(s) de *A. niger*, o que resultaria em um bloqueio da capacidade de produção da primeira espécie.

TABELA 12 Comparação, através do teste de Tukey, das médias de produção (U GA/ml) dos híbridos interespecíficos e algumas linhagens parentais quando cultivados em MAC com e sem suplementação com os requisitos nutricionais.

Linhagens	U GA/ml	
pabA ₁ fwnA ₁	15,6	a
M ₂ P//pabA ₁ nicA ₁ olvA ₃ ^s	8,3	b
M ₂ P	7,7	b
M ₂ P//pabA ₁ nicA ₁ olvA ₃	7,4	b
M ₂ P//SV-24 (A) ^s	3,8	c
M ₂ P//SV-24 (A)	3,4	c
O8//lap 61	2,8	c
M ₂ P//SV-24 (B) ^s	2,6	c
SV-24	2,3	c
O8//lap 61 ^s	2,3	c
M ₂ P//SV-24 (B)	1,8	c
DMS = 2,12 U GA/ml.		

Os valores seguidos das mesmas letras , não são diferentes significativamente à nível de 5%.

s - Produção de glicoamilase em MAC suplementado.

4.4.2 PRODUÇÃO DA ENZIMA PELOS SETORES

Como pode ser observado (TABELAS 13 a 17), em todos os cruzamentos houve uma variação não significativa das médias de produção de glicoamilase entre os marcadores, sejam eles auxotróficos ou morfológicos. Adicionalmente, tais médias não diferem significativamente da média geral observada para os setores.

Quando marcas são observadas em suas combinações, classes de setores, observamos que uma variação bem maior que aquela relatada para os marcadores separadamente. Pode-se observar nas TABELAS 18 e 19, que existem classes de setores com médias no nível da linhagem parental de *A. awamori*, outras no nível da parental *A. niger* e também classes intermediárias em relação a ambas parentais. As classes de setores que apresentaram os menores índices são: $pabA_1 olvA_2$ ($M_2P//SV-24(A)$); $pabA_1 nicA_1 olvA_2$ ($M_2P//SV-24(B)$); $proA_1 bwnA_1$ ($M_2P//pabA_1 nicA_1 olvA_2$); $pabA_1 greA_1$ (08//lap 61); $proA_1 pabA_1 fwnA_1$ (02//lap 61). Para as classes de maior produção observou-se: prototrófico $bwnA_1$ ($M_2P//SV-24(A)$); $proA_1 bwnA_1$ ($M_2P//SV-24(B)$); $pabA_1 greA_1$ ($M_2P//pabA_1 nicA_1 olvA_1$); $pabA_1 fwnA_1$ (08//lap 61); $argB_1 proA_1 greA_1$ (02//lap 61).

Os resultados relatados acima sugerem que não deve existir ligação entre os marcadores analisados nos cruzamentos e produção de glicoamilase, assim como também sugere que não há efeito pleiotrópico destes sobre a produção

Quando os setores foram agrupados em classes de produção

TABELA 13 Relação dos marcadores auxotróficos e morfológicos, juntamente de suas respectivas médias de produção de glicoamilase (U GA/ml), desvio padrão (σ_{n-1}) e covariância (CV), provenientes dos setores recuperados do híbrido 08//lap 61. n - número de setores que apresentaram o marcador.

Gene	Alelo	n	U GA/ml	σ_{n-1}	CV
<i>proA</i> *	+	32	0,9	0,6	66,6
	-	17	0,7	0,5	69,9
<i>argA</i>	+	13	0,7	0,4	59,4
	-	36	0,8	0,6	67,7
<i>pabA</i>	+	27	0,9	0,6	65,4
	-	22	0,8	0,5	68,7
côr	<i>greA</i> ₁	41	0,7	0,5	69,9
	<i>fwnA</i> ₁	8	1,1	0,5	47,1

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA 14 Relação dos marcadores auxotróficos e morfológicos, juntamente de suas respectivas médias de produção de glicoamilase (U GA/ml), desvio padrão (σ_{n-1}) e covariância (CV), provenientes dos setores recuperados do híbrido $M_2P//SV-24(A)$. n - número de setores que apresentaram o marcador.

Gene	Alelo	n	U GA/ml	σ_{n-1}	CV
<i>leuA</i> *	+	46	5,4	1,6	29,0
	-	0	0,0	0,0	0,0
<i>proA</i>	+	34	5,3	1,6	30,6
	-	12	5,5	1,6	28,9
<i>pabA</i>	+	27	5,9	1,4	23,6
	-	19	4,4	2,0	45,2
<i>nicA</i>	+	11	5,9	1,5	25,9
	-	35	5,3	1,6	29,8
côr	<i>olvA</i> ₃	38	5,3	1,5	29,3
	<i>fwnA</i> ₁	8	6,2	1,5	24,9
<i>scpA</i>	+	26	5,3	1,7	31,9
	-	20	5,6	1,4	25,4

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA 15 Relação dos marcadores auxotróficos e morfológicos, juntamente de suas respectivas médias de produção de glicoamilase (U GA/ml), desvio padrão (σ_{n-1}) e covariância (CV), provenientes dos setores recuperados do híbrido $M_2P//SV-24(B)$. n - número de setores que apresentaram o marcador.

Gene	Alelo	n	U GA/ml	σ_{n-1}	CV
<i>leuA</i> *	+	55	5,4	5,9	38,6
	-	0	0,0	0,0	0,0
<i>proA</i>	+	49	5,8	2,3	40,2
	-	6	6,8	1,7	24,8
<i>pabA</i>	+	32	6,2	2,2	35,2
	-	23	5,5	2,4	43,6
<i>nicA</i>	+	27	6,3	1,6	26,3
	-	28	5,4	2,9	53,4
côr	<i>olvA₉</i>	28	5,5	2,7	49,3
	<i>fwnA₁</i>	27	6,3	1,6	26,2
<i>scpA</i>	+	0	0,0	0,0	
	-	55	5,9	2,3	38,6

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA 16 Relação dos marcadores auxotróficos e morfológicos, juntamente de suas respectivas médias de produção de glicoamilase (U GA/ml), desvio padrão (σ_{n-1}) e covariância (CV), provenientes dos setores recuperados do híbrido $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_3$. n - número de setores que apresentaram o marcador.

Gene	Alelo	n	U GA/ml	σ_{n-1}	CV
<i>leuA</i> *	+	47	9,9	2,9	29,7
	-	1	10,1	0,0	0,0
<i>proA</i>	+	35	10,3	2,6	25,6
	-	13	6,8	9,6	27,1
<i>pabA</i>	+	36	9,5	2,8	29,9
	-	12	10,8	3,1	28,3
<i>nicA</i>	+	19	9,6	2,2	22,9
	-	29	10,4	2,8	27,2
côr	<i>olvA</i> ₃	29	10,4	2,8	27,2
	<i>fwnA</i> ₁	19	9,6	2,2	22,9
<i>scpA</i>	+	0	0,0	0,0	0,0
	-	48	9,9	2,9	29,4

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA 17 Relação dos marcadores auxotróficos e morfológicos, juntamente de suas respectivas médias de produção de glicoamilase (U GA/ml), desvio padrão (σ_{n-1}) e covariância (CV), provenientes dos setores recuperados do híbrido 02//lap 61(B). n - número de setores que apresentaram o marcador.

Gene	Alelo	n	U GA/ml	σ_{n-1}	CV
<i>proA</i> *	+	33	6,6	3,1	47,3
	-	11	6,9	5,3	76,6
<i>argA</i>	+	43	6,4	3,4	52,5
	-	1	17,2	0,0	0,0
<i>pabA</i>	+	1	17,2	0,0	0,0
	-	43	6,4	3,4	52,5
côr	<i>greA</i> ₁	21	7,0	4,2	60,0
	<i>fwnA</i> ₁	23	6,3	3,2	50,9
<i>scpA</i>	+	0	0,0	0,0	0,0
	-	44	6,6	3,7	55,6

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA 18 Média da produção de glicoamilase e desvio padrão das classes de setores provenientes dos híbridos $M_2P//SV-24(A)(H1)$, $M_2P//SV-24(B)(H2)$ e $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_3(H3)$.

Setores					Híbridos		
leu*	pro	pab	nic	côr	(H1)	(H2)	(H3)
+	+	-	-	olv	$4,8 \pm 1,6$	$4,8 \pm 2,7$	$10,9 \pm 3,9$
+	+	+	-	olv	$5,5 \pm 1,6$	$5,9 \pm 2,9$	$10,0 \pm 2,9$
+	-	+	+	bwn	$5,6 \pm 2,9$	$7,2 \pm 0,9$	$7,3 \pm 1,9$
+	-	-	-	olv	$5,3 \pm 2,2$	$6,6 \pm 2,5$	$11,1 \pm 3,6$
+	-	+	-	olv	$5,9 \pm 0,7$	$6,6 \pm 0,0$	$9,9 \pm 1,2$
+	+	+	+	olv	$5,8 \pm 0,4$	--	--
+	+	+	+	bwn	$6,9 \pm 0,4$	$6,3 \pm 1,7$	$9,9 \pm 1,6$
+	+	-	+	bwn	--	$5,9 \pm 1,7$	$11,5 \pm 1,8$
-	+	+	-	olv ¹	--	--	--
+	-	-	+	bwn	$4,1 \pm 0,0$	--	--
-	-	-	-	bwn	--	--	$10,1 \pm 0,0$
+	+	-	+	olv	$3,6 \pm 0,0$	--	--

1- O setor $leuA_1 nicA_1 olvA_3$ foi perdido durante a estocagem.

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA 19 Média de produção de glicoamilase (U GA/ml) e desvio padrão (σ_{n-1}) das classes de setores provenientes dos híbridos 08//lap 61 e 02//lap 61(B).

Classes de Setores				08//lap 61		02//lap 61(B)	
arg*	pro	pab	côr	UGA/ml	σ_{n-1}	UGA/ml	σ_{n-1}
+	+	-	gre	0,8	0,6	6,8	2,8
-	-	+	gre	0,6	0,4	17,2	0,0
-	+	-	gre	0,5	0,5	-	-
-	-	-	gre	0,8	0,6	-	-
-	+	+	gre	0,9	0,6	-	-
+	-	+	gre	0,5	0,0	-	-
+	-	-	gre	0,6	0,5	6,2	4,7
+	+	+	gre	0,6	0,0	-	-
-	+	+	fwn	1,2	0,8	-	-
-	+	-	fwn	1,4	0,0	-	-
+	+	-	fwn	1,0	0,0	6,4	3,7
+	+	+	fwn	0,8	0,0	-	-
-	-	-	fwn	1,0	0,0	-	-
+	-	-	fwn	-		4,7	1,3

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

(FIGURAS 2 a 6) notou-se que, com exceção do 08//lap 61 que será comentado depois, a distribuição destes se sobrepõe à distribuição observada nas linhagens parentais. Quanto ao aspecto da curva, nota-se que nos cruzamentos do tipo $lgp^-//lgp^+$, ela reflete uma distribuição bi-modal, onde cada moda reside sobre a média de cada parental. No cruzamento $lgp^+//lgp^+$, a distribuição observada nos setores parece ser diferente das acima constatadas, o que pode ser reflexo daqueles cruzamentos envolvendo marcadores afetando a produção. Em ambos os tipos de cruzamentos não foi possível a recuperação de setores recompondo a produção das linhagens selvagens parentais, em especial a de *A. awamori*, NRRL 3112 (FIGURA 4).

Todos esses dados nos levam a sugerir que, os fatores principais de produção, de *A. niger* e *A. awamori*, estão localizados em grupos de ligação que não os analisados nesses cruzamentos e que segregam aleatoriamente, apesar de setores com médias de produção próximas às parentais serem recuperadas em maior frequência. Tal fenômeno pode ser influenciado pela amostragem estudada, como visto na análise genética (ítem 4.3.4). A amostragem poderia ainda ser a responsável pela oscilação na média de produção observada para os setores que ora encontra-se no nível da linhagem parenta de *A. awamori* ($M_2P//SV-24(A$ e $B)$), e ora intermediária entre ambas as parentais ($M_2P//pabA_1nicA_1olvA_3$ e 02//lap 61).

O híbrido 08//lap 61 tem um comportamento um pouco diferente dos outros obtidos. Nesse caso observa-se claramente que os setores obtidos tendem a agrupar-se em classes de baixa produção, não sobrepondo a distribuição dos parentais, o que pode ser responsável

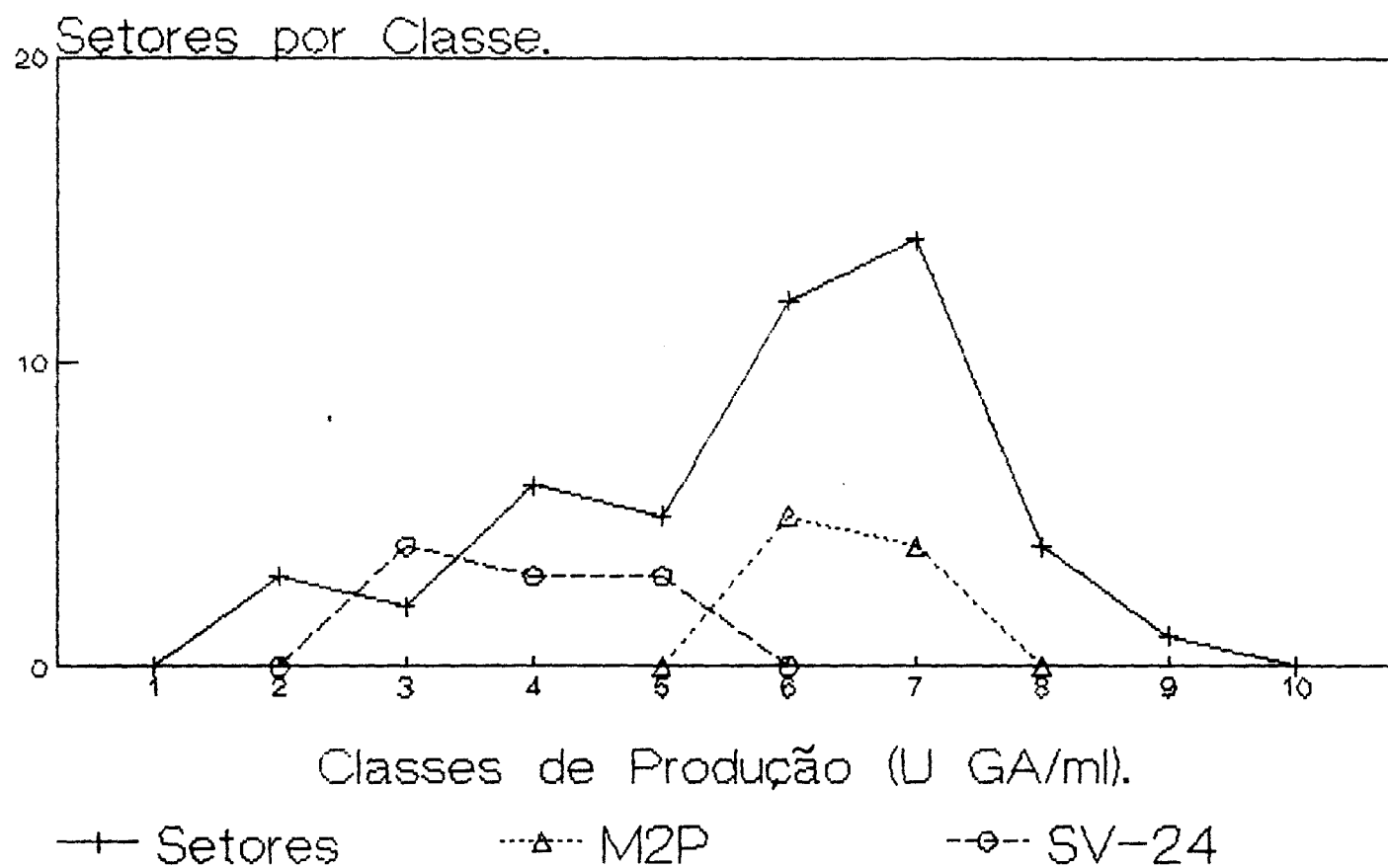


FIGURA 2 Distribuição da produção de glicoamilase dos setores e linhagens parentais do híbrido $M_2P//SV-24(A)$.

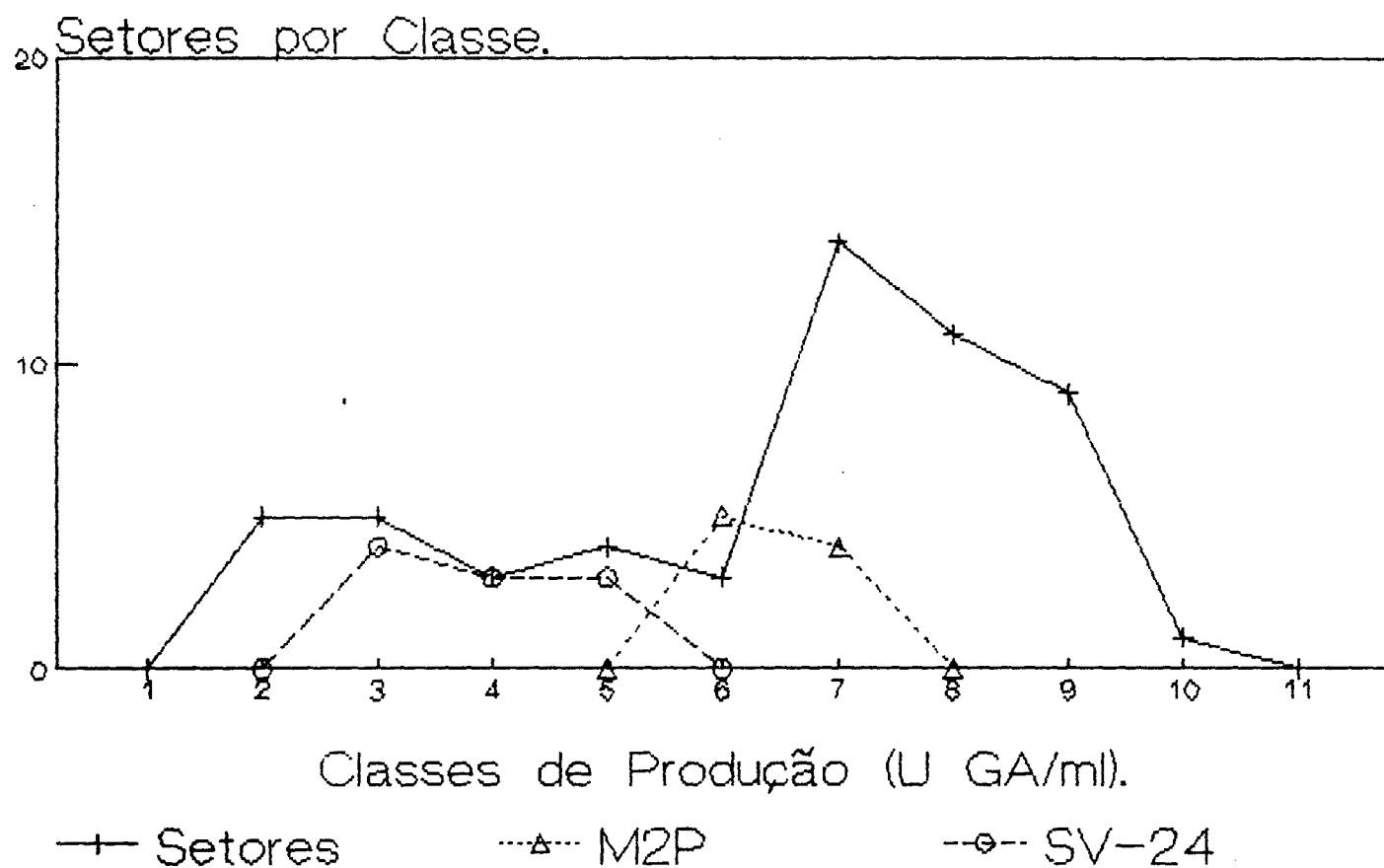


FIGURA 3 Distribuição da produção de glicoamilase dos setores e linhagens parentais do híbrido $M_2P//SV-24(B)$.

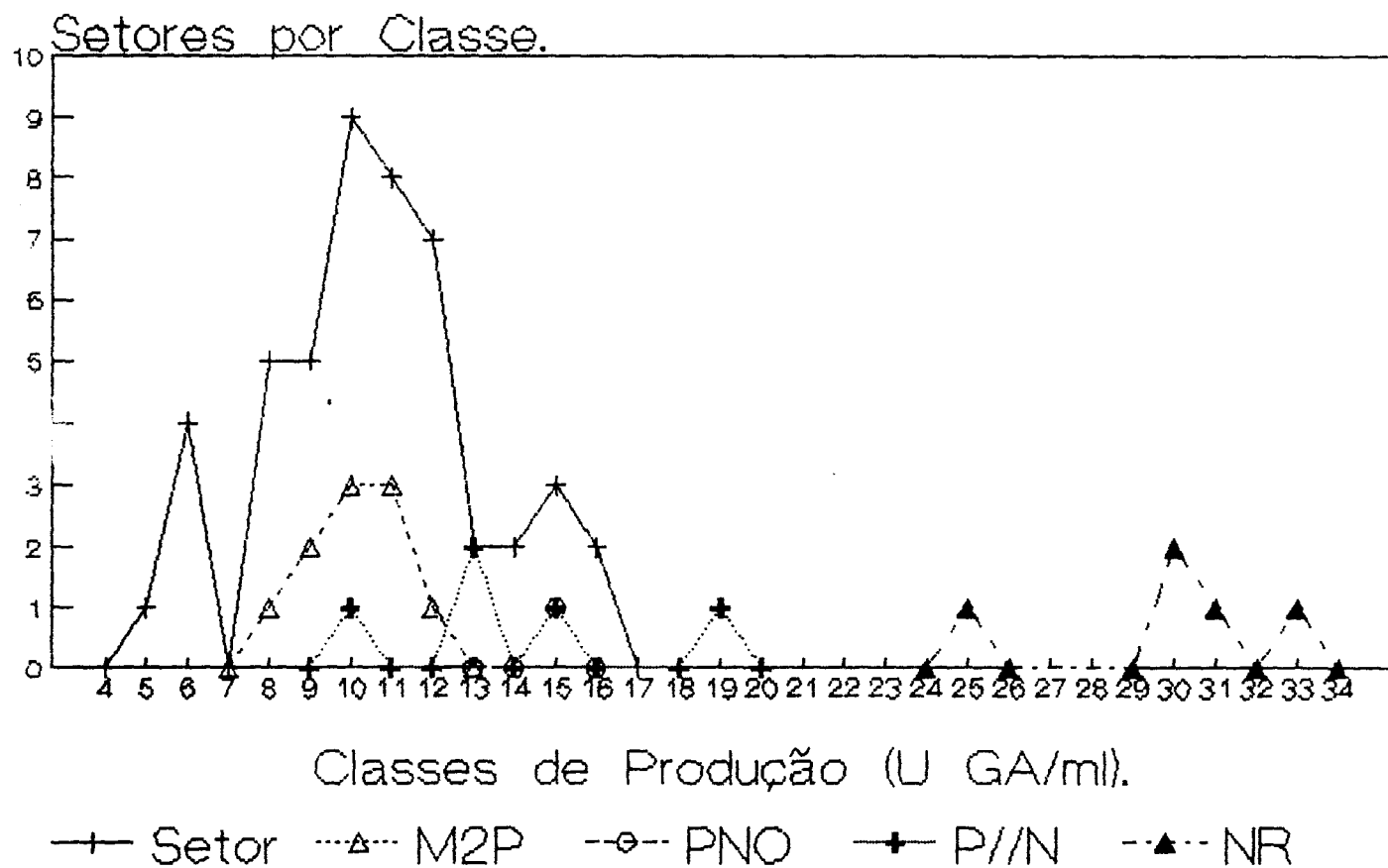


FIGURA 4 Distribuição da produção de glicoamilase dos setores, linhagens parentais do híbrido $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_2$ e as linhagens controle PF//NO (P//N) e NRRL 3112 (NR).

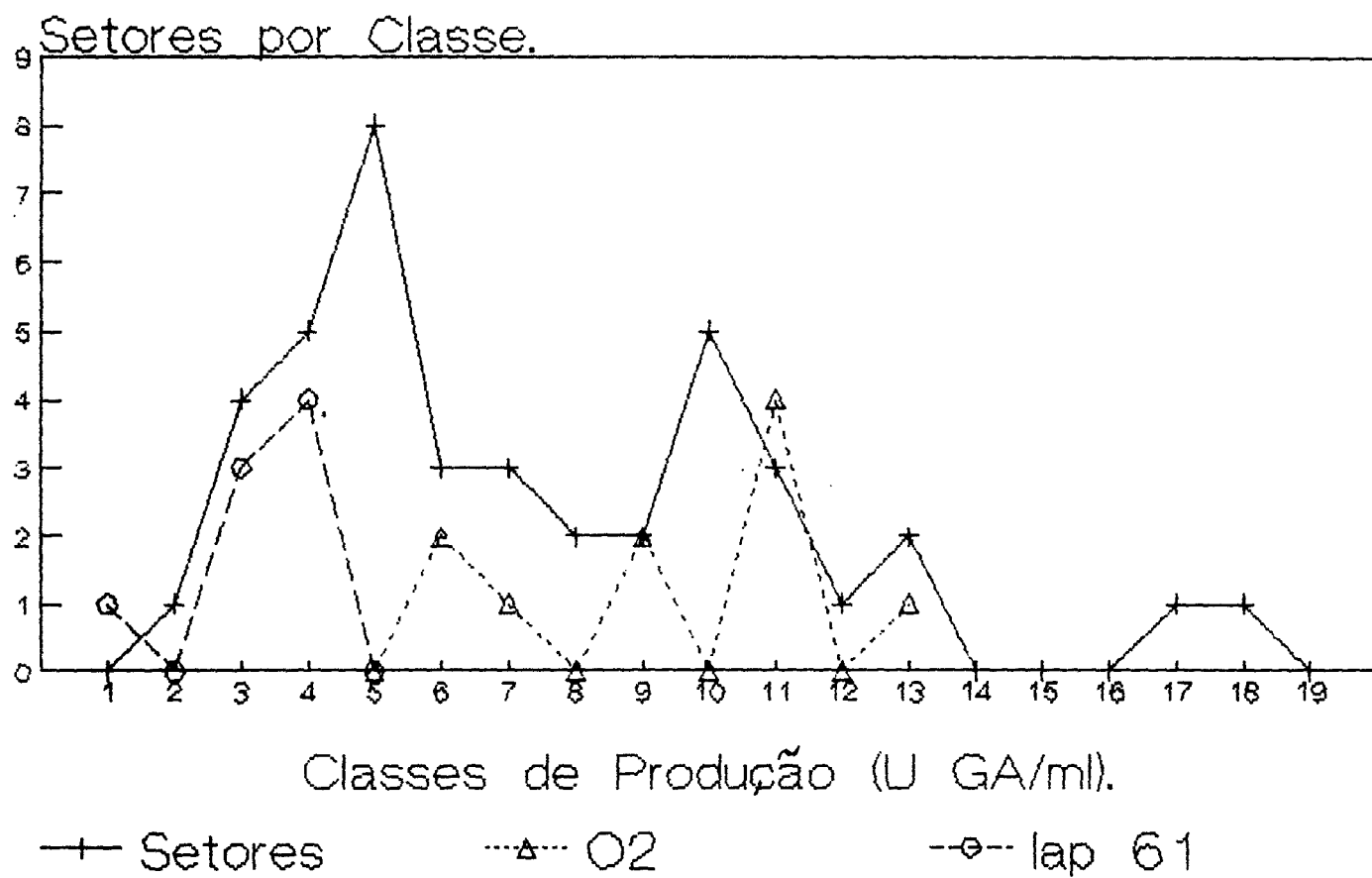


FIGURA 5 Distribuição da produção de glicoamilase dos setores e linhagens parentais do híbrido O2//lap 61(B).

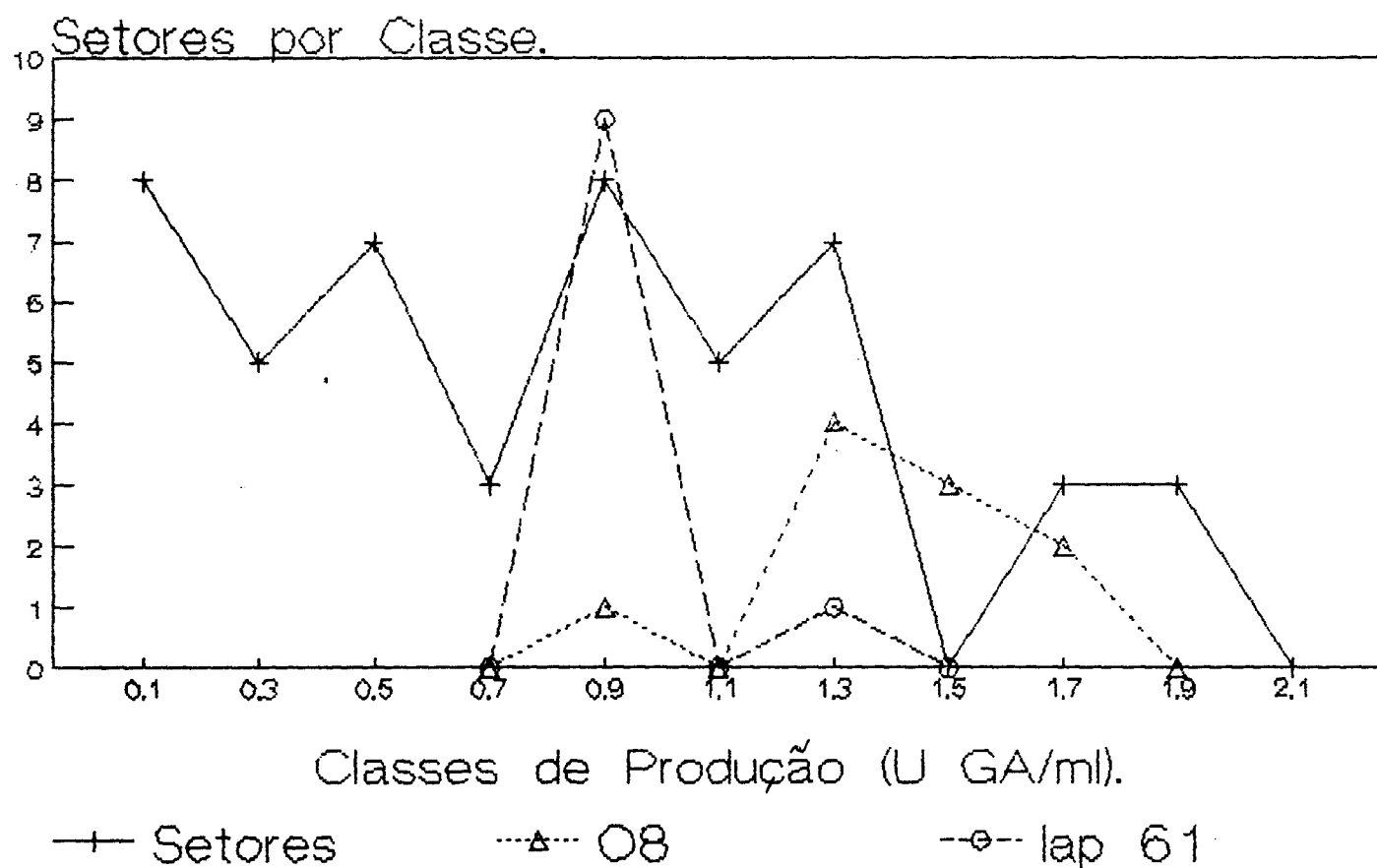


FIGURA 6 Distribuição da produção de glicoamilase dos setores e linhagens parentais do híbrido O8//lap 61.

pela média dos setores ser inferior à média da parental de menor produção (lap 61). Outro fato adicional é a produção da linhagem 08 de *A. awamori*. Nos experimentos de VIALTA (1987), foi observada uma produção ao redor de 7 U GA/ml, produção essa nunca obtida por nós no presente trabalho. Pelo contrário, sua produção foi sempre no nível da linhagem de *A. niger* lap 61. Todos esses resultados sugerem que a linhagem de *A. awamori* deve carrear alguma outra alteração adicional, influenciando na produção de glicoamilase. A presença de tal alteração pode explicar perfeitamente a tendência a baixa produção observada nos setores recuperados desse híbrido. De qualquer modo, se tal alteração existir, ela deve ser complementada por algum equivalente de *A. niger* pois não se observa diferença significativa entre a produção deste em relação aos outros híbridos do tipo $lgp^-//lgp^+$.

4.5 TESTE DE FORMAÇÃO DE HALOS DE HIDRÓLISE

Foram realizados experimentos de formação de halos de hidrólise em amido (MMA) e em proteína (MSK) com o objetivo de se evidenciar um possível distúrbio no processo geral de secreção (TABELAS 20 e 21). Todas as linhagens estudadas de *A. awamori*, apresentaram halos de hidrólise tanto em amido quanto em proteína. No caso da linhagem NRRL 3112, esta não apresentava halo em proteína em 48 hs de cultivo, entretanto, quando cultivada por 72 hs, esse assumia um valor semelhante ao das outras linhagens. Essas linhagens, quando cultivadas na presença de Triton X-100 (MMA+TX100 e MSK+TX100), apresentaram um aumento significativo no halo.

TABELA 20 Relação entre diâmetro do halo de hidrólise / diâmetro da colônia em MMA, com (c/TX) e sem (s/TX) Triton-X100, quando as linhagens foram cultivadas à 30°C e, posteriormente, transferidas para 4°C.

	72hs / 30°C		48hs / 4°C	
Linhagens	s/ TX	c/ TX	s/ TX	c/ TX
NRRL 3112	1,30	3,57	1,80	3,85
M2P	3,00	3,50	2,88	3,85
08	2,26	3,30	1,71	3,60
02	1,75	3,50	1,95	3,78
lap 05	1,00	1,00	1,00	1,00
lap 61	1,00	1,70	1,27	1,92
lap 73	1,00	1,00	1,00	1,00
SV-24	1,00	1,00	1,00	1,61
pab fwn	1,11	1,75	1,29	2,20
snu-	0,00	0,00	0,00	0,00
pab nic olv	1,00	1,00	1,00	1,00
08//lap 61	1,00	2,75	1,44	3,87
M ₂ P//SV-24(A)	1,11	2,10	1,73	--
M ₂ P//SV-24(B)	1,22	1,16	1,44	--
02//lap 61(A)	1,17	3,57	1,28	3,66
02//lap 61(B)	1,14	3,28	1,61	3,86
M ₂ P//PNO	1,30	2,88	1,56	3,82

TABELA 21 Relação entre diâmetro do halo de hidrólise / diâmetro da colônia em MSK, com (c/TX) e sem (s/TX) Triton-X100 quando linhagens foram cultivadas à 30°C e, posteriormente, transferidas para 4°C.

	48hs / 30°C		72hs/30°C	48hs / 4°C	
Linhagens	s/ TX	c/ TX	c/ TX	s/ TX	c/ TX
NRRL 3112	1,00	1,00	1,67	1,00	1,00
M2P	1,37	1,00	--	1,75	1,00
08	1,00	1,00	--	1,00	1,00
02	1,37	1,00	--	1,00	1,00
lap 05	1,41	1,00	2,28	2,00	4,00
lap 61	1,27	1,00	2,61	2,00	3,50
lap 73	1,37	1,00	2,22	1,75	2,66
SV-24	1,36	1,00	2,22	2,00	2,50
pab fwn	1,42	1,40	2,46	2,00	4,66
snu ⁻	1,47	2,12	2,18	1,80	--
pab nic olv	1,66	1,75	2,30	1,87	3,00
nic olv	1,30	1,00	2,83	2,72	4,00
08//lap 61	1,57	2,66	2,40	1,00	3,00
M ₂ P//SV-24(A)	1,00	1,00	1,00	1,00	2,25
M ₂ P//SV-24(B)	1,27	1,00	1,00	1,00	2,25
02//lap 61(A)	1,13	1,22	1,77	--	1,66
02//lap 61(B)	1,33	2,00	2,50	--	2,66
M ₂ P//PNO	1,64	--	--	1,54	2,50

No caso das linhagens de *A. niger*, nem todas as linhagens responderam da mesma forma. Linhagens como lap 05, SV-24, pabA₁nicA₁olvA₃ e lap 73 não apresentaram halo de hidrólise em amido nem mesmo na presença do Triton X-100. A linhagem lap 61 não apresenta halo de hidrólise em amido sem o Triton X-100, entretanto, quando esse é adicionado ao meio de cultura, essa passa a apresentar um halo nas mesmas dimensões da parental pabA₁fwnA₁. Tais dados podem, talvez, sugerir um possível problema de secreção nessa linhagem, entretanto, tais conclusões precisam de uma melhor caracterização experimental.

No que diz respeito à formação de halos de hidrólise em proteína, as linhagens de *A. niger* se comportaram de modo semelhante às linhagens de *A. awamori*, sugerindo que, se existe algum problema de secreção, esse deve ser restrito à glicoamilase. A linhagem 08, nos resultados apresentados não evidencia formação de halo em 48hrs, entretanto em outro experimento ela atingiu o valor de 1,15 (TABELA 22).

Para nos certificarmos que o halo observado em MSK e MSK+TX100 era realmente devido à proteases sendo secretadas, foi feito um cultivo em MSK na presença de 0,6% de nitrato de sódio, como fonte inorgânica de nitrogênio. Os resultados apresentados na TABELA 22 confirmam a esperada repressão pelo nitrogênio (COHEN, 1972,1981).

Outro fato interessante é que, cultivos com 72hs de incubação em MMA, quando estocados à 4°C por 48hrs apresentaram um aumento significativo no halo de hidrólise, sendo que não foi constatada uma variação no diâmetro das colônias durante o período de estocagem.

TABELA 22 Relação entre o diâmetro do halo de hidrólise / diâmetro da colônia em linhagens crescidas em MSK e MSK sem nitrogênio (MSKN) após crescimento à 30°C por 48hs e posterior estocagem à 4°C por 48hs.

	30°C		4°C	
Linhagens	MSK	MSKN	MSK	MSKN
M ₂ P	1,37	0	1,81	0
08	1,15	0	1,50	0
02	1,32	0	1,83	0
lap 61	1,33	0	2,14	0
lap 05	1,34	0	2,04	0
SV-24	1,26	0	1,93	0
NRRL 3112	1,00	0	1,75	0
M ₂ P//SV-24(A)	1,21	0	1,92	0
M ₂ P//SV-24(B)	1,20	0	1,72	0

Resultados semelhantes foram observados para os cultivos em MSK (TABELAS 20 e 21).

Testando-se preparações comerciais puras de α -amilase e glicoamilase em placas com MMA em 30°C e 4°C (TABELA 23), constatamos que realmente existe atividade de ambas as enzimas, o que foi confirmado através do método de glicose oxidase. Nas regiões onde havia o halo de glicoamilase, constatou-se cerca de 1000mg/100ml de glicose e, nas regiões de α -amilase, 500mg/100ml (TABELA 23). O que causa o aumento do halo à 4°C pode ser devido a três possíveis hipóteses:

- i- maior degradação devido a um maior tempo de incubação;
- ii- desestabilização da parede celular, gerando uma menor retenção das enzimas no espaço periplásmico (VAISNTEIN e PEBERDY, 1990);
- iii- as duas hipóteses anteriores simultaneamente.

Em função dos resultados obtidos parece mais plausível a terceira hipótese apresentada, visto que não houve uma variação proporcional dos halos à 4°C, o que seria esperado se somente a primeira hipótese fosse verdadeira. A variação observada pode então ser explicada ou por uma variação da quantidade de enzima no periplasma, ou por uma retenção diferencial das enzimas entre as

TABELA 23 Formação de halos de hidrólise em MMA por soluções puras das enzimas glicoamilase (GA) e α -amilase (Amil).

Temp. incub.	30°C					4°C				
Vol. (uL)	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1
GA.	1,9	1,8	1,7	1,6	1,6	1,4	1,3	1,2	1,3	1,1
GA 4°C/30°C						0,7	0,7	0,7	0,7	0,7

Vol. (uL)	5	4	2,5	1,5	0,65	5	4	2,5	1,5	0,6
Amil.	2,5	2,4	2,3	2,3	2,2	1,7	1,7	1,6	1,6	1,5
Amil 4°C/30°C						0,7	0,7	0,7	0,7	0,7

GA (30°C): Corr = 0,99

(4°C) : Corr = 0,99

Amil. (30°C): Corr = 0,97

(4°C) : Corr = 0,98

linhagens, que pode ser causada por diferenças estruturais à nível de parede celular entre as linhagens, como também ambos os fatores simultaneamente.

Mutações que afetam a composição da parede celular influenciando a secreção de enzimas extracelulares foram descritas anteriormente. *TREVITHICK* e *METZENBEG* (1966a,b) observaram que mutantes osmóticos isolados mostravam que a invertase total secretada estava inversamente correlacionada com o grau de fracionamento entre o monômero ativo e os agregados da enzima, e que isso poderia ser devido a mudanças na composição química da parede celular.

GRATZNER (1972) descreveu a mutação exo-1 em *Neurospora crassa* que alterava os níveis de várias enzimas extracelulares associadas com a degradação de glucanas e sacarídeos em geral, entretanto, não parecia alterar o nível de proteases extracelulares.

MURAYAMA e *ISHIAWA* (1973) observaram que a mutação *T9* em *N. crassa* alterando a parede celular, também alterava os níveis de enzimas extracelulares. As mutações *T9* e exo1 não foram avaliadas em teste de complementação.

Tudo isso nos leva a crer que, em nossos mutantes, temos um problema específico da glicoamilase, visto que as outras enzimas extracelulares encontram-se em níveis aparentemente normais.

5. CONCLUSÕES

- 1- A viabilidade dos protoplastos de *A. niger* parece ser de vital importância para a eficiente recuperação de produtos de fusão entre esta espécie e *A. awamori*.
- 2- A cariogamia entre as duas espécies estudadas parece disparar um mecanismo de instabilidade, o qual culmina em pelo menos duas formas, A e B, as quais são distintas morfológica e geneticamente.
- 3- A análise genética dos híbridos demonstrou que não há um padrão fixo de segregação das marcas o qual pode variar de 1:1 até 3:1, entretanto, sempre favorecendo as combinações parentais. Adicionalmente, constatou-se ligação entre os alelos *argB* e *pabA*.
- 4- Os híbridos do tipo B, juntamente com o 08//lap 61 e o $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_2$, parecem serem homozigotos para o alelo *cspA*₁, sugerindo um possível mecanismo de origem comum para esses variantes morfológicos.
- 5- O alelo *cspA*₁ demonstrou continuar sendo recessivo, mesmo tratando-se de cruzamentos interespecíficos, o que sugere que o alelo mutante ocasiona algum tipo de bloqueio no desenvolvimento normal dos conidióforos.
- 6- A alta frequência de setores carreando os marcadores selvagens para

aminoácidos, sugere que deve ter ocorrido uma deficiência na suplementação do MC ou incompatibilidade de alguns grupos de ligação. Ambos os fenômenos podem explicar os dados observados.

7- A quantificação da enzima glicoamilase nos híbridos sugere uma possível dominância dos fatores de *A. niger* sobre os de *A. awamori* ($M_2P//pabA_1nicA_1olvA_3$) ou ainda uma repressão alélica dos fatores de *A. niger* sobre os de *A. awamori*.

8- O teste de produção de enzima pelos setores sugerem que os marcadores envolvidos não afetam pleiotropicamente a produção e que não há ligação entre estes genes e os de produção em ambas as espécies. Os resultados também sugerem que a produção de glicoamilase, nas espécies estudadas, é controlada por uma herança poligênica, sendo que, devido a incompatibilidade entre essas espécies, a recuperação de setores com produção similar à das linhagens selvagens parentais, em especial a NRRL 3112, é de baixa frequência.

9- Devido a algum problema adicional da linhagem 08, setores provenientes do híbrido 08//lap 61 tendem a se agrupar em classes de produção inferiores às de ambas as parentais. O suposto gene afetado encontra complementação no genoma de *A. niger*, visto que o híbrido apresenta média de produção no nível dos demais híbridos $lgp^-//lgp^+$ estudados.

11- Os halos de hidrólise sugerem que as linhagens apresentam bloqueio apenas em sua capacidade de produção de glicoamilase,

descartando-se a possibilidade de um bloqueio geral na secreção de enzimas extracelulares.

6. ABSTRACT

- 1- The viability of *A. niger* protoplasts seems to be essential to an efficient recovery of fusion products between this kind of specie and *A. awamori*.
- 2- The nuclei fusion between both species studied seem to have as consequence a mechanism of instability that produce, at least, two kinds of forms (A and B) which could be geneticly and morphologicly different.
- 3- The genetic study of the hybrids showed that the rate of markers segregation is no constant, and that it could change from 1:1 until 3:1, although, always favorable to parental type. Additionally that, we realize a linkage between *argA* *pabA* loci.
- 4- The hybrid of type B, together with 08//lap61 and $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_1$, showed to be homozigous for *cspA₁*. This could suggest a mechanism of common origin for this morphologic types. Such gene showed to continue being recessive, eventhough it was interespecific crosses.
- 5- The high frequency of segregants carrying wild markers for aminoacid suggest that could happend a defficience on the supplementation on CM or incompatibility of some linkage groups. Both phenomena could explain the observed results.

- 6- The enzyme assay showed that in hybrids should be possible that the *A. niger* elements could be dominant in relation with the *A. awamori*. Such results suggest an allelic repression of *A. niger* elements related to *A. awamori*.
- 7- The enzyme assay of segregants showed that the markers involved do not affect pleiotropically the production and that there is no link between such genes and production ones. The results also suggest that the production of glucoamylase is controlled by a poligenic inheritance and that the recovery of segregants with same production of parental strains, especially NRRL 3112, is in a lower frequency probably in the reason of the incompatibility between such species.
- 8- The hydrolysis halos suggest that the strains seems to present a block only in its capacity of glucoamylase production, and not in all extracellular enzymes.

7. BIBLIOGRAFIA

- ANNÉ, J.; PEBERDY, J. F. 1975. Conditions for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol. *Archives of Microbiology*, 105: 201-205.
- ANNÉ, J.; PEBERDY, J. F. 1976. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. *Journal of General Microbiology*, 92: 413-417.
- AZEVEDO, J. L.; COSTA, S. O. P. 1973. Exercícios práticos de genética. Ed. da Universidade de São Paulo. São Paulo. 288 p.
- BACHMANN, B. J.; BONNER, D. M. 1959. Protoplast from *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 78: 550-556.
- BHELLA, R. S.; ALTOSAAR, I. 1987. Production of multiple forms of glucoamylase in *Aspergillus awamori*. *Biochem. Cell Biol.*, 65: 762-765.
- BHELLA, R. S.; ALTOSAAR, I. 1988. Role of cAMP in the mediation of glucose catabolite repression of glucoamylase synthesis in *Aspergillus awamori*. *Curr. Genet.*, 14: 247-252.
- BINDING, H. 1974. The isolation, regeneration and fusion of *Phicomycetes* protoplasts. *Mol. Gen. Genet.*, 135: 273-276.

- BOEL, E.; HJORT, I.; SVENSON, B.; NORRIS, F.; NORRIS, K. E.; FILL, N. P. 1984a. Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *The EMBO Journal*, 3: 1097-1102.
- BOEL, E.; HANSEN, M. T.; HJORT, I.; HØEGH, I.; FILL, N. P. 1984b. Two different types of intervening sequences in the glucoamylase gene from *Aspergillus niger*. *The EMBO Journal*, 3: 1581-1585.
- BOLD, H. C. 1976. O reino vegetal. Ed. Edgar Blücher Ltda. 2ª Ed. São Paulo.
- BONATELLI JR., R. 1981. Parasexualidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba. ESALQ/USP. 91p. Tese de Doutorado.
- BONATELLI JR., R.; AZEVEDO, J. L.; VALENT, G. U. 1983. Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. *Rev. Brasil. Genet.* 4: 399-405.
- BONATELLI JR., R.; VALENT, G. U.; MASIERO, M.; VIALTA, A.; CALIL, M. R. 1984. Genetic of amyloglucosidase production in *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori*. IN: Japan-Brazil symposium on science and technology, 4. Rio de Janeiro, 2: 34-41.
- BOS, C. J.; DEBETS, A. J. M.; SWART, K.; HUYBERS, A.; KOBUS, G.; SLAKHORST, S. M. 1988. Genetic analysis and the construction of master strains of assignment of genes to six linkage groups in *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.* 14: 437-443.

- BOS, C. J.; DEBETS, A. J. M.; KOBUS, G.; SLAKHORST, S. M.; SWART, K. 1989. Adenine and pyrimidine genes of *Aspergillus niger* and evidence for a seventh linkage group. *Curr. Genet.* 16: 307-310.
- BRADSHAW, R. E.; PEBERDY, J. F. 1984. Aspects of penicillin production in *Aspergillus* hybrids. *Enz. Microbiol. Technol.* 6: 121-126.
- BÜRCHERL, W. 1962. Técnica microscópica. Ed. Polígono Ltda. São Paulo. 164 p.
- CALIL, M. R. 1988. Isolamento e análise genética de mutantes de *Aspergillus niger* com aumento na produção de amiloglicosidade. Campinas. UNICAMP. 144p. Tese de Mestrado.
- COHEN, B. L. 1972. Ammonium repression of extracellular protease in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 71: 293-299.
- COHEN, B. L. 1981. Regulation of protease production in *Aspergillus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 76: 447-450.
- CONSTABEL, F.; KAO, K. N. 1974. Agglutination and fusion of plant protoplasts by polyethylene glycol. *Can. J. Bot.* 52: 1603-1608.
- DAS, A.; GHOSH, A. 1989. Breeding by protoplast fusion for glucoamylase production. *Biotechnol. letters*, 2: 705-708.
- DAS, A.; GOKHALE, D. V.; PEBERDY, J. F. 1989. Protoplast fusion and

genetic recombination in intra and inter strain crossing in *A. niger*. *Enzyme Microb. Technol.*, 11: 2-5.

DEBETS, A. J. M.; HOLUB, E. F.; SWART, K.; van den BROEK, H. W. J.; BOS, C. J. 1990a. An electrophoretic karyotype of *Aspergillus niger*. *Mol. Gen. Genet.*, 224: 264-268.

DEBETS, A. J. M.; SWART, K.; BOS, C. J. 1990b. Genetic analysis of *Aspergillus niger* isolation of chlorate resistance mutants, their use in mitotic mapping and evidence for an eighth linkage group. *Mol. Gen. Genet.*, 221: 453-458.

DE MOT, R.; VAN OUDENBUCK, E.; VERACHTERT, H. 1985. Purification and characterization of an extracellular glucoamylase from the yeast *Candida tsukubaensis* CBS 6389. *Antonie van Leeuwenhoek*, 51: 275-287.

DE MOT, R.; VERACHTERT, H. 1986. *Can. J. Microbiol.*, 32: 47-51.

DE VRIES, O. M. H.; WESSELS, G. H. 1973. Release of protoplast from *Schizophyllum commune* by combined action of purified α -1,3-glucanase and chitinase derived from *Trichoderma viride*. *J. Gen. Microbiol.*, 76: 319-330.

DIXON, M.; WEBB, E. C. 1962. *Enzymes*. Longmans Ed., 2nd ed. London. 193p.

DOWHANICK, T. M.; RUSSEL, I.; SCHERER, S. W.; STEWART, G. G.; SELIGY, V. L. 1990. Expression and regulation of glucoamylase from the

- yeast *Schwanniomyces castelli*. *J. Bacteriology*, 172: 2360-2366.
- EDDY, A. A.; WILLIAMSON, D. H. 1959. Formation of aberrant cell walls and spores by the growing yeast protoplast. *Nature*, 183: 1101-1104.
- EDDY, A. A.; WILLIAMSON, D. H. 1957. A method of isolation protoplast from yeast. *Nature*, 179: 1252-1253.
- FERECZY, L.; KEVEI, F.; ZSOLT, J. 1974. Fusion of fungal protoplast. *Nature*, 238: 793-794.
- FERENCZY, L.; SZEGEDI, M.; KEVEI, F. 1977. Interspecific protoplast fusion and complementation in *Aspergilli*. *Experientia*, 33: 184-187.
- FINCH, P.; LEONARD, P. A. 1978. Comparative studies on glucoamilase isolated from a strain of *Aspergillus*. *Starch/Starke*, 30: 341-345.
- FLEMING, J. D.; STONE, B. A. 1965. Fractionation of *Aspergillus niger* glucoamylase. *The Bioch. J.*, 97: 13.
- FOWLER, T.; BERKA, R. M.; WARD, M. 1990. Regulation of the *glaA* gene of *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.*, 18: 537-545.
- FREEDBERG, I. M.; LEVIN, Y.; KAY, C. M.; McCUBBIN, W. D.; KATCHALSKI-KARIR, E. 1975. Purification and characterization of *Aspergillus niger* exo 1,4-glucosidase. *Bioch. Biophys., Acta* 391:

- FUNGARO, M. H. P. 1984. Caracterização genética e dados citológicos em *Aspergillus niger* van Tieghem e *Aspergillus awamori* Nakazawa. Piracicaba. ESALQ/USP. 134p. Tese de Mestrado.
- GHOSH, A.; CHATTERJEE, B.; DAS, A. 1990. Induction and catabolite repression of high-affinity glucoamylase in *Aspergillus terreus* strain 4. *J. Gen. Microbiol.*, 136: 1307-1311.
- GRATZNER, H. G. 1972. Cell wall alterations associated with the hyperproduction of extracellular enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, 111: 443-446.
- HAMLYN, P. F.; BRADSHAW, R. E.; MELLON, G. M.; SANTIAGO, C. M.; WILSON, J. M.; PEBERDY, J. F. 1981. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enz. Microb. Technol.*, 3: 321-325.
- HASTIE, A. C. 1970. Benlate induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, 226: 771.
- HAYASHIDA, S. 1975. Selective productions of three types of glucoamylases by a Black-Koji mold. *Agric. Biol. Chem.*, 39: 2093-2099.
- HAYASHIDA, S.; KURODA, K.; OHTA, K.; KUHARA, S.; FUKUDA, K. 1989. Molecular cloning of the *Aspergillus awamori* var Kawachi

for localization of the raw starch affinity site. *Agric Biol. Chem.*, 53: 923-924.

HAYASHIDA, S.; NAKAHARA, K.; KURODA, K.; KAMACHI, T.; OHTA, K.; IWANAGA, S.; MIYATA, T.; SAKAKI, Y. 1988. Evidence for post-translational generation of multiple forms of *Aspergillus awamori* var *Kawachi*. *Agric. Biol. Chem.*, 52: 273-275.

HOFFMANN, M.; ZIMMERMANN, M.; EMEIS, C. C. 1987. Orthogonal field alternation gelelectrophoresis (OFAGE) as a mean for the analysis of somatic hybrids obtained by protoplast fusion of different *Saccharomyces* strains. *Curr. Genet.*, 11: 599-603.

HOSCHKE, Á.; LÁSLÓ, e.; HOLLÓ, J. 1980. A study of the role of tyrosine groups at the active centre of amylolytic enzymes. *Carbohydrate Research*, 81: 157-166.

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.

KEVEI, F.; PEBERDY, J. F. 1977. Interespecific hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplasts. *J. Gen. Microbiol.*, 102: 255-262.

KIRIMURA, K.; YAGUSHI, T.; USAMI, S. 1986. Intraspecific protoplast

fusion of citric acid-producing strains of *Aspergillus niger*.
J. Ferment. Technol., 64: 473-479.

KIRIMURA, K.; IMURA, M.; KATO, Y.; LEE, S. P.; USAMI, S. 1988a.
Intergeneric protoplast fusion between *Aspergillus niger*
and *Trichoderma viride*. *Agric. Biol. Chem.*, 52: 1327-1329.

KIRIMURA, K.; LEE, S. P.; NAKAJIMA, I.; KAWABE, S.; USAMI, S. 1988b.
Improvement in citric acid production by haploidization of
Aspergillus niger diploids strains. *J. Ferment. Technol.*, 66:
375-382.

KIRIMURA, K.; NAKAJIMA, I.; LEE, S. P.; KAWABE, S.; USAMI, S. 1988c.
Citric acid production by the diploid strains of *Aspergillus niger*
obtained by protoplast fusion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27:
504-506.

KIYOHARA, H.; WATANABE, T.; IMAI, J.; TAKIZAWA, N.; HATTA, T.; NAGAO,
K.; YAMAMOTO, A. 1990. Intergeneric hybridization between *Monascus*
anka and *Aspergillus oryzae* by protoplast fusion. *Appl. Microbiol.*
Biotechnol., 33: 671-676.

KRZECZOWSKA, M.; URBANEK, H. 1975. Isolation and some properties of
glucoamylase from *Cephalosporidium charticola* Lindau.
Appl. Microbiol., 30: 163-166.

LINEBACK, D. R. 1968. The carbohydrate-polypeptide linkage in a fungal
glucoamylase. *Carbohydrate Research*, 7: 106-108.

- LOPEZ-BELMONTE, F.; ACHA, I. G.; VILLANUEVA, J. R. 1986. Observations on the protoplasts of *Fusarium culmorum* and their fusion. *J. Gen. Microbiol.*, 45: 127-134.
- MANJUNATH, P.; RAO, M. R. R. 1980. Immunochemical relationship between glucoamylase I and II of *Aspergillus niger*. *J. of Bioscience*, 2: 163-169.
- MATSUMURA, M.; HIRATA, J.; ISHII, S.; KOBAYASHI, J. 1988. Kinetics of saccharification of raw starch by glucoamylase. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 42: 51-67.
- MEDDA, S.; SAHA, B. C.; UEDA, S. 1982. Glucoamylase I of black *Aspergillus*. *J. Fac. Agric.*, 26: 139-149.
- MEDDA, S.; SAHA, B. C.; UEDA, S. 1981. Raw starch adsorption and elution behaviour of glucoamylase I of black *Aspergillus* and its modification by alkaline protease. *Annual Reports of International Center of Cooperative Research and Development in Microbial Engineering. Japan*, 4: 211-229.
- MELLON, F. M. 1985. Protoplast fusion and hybridization in *Penicillium*. In: TIMBERLAKE, W. E. (ed). *Molecular genetics of filamentous fungi*. Alan R. Liss, Inc. New York, USA. p. 69-82.
- MIHA, M. N. N.; UEDA, S. 1977a. Multiplicity of glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. Part 1. *Starch*, 29: 191-196.

- MIHA, M. N. N.; UEDA, S. 1977b. Multiplicity of glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. Part II. *Starch*, 29: 235-239.
- MILLS, D.; McCLUSKEY, K. 1990. Electrophoretic karyotypes of fungi. The new cytology. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 3: 351-357.
- MONTENECOURT, B. S.; EVELEIGH, D. E. 1985. Fungal carbohydrases: Amylases and cellulases. In: BENNET, J.W.; LASURE, L. L. Gene manipulations in fungi. Academic Press, Inc., USA. p. 491-512.
- MURAYAMA, T.; ISHIKAWA, T. 1973. Mutation in *Neurospora crassa* affecting some of the extracellular enzymes and several growth characteristics. *J. Bacteriol.*, 115: 796-804.
- NUNBERG, J. H.; MEADE, J. H.; COLE, G.; LAWYER, F. C.; McCABE, P., SCHWEICKART, V.; TAL, R.; WITTMAN, V. P.; PLATGAARD, J. E.; INNIS, M. A. 1984. Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of *Aspergillus awamori*. *Molecular and Cellular Biology*, 4: 2306-2315.
- OGAWA, K.; TSUCHIMUCHI, M.; TANIGUCHI, K. 1989. Interspecific hybridization of *Aspergillus usami* mut. shirousamii and *Aspergillus niger* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.*, 53: 2873-2880.
- OLIVEIRA, A. L. Z. G.; BONATELLI JR., R. 1991. Software básico para

auxiliar análise genética em fungos filamentosos. *Anais da 17ª Reunião Anual de Genética de Microrganismos*. Brasília, DF. 17: A25.

ONO, K.; SHINTANI, K.; SHIGETA, S.; OKA, S. 1988. Comparative studies of various molecular species in *Aspergillus niger* glucoamylase. *Agric. Biol. Chem.*, 52: 1699-1706.

PEBERDY, J. F. 1979a. Wall biogenesis by protoplast. In: BURNETT e TRINCI (eds.). *Fungal walls and hyphal growth*. Cambridge University Press. British Mycological Society. Great Britain. p 49-70.

PEBERDY, J. F. 1979b. New approaches to gene transfer in fungi. In: SEBEK, O. K.; LASKIN, A. I. *Genetics of industrial microorganism*. Ed. American Society for Microbiology. Washington D.C. p. 192-196.

PEBERDY, J. F. 1980. Protoplast fusion - A tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. *Enz. Microbiol. Technol.*, 2: 23-29.

PERBERDY, F. F. 1989. Presidential address: Fungi without coats - protoplasts as tools for mycological research. *Mycol. Res.*, 93: 1-20.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; FORBES, E. 1953a. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.*, 8: 198-210.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D.;

- BUFTON, W. J., 1953b. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5: 141-238.
- PRETORIUS, I. S.; MAMUR, J. 1988. Localization of yeast glucoamylase genes by PFGE and OFAGE. *Curr. Genet.*, 14: 9-13.
- PRIEST, P. G. 1984. Extracellular enzymes. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- PRZYBYT, M.; SUGIER, N. 1988a. The properties of glucoamylase soluble and immobilized on DEAE-cellulose. Part I. Kinetics and thermodynamics of enzyme reaction. *Starch*, 40: 108-111.
- PRZYBYT, M.; SUGIER, N. 1988b. The properties of glucoamylase soluble and immobilized on DEAE-cellulose. Part II. Thermostability of glucoamylase. *Starch*, 40: 171-174
- PUNT, P. J.; ZEGERS, N. D.; BUSSHER, M.; POWELS, P. H.; van den HONDEL, C. A. M. J. J. 1991. Intracellular and extracellular production of proteins in *Aspergillus* under the control of expression signal of the highly expressed *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene. *J. Biotechnol.*, 17: 19-34.
- RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. 1965. The genus *Aspergillus*. Baltimore, Williams & Wilkens Co. 686 p.
- RAMASESH, N.; SREEKANTIAH, H. R.; MURTHY, V.S. 1982. Studies on the two forms of amyloglucosidase of *Aspergillus niger* van Tieghem.

- RAZZAQUE, A.; UEDA, S. 1978. Glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.*, 56: 296-302.
- SAHA, B. C.; MITSUE, T.; UEDA, S. 1979. Glucoamylase produced by submerged culture of *Aspergillus oryzae*. *Starch*, 31: 307-314.
- SAHA, B. C.; UEDA, S. 1983. Raw starch digestion inhibitory factor in one glucoamylase preparation of black *Aspergillus*. *Agric. Biol. Chem.*, 47: 2773-2779.
- SAHA, B. S.; ZEIKUS, J. G. 1989. Microbial glucoamylases: Biochemical and biotechnological features. *Starch/Starke*, 41: 57-64.
- SCHIMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. 1984. Production of extracellular enzymes: amyloglucosidases. *IV Nipo-Brasileiro Symposium on Science and Technology*. São Paulo. August 6-10.
- SIETSMA, J. H.; EVELEIGH, D. E.; HASKINS, R. H.; SPENCER, J. F. T. 1967. Protoplast from *Phytium* sp. PRL2142. *Can. J. Botany*, 13: 1701-1704.
- SVENSON, B.; LARSEN, K.; GUNNARSSON, A. 1986. Characterization of a glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.*, 154: 497-502.
- SVENSON, B.; PEDERSEN, T. G.; SVENDSEN, I.; SAKAI, T.; OTTESEN, M.

1982. Characterization of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Research Communications*, 47: 55-59.
- SVOBODA, A. 1978. Fusion of yeast protoplast induced by polyethylene glycol. *J. Gen. Microbiol.*, 109: 169-175.
- TAKAHASHI, T.; TSUSHIDA, Y.; IRIE, M. 1978. Purification and some properties of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* species. *J. Biochem.*, 84: 1183-1194.
- TAKEGAWA, K.; KAWASAKI, N.; IWAHARA, S.; YAMAMOTO, K.; TOCHIKURA, T.; MIKAMI, B.; MORITA, Y. 1989. Primary structure of an N-linked sugar chain derived from glucoamylase of *Rhizopus niveus*. *Bioch. Biophys. Acta*, 990: 98-100.
- TOWPRAYOON, S.; SAHA, B. C.; FUJIO, Y.; UEDA, S. 1988. Some characteristics of a raw starch digestion inhibitory factor from *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 289-291.
- TREVITHICK, J. R.; METZENBERG, R. L. 1966. Molecular sieving by *Neurospora* cell walls during secretion of invertase isoenzymes. *J. Bacteriol.*, 92: 1010-1015.
- TREVITHICK, J. R.; METZENBERG, R. L. 1966. Genetic alteration of pore size and other properties of the *Neurospora* cell wall. *J. Bacteriol.*, 92: 1016-1020.
- TSUBOI, A.; YANASAKI, Y.; SUZUKI, Y. 1974. Two forms of glucoamylase

from *Mucor rouxianus*. 1. Purification and crystalization. *Agric. Biol. Chem.*, 38: 543-550.

UEDA, S. 1957. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*. 21: 379-385.

UEDA, S.; SAHA, B. C. 1980. Inhibition of raw starch digestion by one glucoamylase preparation from black *Aspergillus* at high enzyme concentration. *Starch/Stark*, 32: 420-423.

VAINSTEIN, M.; PEBERDY, J. F. 1990. Solubilisation of a cell wall bound invertase in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*, 71: 265-270.

VALENT, G. U. 1985. Isolamento e análise gentica de mutantes com alteração na produção de amiloglicosidase em *Aspergillus niger*. Campinas. 107p. Tese de Mestrado. UNICAMP.

VAN BRUNT, J. 1986. Fungi: The perfect hosts ? *Bio/Technology*, 4: 1057-1062.

VIALTA, A. 1987. Genética e produção de amiloglicosidase em *Aspergillus awamori* e no híbrido interespecífico com *Aspergillus niger*. Campinas. 173p. Tese de Mestrado. UNICAMP.

VIALTA, A.; BONATELLI JR. R. 1990. Parasexual analysis of *Aspergillus awamori* by using intraespecific diploids and interespecifics híbrids with *A. niger*. *Rev. Brasil. Genet.*, 13: 445-458.

- WATANABE, K.; FUKINBARA, T. 1973. The composition of saccharogenic amylase from *Rhizopus javanicus* and the isolation of glucopeptides. *Agric. Biol. Chem.*, 37: 2755-2761.
- WARD, M.; WILSON, L. J.; KODAMA, K. H.; REY, M. W.; BERKA, R. M. 1990. Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Bio/Technology*. 8: 435-440.
- WARWAR, V. 1990. Parassexualidade e eletrofusão em *Aspergillus niger*. Tese de mestrado. ESALQ/USP. 134 p.
- WHITE, T. J.; MEADE, J. H.; SHOEMAKER, S. P.; KOTHS, K. E.; INNIS, M. A. 1984. Enzyme cloning for the food fermentation industry. *Food Technol.*, 2: 90-98.
- WILSON, A. C.; MAXSON, L. R.; SARICH, V. M. 1974a. Two type of molecular evolution. Evidence from studies of interespecific hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71: 2843-2847.
- WILSON, A. C.; SARICH, V. M.; MAXSON, L. R. 1974b. The importance of gene rearrangement in evolution: Evidence from studies on rates of chromosomal, protein and anatomical evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 71: 3028-3030.
- YOSHINO, E.; HAYASHIDA, S. 1978. Enzymatic modification of glucomylase of *Aspergillus awamori* var Kawachi. *J. Ferment. Technol.*, 56: 289-295.

- APÉNDICE -

TABELA A1 Análise das marcas auxotróficas morfológicas e produção de glicoamilase nos setores do híbrido 08//lap61.

Setor	argB ₂ [*]	proA ₁	pabaA ₁	scpA ₁	côr	UGA/ml
1	+	+	-	-	gre	1,8
2	-	-	+	-	gre	0,8
3	-	+	-	-	gre	0,6
4	-	+	-	-	gre	0,2
5	-	-	+	-	gre	0,9
6	-	-	-	-	gre	0,2
7	-	+	+	-	gre	0,6
8	+	+	-	-	gre	0,5
9	-	-	-	-	gre	1,0
10	-	-	+	-	gre	0,1
11	-	+	+	-	gre	0,7
12	+	+	-	-	gre	0,5
13	-	+	+	-	fwn	0,6
14	-	-	+	-	gre	0,9
15	+	+	-	-	gre	1,0
16	-	+	-	-	fwn	1,4
17	-	+	+	-	gre	1,8
18	+	-	+	-	gre	0,5
19	-	+	-	-	gre	0,8
20	-	-	+	-	gre	1,2
21	-	-	+	-	gre	0,0
22	-	-	+	-	gre	0,3
23	-	+	+	-	fwn	1,9
24	-	+	+	-	fwn	1,9

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA A2 Análise das marcas auxotróficas morfológicas e produção de glicoamilase nos setores do híbrido 08//lap 61,

Setor	argB ₂ *	proA ₁	pabaA ₁	scpA ₁	côr	UGA/ml
25	-	+	+	-	gre	1,7
26	-	-	-	-	gre	1,4
27	-	+	+	-	gre	1,3
28	-	+	+	-	gre	1,3
29	-	+	-	-	gre	1,6
30	-	+	+	-	gre	1,0
31	-	+	+	-	gre	1,3
32	-	+	-	-	gre	0,2
33	+	+	-	-	fwn	1,1
34	-	-	+	-	gre	1,3
35	+	+	+	-	fwn	0,8
36	+	-	-	-	gre	1,2
37	+	-	-	-	gre	0,2
38	-	+	+	-	gre	1,7
39	-	+	+	-	gre	0,3
40	-	+	-	-	gre	0,6
41	+	+	-	-	gre	0,2
42	+	-	-	-	gre	0,3
43	-	+	+	-	fwn	0,5
44	-	-	-	-	fwn	1,1
45	+	+	+	-	gre	0,6
46	+	-	-	-	gre	0,9
47	-	+	+	-	gre	0,0
48	-	+	-	-	gre	0,0
49	-	+	+	-	gre	0,2

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA A3 Análise das marcas auxotróficas morfológicas e produção de glicoamilase nos setores do híbrido M₂P//SV-24 (A).

Setor	leuA ₁ *	proA ₁	pabaA ₁	nicA ₁	scpA ₁	côr	UGA/ml
1	+	+	-	-	+	olv	6,3
2	+	+	+	-	-	olv	6,7
3	+	+	+	-	-	olv	1,3
4	+	-	+	+	+	brw	7,7
5	+	-	-	-	-	olv	4,1
6	+	+	-	-	+	olv	2,8
7	+	-	+	-	-	olv	6,7
8	+	-	+	-	-	olv	5,2
9	+	+	+	-	-	olv	4,5
10	+	+	+	+	+	olv	6,1
11	+	+	+	+	+	bwn	6,3
12	+	+	+	-	-	olv	6,3
13	+	+	+	+	+	olv	5,6
14	+	+	-	-	+	olv	6,1
15	+	+	-	-	+	olv	3,2
16	+	+	+	-	-	olv	6,1
17	+	+	-	-	+	olv	4,8
18	+	+	-	+	+	bwn	--
19	+	+	+	-	-	olv	5,1
20	+	+	-	-	+	olv	5,4
21	+	+	+	-	-	olv	5,7
22	+	+	-	-	+	olv	2,3
23	+	+	+	-	-	olv	6,1
24	+	+	-	-	+	olv	5,4
25	+	+	-	-	+	olv	3,9

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA A4 Análise das marcas auxotróficas morfológicas e produção de glicoamilase nos setores do híbrido M₂P//SV-24 (A).

Setor	leuA ₁ [*]	proA ₁	pabaA ₁	nicA ₁	scpA ₁	côr	UGA/ml
26	+	-	+	-	-	olv	6,7
27	+	-	+	-	-	olv	5,2
28	+	+	+	+	+	bwn	7,5
29	+	+	+	+	+	bwn	6,7
30	+	+	+	+	+	bwn	6,9
31	+	+	+	+	-	brw	6,9
32	+	+	+	-	/	olv	--
33	-	+	+	-	/	olv	--
34	+	-	-	-	+	olv	8,1
35	+	+	+	-	+	olv	7,5
36	+	+	-	-	-	olv	7,5
37	+	+	+	-	+	olv	3,9
38	+	+	-	-	+	olv	4,8
39	+	-	-	-	+	olv	3,2
40	+	-	-	+	+	bwn	4,1
41	+	-	+	+	-	bwn	3,6
42	+	-	+	-	+	olv	5,9
43	+	+	+	-	+	olv	7,2
44	+	+	+	-	-	olv	5,1
45	+	+	+	-	-	olv	5,7
46	+	+	-	-	-	olv	6,5
47	+	-	-	-	-	olv	5,9
48	+	+	-	-	+	olv	3,4
49	+	+	-	+	+	olv	3,5

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA A8 Análise das marcas auxotróficas morfológicas e produção de glicoamilase nos setores do híbrido M₂P//SV-24 (B).

Setor	leuA ₁ *	proA ₁	pabaA ₁	nicA ₁	scpA ₁	côr	UGA/ml
1	+	+	+	-	-	olv	6,8
2	+	+	+	+	-	bwn	1,9
3	+	+	+	-	-	olv	6,8
4	+	-	-	-	-	olv	8,7
5	+	+	+	+	-	bwn	4,9
6	+	+	-	-	-	olv	2,4
7	+	+	+	+	-	bwn	5,3
8	+	+	-	+	-	bwn	7,2
9	+	+	-	-	-	olv	4,6
10	+	+	-	+	-	bwn	6,2
11	+	+	+	+	-	bwn	7,6
12	+	+	+	+	-	bwn	8,2
13	+	+	+	+	-	bwn	7,2
14	+	-	-	-	-	olv	3,8
15	+	+	+	+	-	bwn	6,6
16	+	+	+	-	-	olv	8,7
17	+	+	+	+	-	bwn	7,2
18	+	+	-	-	-	olv	1,7
19	+	+	-	-	-	olv	1,9
20	+	+	-	+	-	bwn	3,1
21	+	+	-	+	-	bwn	4,7
22	+	+	-	-	-	olv	2,4
23	+	+	+	-	-	olv	--
24	+	+	-	-	-	olv	8,2
25	+	+	+	-	-	olv	6,2
26	+	+	-	-	-	olv	2,8
27	+	+	+	+	-	bwn	6,9
28	+	+	-	-	-	olv	3,4
29	+	+	+	+	-	bwn	--
30	+	-	+	+	-	bwn	7,9
31	+	+	+	+	-	bwn	--

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA A6 Análise das marcas auxotróficas morfológicas e produção de glicoamilase nos setores do híbrido M₂P//SV-24 (B).

Sector	leuA ₁ *	proA ₁	pabaA ₁	nicA ₁	scpA ₁	côr	UGA/ml
32	+	+	+	+	-	bwn	7,2
33	+	+	-	+	-	bwn	6,8
34	+	+	+	-	-	olv	9,0
35	+	+	-	+	-	bwn	6,0
36	+	+	+	+	-	bwn	6,2
37	+	-	+	+	-	bwn	6,6
38	+	+	-	-	-	olv	7,6
39	+	+	+	+	-	bwn	6,8
40	+	+	-	+	-	bwn	6,0
41	+	+	+	+	-	bwn	6,4
42	+	+	+	-	-	olv	7,6
43	+	+	+	-	-	olv	4,6
44	+	+	-	-	-	olv	8,2
45	+	-	-	-	-	olv	7,4
46	+	+	-	-	-	olv	--
47	+	+	+	+	-	bwn	2,9
48	+	+	+	-	-	olv	2,2
49	+	-	+	-	-	olv	6,6
50	+	+	+	-	-	olv	7,7
51	+	+	+	-	-	olv	8,7
52	+	+	+	+	-	bwn	--
53	+	+	-	+	-	bwn	8,7
54	+	+	-	-	-	olv	8,7
55	+	+	+	+	-	bwn	8,7
56	+	+	+	+	-	bwn	6,6
57	+	+	+	-	-	olv	1,2
58	+	+	+	-	-	olv	1,1
59	+	+	-	-	-	olv	--
60	+	+	+	+	-	bwn	7,6
61	+	+	-	-	-	olv	5,7
62	+	+	+	-	-	olv	--

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA A7 Análise das marcas auxotróficas morfológicas e produção de glicoamilase nos setores do híbrido $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_2$.

Setor	leuA ₁ *	proA ₁	pabA ₁	nicA ₁	scpA ₁	côr	UGA/ml
1	+	+	+	+	-	bwn	9,0
2	+	+	+	+	-	bwn	7,6
3	+	+	+	+	-	bwn	10,4
4	+	+	-	-	-	olv	10,7
5	+	+	-	+	-	bwn	11,8
6	+	-	+	-	-	olv	11,8
7	+	+	+	-	-	olv	11,8
8	+	+	-	+	-	bwn	9,5
9	+	+	-	+	-	bwn	13,1
10	+	-	+	-	-	olv	8,7
11	+	+	-	-	-	olv	9,2
12	+	+	+	-	-	olv	5,4
13	+	+	+	-	-	olv	5,8
14	+	+	+	-	-	olv	10,7
15	+	+	+	+	-	bwn	14,1
16	+	-	+	+	-	bwn	7,6
17	+	+	+	+	-	bwn	7,4
18	+	-	+	-	-	olv	7,2
19	+	-	+	-	-	olv	14,1
20	+	+	+	-	-	olv	14,7
21	+	-	-	-	-	bwn	13,6
22	+	-	+	+	-	bwn	9,8
24	+	+	+	-	-	olv	8,5
25	+	+	+	+	-	bwn	9,8
26	+	+	+	-	-	olv	11,9

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA A8 Análise das marcas auxotróficas morfológicas e produção de glicoamilase nos setores do híbrido $M_2P//pabA_1nicA_1olvA_3$.

Setor	leuA ₁ *	proA ₁	pabA ₁	nicA ₁	scpA ₁	côr	UGA/ml
27	+	+	+	-	-	olv	7,5
28	+	-	-	-	-	olv	8,4
29	+	+	+	-	-	olv	12,8
30	+	+	-	-	-	olv	15,1
31	+	+	-	-	-	olv	15,1
32	-	-	-	-	-	olv	10,1
33	+	-	+	+	-	bwn	5,9
34	+	+	+	-	-	olv	12,8
35	+	+	+	-	-	olv	8,9
37	+	-	+	-	-	olv	11,1
38	+	+	-	-	-	olv	4,7
39	+	+	-	-	-	olv	10,4
40	+	+	+	-	-	olv	11,5
41	+	+	+	-	-	olv	10,1
42	+	-	+	+	-	bwn	5,7
43	+	+	+	+	-	bwn	9,2
44	+	+	+	+	-	bwn	9,2
45	+	+	+	+	-	bwn	10,4
46	+	-	+	-	-	olv	9,8
47	+	+	+	+	-	bwn	11,9
48	+	+	+	+	-	bwn	10,1
49	+	-	+	-	-	olv	8,0
50	+	+	+	+	-	bwn	9,2

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA A9 Análise das marcas auxotróficas morfológicas e produção de glicoamilase nos setores do híbrido 02//lap 61(A).

Setor	argB ₂ *	proA ₁	pabaA ₁	scpA ₁	côr
1	+	+	-	-	fwn
2	+	+	-	-	fwn
3	+	+	-	+	fwn
4	+	+	-	-	gre
5	+	-	-	-	gre
6	+	+	-	-	fwn
7	+	+	-	-	fwn
8	+	+	-	-	fwn
9	+	+	-	-	fwn
10	+	+	-	-	fwn
11	+	+	-	-	gre
12	+	+	-	+	fwn
13	+	+	-	-	fwn
14	+	+	-	-	gre
15	+	+	-	-	fwn
16	+	+	-	-	fwn
17	-	+	+	-	fwn
18	+	-	-	+	gre
19	+	-	-	+	gre
20	+	+	-	-	fwn
21	+	+	-	+	fwn

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA A10 Análise das marcas auxotróficas morfológicas e produção de glicoamilase nos setores do híbrido 02//lap 61(A).

Setor	argB ₂ [*]	proA ₁	pabaA ₁	scpA ₁	côr
22	+	+	-	-	fwn
23	+	+	-	+	fwn
24	+	+	-	+	fwn
25	+	-	-	-	gre
26	+	+	-	-	fwn
27	+	+	-	-	fwn
28	+	-	-	-	gre
29	+	+	-	-	fwn
30	+	+	-	+	fwn
31	+	+	-	-	fwn
32	+	+	-	-	fwn
33	+	+	-	+	fwn
34	+	+	-	-	fwn
35	+	-	-	+	gre
36	+	+	+	-	gre
37	+	+	-	-	fwn
38	+	+	-	-	gre
39	-	+	+	-	fwn
40	-	+	+	-	fwn
41	+	+	-	-	fwn

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA A11 Análise das marcas auxotróficas morfológicas e produção de glicoamilase nos setores do híbrido 02//lap 61(B).

Setor	argB ₁ *	proA ₁	pabaA ₁	scpA ₁	côr	UGA/ml
1	+	+	-	-	fwn	4,6
2	+	+	-	-	fwn	3,9
3	+	+	-	-	fwn	2,9
4	+	+	-	-	fwn	4,4
5	+	+	-	-	fwn	9,2
6	+	+	-	-	gre	6,6
7	+	+	-	-	fwn	9,8
8	+	+	-	-	gre	3,9
9	+	+	-	-	gre	10,3
10	+	+	-	-	fwn	11,5
11	+	-	-	-	fwn	3,8
12	+	+	-	-	gre	8,1
13	+	+	-	-	fwn	4,8
14	+	+	-	-	fwn	12,2
15	-	-	+	-	gre	17,2
16	+	+	-	-	gre	5,5
17	+	-	-	-	fwn	5,6
18	+	+	-	-	fwn	1,1
19	+	+	-	-	gre	7,4
20	+	+	-	-	fwn	9,2
21	+	+	-	-	fwn	6,0
22	+	+	-	-	fwn	2,4

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA A12 Análise das marcas auxotróficas morfológicas e produção de glicoamilase nos setores do híbrido 02//lap 61(B).

Setor	argB ₂ *	proA ₁	pabaA ₁	scpA ₁	côr	UGA/ml
23	+	+	-	-	fwn	4,9
24	+	+	-	-	fwn	5,5
25	+	-	-	-	gre	2,8
26	+	+	-	-	gre	10,3
27	+	+	-	-	fwn	4,3
28	+	-	-	-	gre	4,8
29	+	-	-	-	gre	9,2
30	+	+	-	-	gre	10,6
31	+	+	-	-	gre	12,5
32	+	-	-	-	gre	4,4
33	+	+	-	-	fwn	9,2
34	+	+	-	-	gre	7,6
35	+	-	-	-	fwn	2,8
36	+	-	-	-	gre	4,8
37	+	-	-	-	gre	16,6
38	+	+	-	-	gre	3,6
39	+	+	-	-	gre	8,5
40	+	+	-	-	gre	4,0
41	+	-	-	-	gre	3,6
42	+	+	-	-	gre	2,6
43	+	+	+	-	fwn	3,6
44	+	+	-	-	fwn	6,6

* - O significado dos marcadores está no item 3.1.1.3.

TABELA A13 Produção de glicoamilase (U GA/ml) das linhagens parentais e híbridos.

Linhagem	I	II	III	IV	V
08	0,9	0,8	1,1	1,4	1,2
lap 61	1,2	1,5	1,2	1,9	1,6
02	4,4	5,8	4,6	7,3	6,6
M ₂ P	6,2	6,2	7,8	6,2	7,4
SV-24	3,1	4,1	4,3	3,3	3,7
pabA ₁ nicA ₁ olvA ₃	11,9	12,3	15,3	13,9	14,7
08//lap61	3,4	3,3	2,5	3,5	3,0
MP//SV-24(A)	3,6	3,5	3,5	3,5	3,8
MP//SV-24(B)	3,7	4,6	3,7	3,9	3,3
02//lap 61(A)	3,3	3,8	3,9	4,2	3,5
02//lap 61(B)	2,9	3,6	2,4	4,0	3,7
M ₂ P//pabA ₁ nicA ₁ olvA ₃	11,1	10,7	11,9	11,9	13,9
PF//NO	11,6	11,6	11,9	12,6	8,9
NRRL 3112	21,2	23,9	23,4	14,3	24,4

TABELA A14 Análise de variância das médias de produção de glicoamilase
das linhagens na Tabela A13.

Causa da variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	F
Linhagem	13	2160,7	166,2	87,6**
Resíduo	56	106,2	1,8	
Total	69	2267,01		

** - Significativo à nível de 1%.

TABELA A15 Produção de glicoamilase (U GA/ml) de linhagens parentais e híbridos quando cultivados em MAC com e sem suplementação.

Linhagem	I	II	III	IV	V
M_2P	5,8	8,6	7,5	7,2	9,4
SV-24	1,9	2,6	1,5	3,5	2,1
$pabA_1fwnA_1$	16,4	14,2	16,4	15,8	15,0
08//lap 61 ^S	2,4	3,2	2,1	1,3	2,4
08//lap 61	4,2	3,5	2,4	1,3	2,4
M_2P //SV-24(A) ^S	5,8	3,9	3,0	3,8	2,6
M_2P //SV-24(A)	3,5	3,5	2,7	3,5	3,5
M_2P //SV-24(B) ^S	3,2	3,8	2,6	1,9	1,7
M_2P //SV-24(B)	2,0	1,0	1,5	2,1	2,0
M_2P // $pabA_1nicA_1olvA_3$ ^S	9,4	8,6	6,7	9,1	7,5
M_2P // $pabA_1nicA_1olvA_3$	7,5	5,0	7,5	8,9	7,9

TABELA A16 Análise de variância das médias de produção de glicoamilase
das linhagens na Tabela A15.

Causa da variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	F
Linhagem	10	871,2	87,1	85,9**
Resíduo	44	44,6	1,01	
Total	69	2267,01		

** - Significativo à nível de 1%.