

DE
PÓS GRADUAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO E MAPEAMENTO DE GENES QUE ALTERAM A PRODUÇÃO DE GLICOAMILASE

BC/17859
IB/80883

EM Aspergillus niger

MÁRCIA MASIERO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
MÁRCIA MASIERO
e aprovada pelo(a) orientador(a) Julgadora.

Orientador: Prof. Dr. Renato Bonatelli Júnior

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutor em Ciências,
Área de Genética.

Campinas - SP

1992

T/UNICAMP

M378_C

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	IB/35
N.º CHEQUE	M348c
V.	
T.	17 859
RUBR.	215/92
<input type="checkbox"/> C	<input checked="" type="checkbox"/> X
PERC.	28.100.000,00
DATA	08/10/92
N.º CPD	

CM-00033014-9

"Paga-se mal a um mestre,

quando se continua sempre sendo o aluno"

Nietzsche

A

Carla, Fons, John, Joop e Lynda

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Renato Bonatelli Júnior pela orientação e amizade.

Aos Professores Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner, Dr. Cláudio Luiz Messias, Dra Gisela Umbuzeiro Valent, Dr. Ivanhoé Rodrigues Baracho, Dr. João Lúcio de Azevedo e Dr. Octávio H. O. Pavan pela atenção na leitura e valiosas sugestões dadas na análise prévia desta tese.

A todos os amigos que tive e tenho a felicidade de conviver em Campinas, Lorena, Wageningen e Braunschweig. Tenho certeza que cada um deles sabe o quanto é insubstituível e extraordinário.

À FAENQUIL-CEBIQ por possibilitar a realização deste trabalho em suas instalações a partir de outubro de 1989, e principalmente por apoiar meu desenvolvimento técnico e profissional. Também agradeço a colaboração e amizade de todos os colegas daquela Instituição que, direta ou indiretamente, estiveram envolvidos com este trabalho.

Ao CNPq, CAPES e programa RHAE pela concessão das bolsas de doutorado, deslocamento e treinamento no exterior.

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. REGULAÇÃO GÊNICA EM EUCARIOTOS	2
2.1.1. GENES REGULADORES	2
2.1.2. MODELOS DE REGULAÇÃO	4
2.1.2.1. REGULAÇÃO DOS GENES <i>GAL</i> EM <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
2.1.2.2. REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO NITROGÊNIO	6
2.2. A ENZIMA GLICOAMILASE E SUA REGULAÇÃO	8
2.2.1. GLICOAMILASE DE LEVEDURAS	8
2.2.2. GLICOAMILASE DE FUNGOS FILAMENTOSOS	10
2.3. ASPECTOS GENÉTICOS DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DE INTERESSE ECONÔMICO	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. LINHAGENS DE <i>Aspergillus niger</i> UTILIZADAS	19
3.2. MEIOS DE CULTURA	19
3.2.1. MEIO MÍNIMO	19
3.2.2. MEIO MÍNIMO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO	20
3.2.3. MEIO COMPLETO	20
3.2.4. MEIO DE FERMENTAÇÃO	20

3.2.5. MEIO DE FERMENTAÇÃO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO	21
3.2.6. MEIO MÍNIMO + 4% DE MEIO COMPLETO	21
3.3. SOLUÇÕES	21
3.3.1. SOLUÇÃO TWEEN	21
3.3.2. SOLUÇÃO SALINA	21
3.3.3. SOLUÇÃO DE VITAMINAS	21
3.3.4. SOLUÇÃO BENLATE	22
3.3.5. SOLUÇÃO TAMPÃO AMIDO	22
3.4. ESTERILIZAÇÃO	22
3.5. INCUBAÇÃO E CULTIVO	22
3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	22
3.6.1. PRODUÇÃO DE GLICOAMILASE	22
3.6.2. MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	22
3.7. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DIPLÓIDES	23
3.7.1. OBTENÇÃO	23
3.7.2. CARACTERIZAÇÃO	23
3.8. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEGREGANTES HAPLÓIDES A PARTIR DOS DIPLÓIDES ESTUDADOS	24
3.8.1. OBTENÇÃO	24
3.8.2. CARACTERIZAÇÃO	24
3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	24
4. RESULTADOS	25
4.1. CRESCIMENTO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO	25
4.2. PRODUÇÃO DE GA EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO	27
4.3. ANÁLISE GENÉTICA DO MUTANTE <i>lgp73</i>	40

4.3.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO DIPLÓIDE <i>lgp73</i> //SM-13par. E SEGREGANTES	40
4.3.2. MAPEAMENTO	40
4.4. ANÁLISE GENÉTICA DO MUTANTE <i>lgp05</i>	51
4.4.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO DIPLÓIDE <i>lgp05</i> //SV-10 par. E SEGREGANTES	51
4.4.2. MAPEAMENTO	51
4.5. CRESCIMENTO EM AMIDO COMO FONTE DE CARBONO	56
5. DISCUSSÃO	58
5.1. CRESCIMENTO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO	58
5.2. PRODUÇÃO DE GA EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO	60
5.3. ANÁLISES GENÉTICAS	61
5.3.1. MUTANTE <i>lgp73</i>	61
5.3.2. MUTANTE <i>lgp05</i>	62
5.4. CONSIDERAÇÕES GERAIS	63
6. CONCLUSÕES	65
7. RESUMO	66
8. ABSTRACT	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
APÊNDICE DE TABELAS	82

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 Média do diâmetro das colônias (cm) das linhagens parentais e mutantes *lgp* e *hgp*, crescidas em MM com diferentes fontes de carbono, após 3 dias de incubação. 26
- TABELA 2 Média de produção de GA (U/ml) das linhagens parentais e dos mutantes *lgp* e *hgp* em meio com farinha de raspa integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono. 28
- TABELA 3 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes *lgp*, e das linhagens parentais *pab1 fun1* e *nic1 olv3* em MAC, pelo teste de Tukey. 29
- TABELA 4 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes *lgp*, e das linhagens parentais *pab1 fun1* e *nic1 olv3* em MAS, pelo teste de Tukey. 29
- TABELA 5 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes *lgp*, e das linhagens parentais *pab1 fun1* e *nic1 olv3* em MAL, pelo teste de Tukey. 30
- TABELA 6 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes *lgp*, e das linhagens parentais *pab1 fun1* e *nic1 olv3* em MAG, pelo teste de Tukey. 30
- TABELA 7 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem *pab1 fun1* nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono. 32
- TABELA 8 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem *nic1 olv3* nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono. 32
- TABELA 9 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem *lgp05* nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono. 33

TABELA 10 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem <i>lgp61</i> nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.	33
TABELA 11 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem <i>lgp73</i> nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.	34
TABELA 12 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes <i>hgp</i> e da linhagem parental <i>pab1 fum1</i> em MAC, pelo teste de Tukey.	34
TABELA 13 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes <i>hgp</i> e da linhagem parental <i>pab1 fum1</i> em MAS, pelo teste de Tukey.	35
TABELA 14 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes <i>hgp</i> e da linhagem parental <i>pab1 fum1</i> em MAL, pelo teste de Tukey.	35
TABELA 15 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes <i>hgp</i> e da linhagem parental <i>pab1 fum1</i> em MAG, pelo teste de Tukey.	36
TABELA 16 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem <i>pab1 fum1</i> nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.	37
TABELA 17 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem <i>hgp169</i> nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.	37
TABELA 18 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem <i>hgp112</i> nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.	38

TABELA 19 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem <i>hgp252</i> nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.	38
TABELA 20 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem <i>hgp147</i> nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.	39
TABELA 21 Marcas auxotróficas, morfológicas e produção de GA (U/ml) dos segregantes do diplóide <i>lgp73//SM-13</i> par.	41
TABELA 22 Resultados esperados para crescimento em amido como fonte de carbono e produção de GA das possíveis combinações genotípicas dos segregantes do diplóide <i>lgp73//SM-13</i> par.	43
TABELA 23 Crescimento em amido como fonte de carbono, produção de GA (U/ml), genótipos em relação ao gene <i>lysA</i> e número de segregantes obtidos do diplóide <i>lgp73//SM-13</i> par. para cada classe.	43
TABELA 24 Genótipo, auxotrofia, coloração de conídios, e produção de GA (U/ml) em MAC de alguns segregantes <i>lysA</i> ⁺ que crescem em amido como fonte de carbono (diplóide <i>lgp73//SM-13</i> par.) comparados com as parentais referência de produção normal (<i>pab₁ fwn₁</i> e <i>nic₁ olv₃</i>) e as parentais do cruzamento.	45
TABELA 25 Possíveis genótipos, fenótipos e número de segregantes esperados e obtidos, considerando-se a presença de três genes afetando a produção de GA no cruzamento entre as linhagens <i>lgp73</i> e <i>SM-13</i> par.	46
TABELA 26 Genótipos prováveis e produção de GA (U/ml) em maltose como fonte de carbono dos parentais, segregantes do tipo I* e II** e diplóides obtidos entre estes segregantes e segregantes <i>ssuA</i> ⁺ <i>lgpA</i> ⁻ (<i>snuA</i> ⁺ <i>lgpA</i> ⁻).	49
TABELA 27 Análise mitótica do diplóide <i>lgp73//SM-13</i> par.	50

TABELA 28 Marcas auxotróficas, morfológicas e produção de GA (U/ml) dos segregantes do diplóide *lpp05//SV-10* par.

52

TABELA 29 Comparação de médias de produção de GA (U/ml) pelo teste de Tukey e crescimento em amido como fonte de carbono dos diplóides homocigoto* e heterocigoto**, para o alelo *lysA⁺* e alelo ou alelos mutados na linhagem *lpp05*, em relação aos parentais selvagens e parentais envolvidos no cruzamento.

55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Distribuição em classes de produção de GA dos segregantes *ssuA*⁻ (*ssuA*⁻) obtidos a partir do diplóide *lgp73//SM-13* par. cultivados em meio de fermentação com maltose como fonte de carbono.

47

FIGURA 2 Crescimento em meio com glicose (MM) ou amido (MM+A) como única fonte de carbono.

57

LISTA DE FOTOS

FOTO 1 Comparação de crescimento de colônias das linhagens parentais, diplóides controle* e diplóides homozigoto** e heterozigoto*** para o gene *lysA*⁺ e alelo (s) mutado (s) na linhagem *lgp05* em MM+A.

55

LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE

TABELA A1 Produção de GA (U/ml) dos parentais e mutantes <i>lgp</i> em MAC, MAS, MAL e MAG (5 repetições por linhagem por tratamento).	83
TABELA A2 Produção de GA (U/ml) da linhagem parental e dos mutantes <i>hgp</i> em MAC, MAS, MAL e MAG (5 repetições por linhagem por tratamento).	84
TABELA A3 Análise de variância pelo teste F dos dados da produção de GA da tabela A1 relativos a crescimento em farinha integral de mandioca (MAC).	85
TABELA A4 Análise de variância pelo teste F dos dados da produção de GA da tabela A1 relativos em amido solúvel (MAS).	85
TABELA A5 Análise de variância pelo teste F dos dados da produção de GA da tabela A1 relativos a crescimento em maltose (MAL).	86
TABELA A6 Análise de variância pelo teste F dos dados da produção de GA da tabela A1 relativos a crescimento em glicose (MAG).	86
TABELA A7 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela A1 relativos a linhagem <i>pab1 fum1</i> .	87
TABELA A8 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela A1 relativos a linhagem <i>nic1 olv3</i> .	87
TABELA A9 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela A1 relativos a linhagem <i>lgp05</i> .	88
TABELA A10 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela A1 relativos a linhagem <i>lgp61</i> .	88

TABELA A11 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela A1 relativos a linhagem <i>lgp73</i> .	89
TABELA A12 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela A2 relativos a crescimento em farinha integral de mandioca (MAC).	89
TABELA A13 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela A2 relativos a crescimento em amido solúvel (MAS).	90
TABELA A14 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela A2 relativos a crescimento em maltose (MAL).	90
TABELA A15 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela A2 relativos a crescimento em glicose (MAG).	91
TABELA A16 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela A2 relativos a linhagem <i>pab1 fwn1</i> .	91
TABELA A17 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela A2 relativos a linhagem <i>hgp169</i> .	92
TABELA A18 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela A2 relativos a linhagem <i>hgp252</i> .	92
TABELA A19 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela A2 relativos a linhagem <i>hgp147</i> .	93
TABELA A20 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela A2 relativos a linhagem <i>hgp112</i> .	93
TABELA A21 Produção de GA (U/ml) dos parentais do diplóide <i>lgp73//SM-13</i> par.	94

TABELA A22 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela 24, relativos aos segregantes *lysA⁺ lgpB⁻*, que crescem em amido como fonte de carbono.

95

TABELA A23 Comparação de médias de produção de GA dos segregantes *lysA⁺ lgpB⁻*, que crescem em amido como fonte de carbono.

95

TABELA A24 Produção de GA (U/ml) dos segregantes *smuA⁻* (ou *smuA⁻*) do diplóide *lgp73//SM-13* par., cultivados em meio de fermentação com maltose como fonte de carbono.

96

TABELA A25 Produção de GA (U/ml) das linhagens parentais, segregantes e diplóides dos tipos I e II com 5 repetições em meio com maltose como fonte de carbono.

97

TABELA A26 Análise de variância pelo teste de F dos dados de produção de GA da tabela A25.

97

TABELA A27 Produção de GA (U/ml) dos parentais do diplóide *lgp05//SV-10* par.

98

TABELA A28 Produção de GA (U/ml) das linhagens parentais e diplóides homozigoto* e heterozigoto** para o gene *lysA⁺* e para o (s) gene (s) mutado (s) na linhagem *lgp05* (5 repetições por linhagem).

99

TABELA A29 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da Tabela A28, relativos à produção de parentais e diplóides homozigoto e heterozigoto para o gene *lysA⁺* e para a mutação ou mutações presentes na linhagem *lgp05*.

99

TABELA A30 Crescimento em MM e MM+A expresso na forma de diâmetro da colônia (cm).

100

1. INTRODUÇÃO

O fungo filamentosso *Aspergillus niger* é um microorganismo de interesse, tanto para estudos básicos de Genética, quanto aplicados, dado ser um eucarioto de fácil manipulação e também um bom secretor e produtor de diferentes metabólitos de interesse industrial (SMITH e PATEMAN, 1977). Além disso, os fungos filamentosos em geral têm sido apontados como promissores vetores de expressão de proteínas heterólogas, devido a sua maior capacidade de secreção em comparação a bactérias e leveduras (DEVCHAND e GWYNNE, 1991).

A enzima glicoamilase (E.C.3.2.1.3.) é utilizada na sacarificação de substratos amiláceos, sendo considerada a segunda enzima em importância e quantidade produzida por ano (SCHMIDELL e col., 1989). Ela é produzida industrialmente por *A. niger*, assim como por outras espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* (MONTENECOURT e EVELEIGH, 1985).

Estudos genéticos básicos e aplicados têm sido conduzidos em *A. niger*, classificado como Deuteromiceto, por não ter ciclo sexual descrito. O ciclo parassexual (PONTECORVO e col., 1953a) e a transformação gênica (KELLY e HYNES, 1985) são as alternativas de recombinação utilizadas, tendo sido descritos 8 grupos de ligação para a espécie (DEBETS e col., 1990a,b).

Trabalhos sobre a genética da produção de glicoamilase em linhagem industrial de *A. niger* foram conduzidos no laboratório dirigido pelo Dr. Renato Bonatelli Jr, na Universidade Estadual de Campinas, com o intuito de se compreender as relações alélicas e inter alélicas dos genes envolvidos na produção, regulação e secreção desta enzima (BONATELLI JR. e col., 1984; VALENT, 1985, VIALTA, 1987; MASIERO, 1988; CALIL, 1988; MASIERO e BONATELLI JR., 1989; VIALTA e BONATELLI JR., 1990; OLIVEIRA, 1991; VALENT e col., 1992).

O presente trabalho tem como principais objetivos a caracterização e o mapeamento de mutantes com alteração na produção de glicoamilase em linhagem industrial de *A. niger*, como base para futura elucidação do papel destes genes na regulação e secreção de glicoamilase neste organismo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. REGULAÇÃO GÊNICA EM EUKARIOTOS

Os microrganismos podem responder, pronta e eficientemente, a mudanças nutricionais de seu meio graças a mecanismos altamente especializados de regulação. Estes mecanismos controlam as necessidades celulares através de síntese proteica. Essa regulação pode ocorrer em vários níveis, desde o transcricional, quando o mRNA é transcrito a partir do DNA pela RNA polimerase, até o pós-traducional, quando as proteínas recém sintetizadas, de acordo com a sequência de nucleotídeos do mRNA, sofrem diferentes modificações até serem, em alguns casos secretadas.

Os mecanismos de expressão gênica operantes em organismos eucariotos são diferentes e muito mais complexos que os operantes em procariotos. Em eucariotos, o DNA está complexado com histonas e outras proteínas, formando a estrutura da cromatina, que deve sofrer alterações para permitir a transcrição. O mRNA não é policistrônico e a tradução não ocorre simultaneamente com a transcrição, cada evento acontecendo em compartimentos celulares diferentes, sendo portanto necessário o deslocamento do mRNA até o citoplasma. O gene possui segmentos internos não traduzidos, chamados introns, que são transcritos e posteriormente retirados durante o processamento do mRNA. O mRNA sofre modificações, tais como poliadenilação na extremidade 3' e fosforilação na extremidade 5'. O início do gene estrutural possui múltiplos sítios de ligação de fatores que interagem com a RNA polimerase para iniciar a transcrição. Finalmente, a proteína sofre modificações pós-traducionais, tais como clivagem peptídica, glicosilação, adição de grupos prostéticos e formação de estruturas quaternárias, antes de serem consideradas maduras e ativas. Todos estes passos oferecem inúmeros pontos de controle da expressão gênica em organismos eucariotos. No entanto, o controle da síntese protéica, tanto em bactérias, quanto em organismos superiores, é exercido primordialmente a nível transcricional.

2.1.1. GENES REGULADORES

Existem duas classes de enzimas que, dependendo das condições metabólicas da célula, diferem em ocorrência e concentração. As enzimas constitutivas são sintetizadas em velocidades e quantidades constantes, fazendo parte da maquinaria enzimática básica permanente da célula. As enzimas induzidas ocorrem normalmente em quantidades traço e aumentam de concentração consideravelmente, quando seu substrato está presente no meio de cultivo. A indução faz parte de um sistema de economia celular, onde as

enzimas são formadas somente quando necessárias. Outro tipo de regulação da concentração enzimática celular é exercido por repressão, onde a presença do produto da atividade de uma ou mais enzimas inibe a síntese das mesmas.

Desde os estudos de JACOB e MONOD (1961), sobre a indução da enzima β -galactosidase em *Escherichia coli*, sabe-se que existem 2 tipos de genes influenciando a formação de uma proteína. O gene estrutural, que codifica a proteína propriamente dita e o gene regulador, que não tem influência sobre a estrutura da proteína a ser formada, mas determina se o gene estrutural será ou não transcrito.

O gene regulador age através de uma proteína repressora ou ativadora, que se liga ao DNA em sítios específicos na porção terminal 5' do gene estrutural, impedindo ou promovendo respectivamente a transcrição. Em sistemas de controle negativo os genes são normalmente expressos, a não ser que a proteína repressora esteja presente. Em sistemas de controle positivo os genes não são expressos, a não ser que a proteína ativadora esteja presente.

Os indutores desses sistemas são, geralmente, o produto final ou substrato das enzimas codificadas pelos genes sob regulação. Vias biossintéticas são, em geral, reprimidas quando seu produto final é fornecido em abundância e vias catabólicas são ativadas através da presença de seu substrato. Isto, no entanto, não quer dizer que toda via biossintética e toda via catabólica estão sob controle negativo e positivo respectivamente. Algumas destas vias têm controle bastante complexo e respondem, em diferentes condições, a diferentes sinais de indução e repressão, como será visto posteriormente.

Controles negativo e positivo podem ser distintos geneticamente através de mutações que inativam o gene regulador. Genes repressores mutados dão origem, na maioria das vezes, a fenótipo constitutivo e genes ativadores mutados, a fenótipo nulo. Em frequência baixa, mutação no gene ativador também resulta em fenótipo constitutivo. Uma maneira de se testar a natureza repressora ou ativadora do gene neste caso é através de diplóide heterozigoto. No sistema negativo, o fenótipo constitutivo do mutante passa a reprimido no diplóide, devido a presença de cópia intacta do gene repressor. No sistema positivo, o fenótipo continua constitutivo no diplóide, devido a presença de uma cópia do gene mutado, que é capaz de ativar os genes estruturais independentemente de indução.

Também em frequência baixa, mutações no gene regulador negativo resultam em super repressão e podem ser distintas daquelas em reguladores positivos através de diplóide heterozigoto. Se o gene mutado codificar um repressor, o fenótipo no diplóide será também super reprimido e, se codificar um ativador, o diplóide será passível de

indução.

Existe ainda um outro tipo de controle, onde o produto gênico atua como proteína reguladora de sua própria expressão, além de ter sua função catalítica normal. Este é o chamado controle autogênico.

Quanto à atuação, os genes reguladores podem ser separados em 3 classes (ARST e SCAZZOCCHIO, 1985):

- genes regulatórios de vias específicas, que medeiam a indução ou repressão da síntese de permeases ou enzimas de via metabólica única e específica.
- genes regulatórios de amplo domínio, que controlam a expressão de genes estruturais, envolvidos em diferentes vias metabólicas.
- genes regulatórios integradores, que regulam a expressão de genes estruturais envolvidos em 2 ou mais vias metabólicas, reguladas também independentemente.

A seguir serão apresentados alguns modelos de regulação em eucariotos que exemplificam estas classes e os mecanismos de regulação descritos anteriormente.

2.1.2. MODELOS DE REGULAÇÃO

Devido à complexidade de seus processos, os eucariotos não são conhecidos tão profundamente a nível molecular quanto os procariotos. Entre os eucariotos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o organismo mais bem conhecido, graças ao desenvolvimento de metodologias eficientes de transformação. Este fato facilitou muito o estudo de diferentes circuitos regulatórios em *S. cerevisiae* (BRAUS, 1991; HINNEBUSH, 1988; JOHNSTON, 1987). Também *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa* têm seus sistemas regulatórios estudados (ARST, 1989; HAWKINS e ROBERTS, 1989; FELENBOK e col., 1989; ARST e SCAZZOCCHIO, 1985; GILES e col., 1985; MARZLUF, 1981), mas suas bases são principalmente fisiológicas e genéticas, sendo ultimamente mais explorados a nível molecular.

2.1.2.1. REGULAÇÃO DOS GENES *GAL* EM *Saccharomyces cerevisiae*

O sistema de regulação dos genes envolvidos no catabolismo da galactose em *S. cerevisiae* é um dos circuitos regulatórios mais bem entendidos em eucariotos. A galactose é utilizada através da conversão em glicose-6-fosfato e as enzimas envolvidas são codificadas pelos genes: *GAL2* (permease), *GAL1* (quinase), *GAL7* (transferase), *GAL10* (epimerase), *GAL5* (mutase). A regulação destes genes, com exceção de *GAL5* que é constitutivo, ocorre por indução durante o crescimento em galactose e repressão durante

crescimento na presença de glicose (revisão em JOHNSTON, 1987).

Os genes *GAL1*, *GAL7* e *GAL10* formam um agregado gênico no cromossomo II e *GAL2* se localiza no cromossomo XII. O gene *GAL4* codifica uma proteína ativadora, que se liga ao DNA em regiões específicas da extremidade 5' dos genes estruturais, denominadas UAS *GAL* (upstream activation sequence), para promover a transcrição. *GAL80* codifica proteína que se liga à proteína *GAL4* para impedir sua ação como ativadora. O indutor, quando presente, se liga à proteína *GAL80*, impedindo sua ação sobre a proteína *GAL4*, que fica livre para ativar a transcrição dos genes estruturais.

A galactose não é o indutor do sistema e sim uma molécula pequena, não identificada, resultante da atuação do produto gênico de *GAL3* sobre a galactose.

A repressão catabólica, ativada na presença de glicose, atua em vários níveis: diretamente no promotor dos genes estruturais; impedindo a proteína ativadora de se ligar ao DNA; inibindo a interação entre o indutor e a proteína *GAL80*; inibindo a síntese do indutor e inibindo o transporte de galactose. Há evidências experimentais em relação a estes níveis de repressão, mas o modo como ocorrem ainda não está claro.

Em relação ao modo de ação das proteínas *GAL4* e *GAL80*, muitos trabalhos foram realizados, revelando aspectos interessantes sobre estes produtos gênicos e sua interação. A proteína *GAL4* é sintetizada constitutivamente e, mesmo na ausência do indutor, se liga ao DNA. O domínio responsável pela ativação da transcrição se situa na extremidade carboxílica da molécula e depende do sítio de ligação no DNA só para posicionar a proteína ativadora de forma correta, próxima a outras sequências do promotor. A ativação da transcrição parece ocorrer devido ao contato entre regiões específicas da extremidade carboxílica da proteína *GAL4* com outras proteínas diretamente responsáveis pela transcrição.

A proteína *GAL80* regula *GAL4* a nível pós-traducional, ligando-se ao sítio de ativação da transcrição da proteína *GAL4*. Por sua vez, o gene *GAL80* também é regulado, como os genes estruturais, pelo produto de *GAL4*. Na presença de galactose, o nível basal de expressão de *GAL80* aumenta 5 vezes. Isto faz com que uma quantidade constante de galactose seja sempre necessária, assim como de indutor, para que a proteína *GAL4* esteja sempre livre para atuar como ativadora dos genes estruturais.

Os genes reguladores do sistema *GAL* podem ser classificados como de vias específicas por medirem a síntese de via metabólica única.

2.1.2.2. REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) é um elemento básico presente em muitas macromoléculas celulares, especialmente proteínas e ácidos nucleicos. Dada a necessidade de suprimentos constantes de N para a biossíntese destas macromoléculas, as vias catabólicas de componentes nitrogenados é regulada cuidadosamente pela célula.

Estudos bioquímicos, genéticos e moleculares foram conduzidos principalmente em *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* e *Saccharomyces cerevisiae*. As fontes primárias de N para estes organismos são a amônia, glutamato e glutamina, mas outros compostos nitrogenados como nitrato, nitrito, purinas, proteínas, aminoácidos e acetamida também podem ser utilizados (ARST, 1989; ARST e SCAZZOCCHIO, 1985; MARZLUF, 1981).

O uso de compostos mais complexos como fonte de N, normalmente, requer enzimas específicas, cuja síntese dependerá tanto de indução, quanto de repressão catabólica das vias mais simples. Portanto, o controle do metabolismo do N envolve 2 tipos de genes reguladores. Os responsáveis pela indução são classificados como genes regulatórios de vias específicas e os responsáveis pela repressão catabólica, que regulam a expressão de diferentes vias específicas, são da classe dos genes regulatórios de amplo domínio (ARST e SCAZZOCCHIO, 1985).

Em *A. nidulans* o nitrato e o nitrito são assimilados através da transformação em amônia, pela ação das enzimas nitrato e nitrito redutase, reguladas positivamente pelo produto gênico de *nirA*. Um regulador positivo, *areA*, medeia a repressão catabólica, cujo produto gênico se liga ao promotor dos genes estruturais *nirD* e *nirA* e, juntamente com a proteína *nirA*, promove a transcrição. Na presença de glutamina ou amônia, convertida em glutamina, a proteína *areA* é inativada, havendo, portanto, repressão catabólica dos genes estruturais.

Além da regulação descrita acima, ocorre também que a nitrato redutase exerce controle autogênico sobre o sistema, pois mutação no gene estrutural *nirD* resulta em fenótipo constitutivo das enzimas nitrito redutase e nitrato redutase inativa. Não se sabe o modo de ação deste controle, mas é possível que seja exercido pela ligação entre nitrato redutase e a proteína *areA*.

A prolina é fonte tanto de carbono quanto de N e seu catabolismo é interessante por envolver 3 níveis de controle. Em *A. nidulans*, o gene *prnA* codifica uma proteína reguladora positiva induzida por prolina, que atua na ativação da transcrição dos genes estruturais *prnB*, *prnC* e *prnD*. Na presença de glutamina, ocorre repressão pelo N,

mediada por *areA* e, na presença de glicose, ocorre repressão catabólica mediada por *creA* (FELENBOK e col., 1989; ARST e SCAZZOCCHIO, 1985; MARZLUF, 1981).

Os genes estruturais e o gene regulador *prnA* formam um agregado gênico, cuja parte central é ocupada por sítios de ligação das proteínas *areA* e *creA*; do lado esquerdo, situam-se *prnD* e *prnA*, transcritos em direções opostas, e do lado direito situam-se *prnB* e *prnC*, transcritos na mesma direção, sem contudo constituírem mRNA policistrônico.

O produto gênico de *creA* é um regulador negativo que atua duplamente, reprimindo tanto os genes estruturais, quanto o regulador *prnA*. O gene *creA* é da classe dos genes regulatórios de amplo domínio, pois atua na repressão catabólica de muitas vias metabólicas em *A. nidulans*.

A regulação do catabolismo da prolina em *S. cerevisiae* é significativamente diferente da regulação em *Aspergillus nidulans*. Em *S. cerevisiae*, os genes estruturais e o regulador estão espalhados em diferentes cromossomos no genoma, e *put3*, regulador específico que corresponde a *prnA* em função, atua negativamente (MARZLUF, 1981).

A acetamida também pode ser utilizada como fonte de carbono e de N e seu metabolismo requer apenas a enzima acetamidase, codificada em *Aspergillus* pelo gene *amdS*. Apesar de possuir apenas um gene estrutural, a regulação da síntese de acetamidase é bastante complexa, envolvendo *areA* para a repressão catabólica, *amdA* e *facB* como reguladores positivos específicos e o gene integrador *intA*.

Diferentes compostos induzem a síntese de acetamidase, tais como acetato, acetamida, ω -aminoácidos, benzoato e benzamida. A indução é aditiva e cada fonte atua independentemente em diferentes sítios no promotor de *amdS* (HEESWIJCK e HYNES, 1991; ARST e SCAZZOCCHIO, 1985; MARZLUF, 1981).

Sobre *intA*, também chamado *amdR*, sabe-se que controla a expressão de genes estruturais de outras vias metabólicas, além de oferecer uma alternativa de regulação para *amdS* e, por estas razões é considerado um gene integrador, com função tal como sugerido no modelo de BRITTEN e DAVIDSON (1969) (ARST e SCAZZOCCHIO, 1985). Recentemente, foi identificada a região do gene *amdS* onde se liga a proteína codificada por *intA* (HEESWIJCK e HYNES, 1991).

2.2. A ENZIMA GLICOAMILASE E SUA REGULAÇÃO

A glicoamilase (E.C.3.2.1.3.) é uma exohidrolase produzida por muitos fungos e leveduras, capaz de catalizar a hidrólise de ligações α -1,4 e α -1,6 do amido, liberando glicose a partir de extremidades não redutoras (DIXON e WEBB, 1962).

2.2.1. GLICOAMILASES DE LEVEDURAS

A levedura *S. cerevisiae* possui uma glicoamilase intracelular específica (CLANCY e col., 1982; COLONNA e MAGEE, 1978), codificada pelo gene *SGA1*, sintetizada somente durante a esporulação (YAMASHITA e FUKUI, 1985). A var. *diastaticus* possui, além da intracelular, glicoamilase extracelular codificada por qualquer um dos genes *STA1* (*DEX1*); *STA2* (*DEX1*) ou *STA3* (*DEX3*), localizados em diferentes grupos de ligação (PRETORIUS e col., 1986a; ERRAT e NASIM, 1986; TAMAKI, 1978). A glicoamilase intracelular é responsável pela degradação de reservas internas de glicogênio durante a esporulação, não sendo essencial ao processo esporulativo (YAMASHITA e FUKUI, 1985). A glicoamilase extracelular permite a utilização do amido e dextrinas como fonte de carbono durante o crescimento vegetativo da levedura.

S. diastaticus ou *S. cerevisiae* var. *diastaticus* é considerada derivada de *S. cerevisiae* por aquisição da atividade amilolítica extracelular, a qual deve ter sido resultado de múltiplos eventos como perda de genes inibidores, normalmente presentes em linhagens de *S. cerevisiae* (PATEL e col., 1990; YAMASHITA e FUKUI, 1984a; POLAINA e WIGGS, 1983), aquisição de genes ativadores, além do aparecimento dos genes estruturais (YAMASHITA e FUKUI, 1984a).

Os genes estruturais, *STA1*, *STA2* e *STA3* codificam as isozimas GAI, GAI e GAIII e possuem mapas de restrição idênticos (PRETORIUS e LAMBRECHTS, 1991; PRETORIUS e col., 1986b; YAMASHITA e col., 1985a; YAMASHITA e FUKUI, 1983a). Foi sugerida origem comum para estes genes, a partir da fusão de parte do gene *SGA1* (sequência denominada Δ sta ou SGA) e outras sequências (S1 e S2) presentes no genoma de *S. cerevisiae* (YAMASHITA e FUKUI, 1987). Através de hibridização de DNA, YAMASHITA e col. (1985a) verificaram que a sequência SGA é homóloga à região 3' de *STA1* e as sequências S1 e S2 são homólogas à região 5'. A mesma homologia foi verificada para *STA2* por PRETORIUS e col. (1986b). Estudos de sequenciamento do gene e da proteína mostram que SGA corresponde ao domínio catalítico da enzima e S1 e S2 correspondem a região necessária ao processo de secreção, que tem alta homologia com sequências de outras enzimas secretadas (YAMASHITA e col., 1986b).

Os promotores de *STA1* e *STA2* foram analisados, tendo sido identificados

elementos comuns à transcrição de genes eucariotos, tais como TATA box e CATA box, além de determinadas sequências essenciais à transcrição e tradução, e sequências consenso de sítios conhecidos para ligação de proteínas regulatórias (LAMBRECHTS e col., 1991; SHIMA e col., 1989).

O sistema de regulação dos genes *STA* e *SGA1* é complexo e parece diferir de outros mecanismos regulatórios descritos, respondendo tanto a uma regulação específica quanto ao envolvimento de elementos de processos gerais, como esporulação (para revisão, PRETORIUS e LAMBRECHTS, 1991).

Os genes *GAM1* (*AMY2*), *GAM2* e *GAM3* atuam, provavelmente a nível transcricional, na regulação positiva dos genes *STA* (OKIMOTO e col., 1989). Os genes *GAM1* e *GAM2* apresentam efeitos pleiotrópicos, afetando também a esporulação e a fermentação de glicerol e lactato. Foi verificado que *GAM1* é um alelo do gene *SNF2*, envolvido na desrepressão de *SUC2*, gene que codifica a invertase (YOSHIMOTO e YAMASHITA, 1991). A proteína codificada por *GAM1* tem domínio rico em glutamina, que é característico de proteínas ativadoras em sistemas de regulação de leveduras. No entanto, não deve estar diretamente envolvida na interação com o DNA, pois não possui domínio comum desta natureza. Não foi detectado efeito pleiotrópico do gene *GAM3*, que pode estar mais especificamente envolvido com a regulação dos genes *STA* (OKIMOTO e col., 1989).

Além de genes ativadores, também foram descritos genes inibidores da atividade amilolítica em *S. cerevisiae*, tais como *INH1* (YAMASHITA e FUKUI, 1984a), *STA10* (POLAINA e WIGGS, 1983), *SGL1* (PATEL e col., 1990) e *MAT* (YAMASHITA e FUKUI, 1983b). O gene *STA10* inibe a expressão de *STA2* a nível transcricional (PARDO e col., 1986), provavelmente através de uma proteína repressora (PRETORIUS e col., 1986c). Diferentes autores relatam a diminuição da produção de glicoamilase extracelular em diplóides heterozigotos *MAT α /MAT α* (INUI e col., 1989; DRANGINIS, 1989; PRETORIUS e col., 1986c; YAMASHITA e col., 1985c), tendo sido concluído que *STA1*, *STA2* e *STA3* são regulados em diplóides a nível transcricional pelos repressores $\alpha 1$ - $\alpha 2$ (PRETORIUS e LAMBRECHTS, 1991), da mesma forma que outros genes regulados por *MAT* (DRANGINIS, 1986). Ainda a esse respeito, foi identificada sequência consenso na região 5' de *STA2*, conhecida como sítio de ligação da proteína repressora codificada por *MAT α /MAT α* (LAMBRECHTS e col., 1991).

Em relação ao gene *SGA1*, YAMASHITA e FUKUI (1985) sugeriram regulação positiva pela configuração heterozigota *MAT α /MAT α* , mas, na realidade, a atividade enzimática intracelular durante a esporulação depende apenas indiretamente destes genes, estando inserida numa sequência de eventos própria do processo esporulativo (PUGH e

CLANCY, 1990; PARDO e col., 1986). Até o momento, os resultados obtidos foram insuficientes para esclarecer o modo de ação e a interação de todos estes genes na regulação dos genes *STA* e *SGA1*.

Uma questão interessante sobre a regulação da atividade amilolítica em *S. cerevisiae* refere-se a possibilidade de *SGA* responder a fatores comuns a regulação da família *STA*, devido às implicações nos mecanismos de evolução propostos. Foram encontradas evidências de que um mecanismo comum controlaria a regulação de *SGA1* e da família *STA* durante o crescimento vegetativo e esporulativo (PRETORIUS e col., 1986c). PARDO e col. (1986), analisando produção de mRNA específico verificaram que *STA10* inibe a expressão tanto de *STA2* quanto de *SGA1* a nível transcricional. PUGH e CLANCY (1990) encontraram resultados divergentes analisando a atividade enzimática de linhagens com *STA2* e *SGA1* presentes em plasmídios e os genes cromossômicos defeituosos. Foi verificado que tanto linhagens *SGA1 STA10* quanto *SGA1 sta10* não apresentavam atividade amilolítica e concluiu-se que *STA10* não regula *SGA1* da mesma forma que regula os genes da família *STA*. Os autores admitiram, no entanto, que a diferença nos resultados obtidos pode ser devido a diferenças metodológicas e até que os genes *STA10* empregados não sejam os mesmos. Em contraposição a isto, com o sequenciamento da região 5' de *SGA1* e *STA2*, foram encontradas quatro sequências comuns aos 2 genes e uma delas foi sugerida ser o alvo para a regulação por *STA10* (PARDO e col., 1988).

2.2.2. GLICOAMILASE DE FUNGOS FILAMENTOSOS

A enzima glicoamilase de fungos filamentosos é uma glicoproteína que ocorre em múltiplas formas, variando em tamanho e eficiência no ataque ao amido cru. Essa eficiência é devido à presença de sítio de ligação ou adsorção ao substrato, somente presente na forma de maior tamanho (UEDA, 1981).

Aspergillus niger e *Aspergillus awamori* produzem 2 formas da enzima (NUNBERG e col., 1984; LINEBACK e col., 1969), G1 de peso molecular ao redor de 70.000 e G2 ao redor de 60.000 (MONTENECOURT e EVELEIGH, 1985; NUNBERG e col., 1984; BOEL e col., 1984a; SMILEY e col., 1971). *A. awamori* var. *kawachi* produz 3 formas, GAI de peso molecular de 90.000, GAI' de 83.000 e GAII de 57.000 (YOSHINO e HAYASHIDA, 1978). *Rhizopus* possui 3 formas, Gluc1 de peso molecular de 74.000, Gluc2 de 58.600 e Gluc3 de 61400 (TAKAHASHI e col., 1978). O sítio de adsorção ao amido cru das formas G1 e GAI das glicoamilases de *A. niger*, *A. awamori* e *A. awamori* var. *kawachi* se localizam na extremidade carboxílica (HAYASHIDA e col., 1988; NUNBERG e col., 1984; SVENSSON e col., 1982). No entanto, o sítio de adsorção presente na forma Gluc1 de *Rhizopus* se localiza na

extremidade N terminal da molécula (TAKAHASHI e col., 1985). TANAKA e col. (1986a) verificaram através da comparação das sequências de aminoácidos, que além da localização diferente na molécula, não há homologia entre os sítios de adsorção de G1 e Gluc1, sugerindo evolução molecular independente para as glicoamilases de *A. niger* e *Rhizopus*.

BOEL e col. (1984b) identificaram um único gene que codifica a glicoamilase de *A. niger*. Este gene possui 5 introns e um deles, de 169 pares de bases, foi sugerido estar envolvido no processamento diferencial do mRNA que origina a forma G2. Assim, a sequência de 169 pares de bases funciona como exon no mRNA que origina G1 e como intron no mRNA que origina G2. A retirada deste intron muda o quadro de leitura originando, não apenas uma enzima de tamanho menor, mas também com extremidade carboxílica diferente (BOEL e col., 1984a). No entanto, os autores não excluem a possibilidade de proteólise limitada como mecanismo adicional para a origem das 2 formas da enzima, o que foi observado por SVENSON e col. (1986) em estudos de sequenciamento proteico de preparações comerciais de glicoamilase. Mecanismos pós-traducionais, originando diferentes formas de glicoamilase fúngica, também foram sugeridos para *Rhizopus oryzae* (ASHIKARI e col., 1986) e *A. awamori* var. *kawachi* (HAYASHIDA e col., 1988; YOSHINO e HAYASHIDA, 1978).

Foi identificado um único gene estrutural da glicoamilase de *A. awamori*, que codifica a mesma sequência de aminoácidos e possui introns idênticos ao gene de *A. niger* (NUNBERG e col., 1984). Estes dois organismos devem, portanto, apresentar os mesmos processos para originar as 2 formas de suas enzimas, já que estas são também imunologicamente indistinguíveis (MONTENECOURT e EVELEIGH, 1985).

BOEL e col. (1984b) sugeriram a existência de 2 mecanismos diferentes para o processamento dos introns do gene da glicoamilase de *A. niger*, baseados em homologia com sequências consenso. Um deles é o auto-processamento, comum a genes de leveduras (PIKIELNY e col., 1983; LANGFORD e GALLWITZ, 1983) e o outro é comum a genes de eucariotos superiores (ROGERS e WALL, 1980).

O mRNA da forma G1 possui 1920 nucleotídeos, a partir do códon de iniciação ATG até o de término TGA. A forma G1 é sintetizada como um precursor de 640 aminoácidos, com peptídeo sinal de 18 resíduos e um propeptídeo de 6 resíduos. A enzima madura da forma G1 possui, portanto, 616 resíduos (BOEL e col., 1984a).

Dois pontos de início da transcrição foram encontrados no gene da glicoamilase de *A. niger*, situados respectivamente a 46 e a 70 pares de bases acima do códon de iniciação ATG (BOEL e col., 1984b). Além disso, estruturas típicas de promotores de

eucariotos, como TATA box e CATA box foram identificadas a -35 e -100 pares de bases respectivamente, acima do primeiro ponto de início da transcrição. Na extremidade 3', os últimos 10 nucleotídeos anteriores ao sítio de poliadenilação possuem 5 bases em comum com a sequência descrita por BENOIST e col. (1980) para essa região em genes eucarióticos. Dois dos três elementos consenso descritos por ZARET e SHERMAN (1982) para terminação da transcrição de genes de leveduras estão presentes.

O promotor do gene da glicoamilase de *A. awamori* também possui sequência consenso TATA box e CATA box a -31 e -93 pares de bases acima do primeiro, entre os múltiplos sítios de iniciação da transcrição encontrados (NUNBERG e col., 1984). A região 3' terminal não traduzida, anterior ao sítio de poliadenilação é idêntica à do gene da glicoamilase de *A. niger*, guardando, portanto, as mesmas características (NUNBERG e col., 1984; BOEL e col., 1984a).

Um único gene da glicoamilase está presente em *Rhizopus oryzae*, que contém 4 introns, promotor com estrutura TATA box e CATA box, e sequência consenso na região não traduzida do terminal 3' proposta como necessária para a poliadenilação (ASHIKARI e col., 1986). A forma Gluc1 da enzima possui 579 aminoácidos após a retirada do peptídeo sinal de 25 aminoácidos.

A regulação da síntese de glicoamilase em fungos filamentosos parece complexa e deve envolver outras enzimas amilolíticas. Em *A. niger*, FOWLER e col. (1990) verificaram que a xilose atua como repressor catabólico a nível transcricional e essa ação é superada pela presença de maltose ou glicose no meio de cultivo. Diferentemente, o amido não é capaz de neutralizar a repressão exercida pela xilose, o que demonstra que, por si só, o amido não é o sinal que desencadeia a síntese de glicoamilase. BARTON e col. (1972) sugeriram que uma outra enzima deve ser responsável pela degradação inicial do amido para gerar moléculas do indutor. Se isto estiver correto, a xilose deve ser o repressor catabólico desta enzima (FOWLER e col., 1990). É razoável se pensar na α -amilase para este papel, já que sua ação sobre o amido pode gerar maltose, glicose e dextrinas (FOGARTY e KELLY, 1977), conhecidos indutores da glicoamilase. No entanto, pouca ou nenhuma informação sobre regulação da α -amilase existe em *A. niger*.

Um sistema semelhante ao acima sugerido foi demonstrado para a degradação da celulose por *Trichoderma reesei*, onde níveis constitutivos baixos de atividade celulásica atuam sobre a celulose, produzindo moléculas menores, capazes de penetrar na célula e induzir o sistema (EL-GOGARY e col., 1989).

Quanto à regulação de enzimas amilolíticas em outros fungos, sabe-se que, em *A. oryzae*, 3 cópias do gene da α -amilase, também chamada de TAKA amilase A, estão

presentes (WIRSEL e col., 1989). Há evidências de que a regulação da síntese da enzima envolve indução e repressão catabólica e que a indução é exercida a nível transcricional (TADA e col., 1991; ERRAT e col., 1984). Grandes quantidades da enzima estão presentes no meio de cultivo, com apenas 20 horas de crescimento (ERRAT e col., 1984).

Em *A. awamori*, 2 cópias do gene da α -amilase estão presentes (KORMAN e col., 1990). A regulação não é indutiva e ocorre apenas através de repressão catabólica a nível traducional (BHELLA e ALTOSAAR, 1987). Isto significa que não é necessária a presença de um indutor, apenas a ausência do repressor catabólico, para que a enzima seja traduzida. Neste fungo foi demonstrado que a glicoamilase também sofre repressão catabólica, mediada por AMP cíclico (BHELLA e ALTOSAAR, 1988) e sua indução é regulada a nível transcricional (NUNBERG e col., 1984).

Em *A. terreus*, a síntese de glicoamilase está sujeita a indução e a repressão catabólica, sendo que a α -amilase está presente no meio de cultivo, em estágios iniciais da fermentação, mesmo com taxas altas de glicose, sugerindo que, neste caso, esta enzima não sofre repressão catabólica (GHOSH e col., 1990).

Os dados disponíveis até o momento são insuficientes para se sugerir uma coordenação da regulação de enzimas amilolíticas em qualquer uma das espécies acima mencionadas. Seria interessante, portanto, que estudos fossem conduzidos no sentido de evidenciar o possível envolvimento da α -amilase na indução da glicoamilase por amido.

Enzimas extracelulares podem ainda ser reguladas a nível pós-traducional, durante o processo secretório. O mecanismo geral da secreção de proteínas de eucariotos superiores foi estudado e mostrou-se bastante semelhante ao encontrado em leveduras (NOVICK e col., 1980; PALADE, 1975; JAMIESON e PALADE 1968a,b; 1967a,b). Estudos genéticos revelaram que pelo menos 23 produtos gênicos estão envolvidos no processo secretório em *S. cerevisiae* (NOVICK e col., 1980) e a sequência de eventos foi demonstrada através de mutantes duplos, revelando que as proteínas passam por uma série de estruturas membranosas, sendo glicosiladas passo a passo, enquanto são transferidas do sítio de síntese até o sítio de exportação na membrana plasmática (NOVICK e col., 1981).

Tem sido demonstrado, que apesar da complexidade envolvida no processo de secreção e de ainda não se saber os mecanismos moleculares de sua regulação, muitas proteínas heterólogas foram expressas em *S. cerevisiae* com atividade enzimática e glicosilação semelhantes à proteína nativa (SOGAARD e SVENSSON, 1990; KUMAGAI e col., 1990; TANAKA e col., 1986b).

Na realidade, as barreiras encontradas na expressão de proteínas heterólogas em *S. cerevisiae* foram de outra natureza. INNIS e col. (1985) só conseguiram a expressão do gene da glicoamilase de *A. awamori* em *S. cerevisiae* após utilização da sequência do gene sem introns, sob o controle do promotor e com o terminador do gene da enulinase de *S. cerevisiae* para a transformação. Os resultados mostraram que a levedura não é capaz de reconhecer os sinais daquelas sequências do gene de *A. awamori*.

PENTTILA e col. (1984) também não obtiveram expressão de 4 entre 5 genes obtidos do banco genômico de *A. niger* para transformar *S. cerevisiae*. Entre os genes não expressos constava o da glicoamilase.

ASHIKARI e col. (1986) ao contrário, conseguiram expressão do gene da glicoamilase de *Rhizopus oryzae* sob o controle de seu próprio promotor em *S. cerevisiae*, mas o nível de secreção foi extremamente baixo. Estes resultados levaram os autores a uma nova tentativa, mas com o gene sob o controle do promotor do gene da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de levedura (ASHIKARI e col., 1989). Foi observado então que transformantes com alto número de cópias do plasmídeo contendo o gene secretavam apenas 2 vezes mais enzima que transformantes de cópia única. Resultados semelhantes foram obtidos por VANONI e col. (1989) com relação ao gene *STA2* da glicoamilase de *S. cerevisiae* var. *diastaticus*. Os autores observaram que o aumento do número de cópias do gene elevou a quantidade de mRNA, sem elevar correspondentemente a atividade enzimática e acarretou ainda glicosilação incompleta. Estes resultados mostraram que o sistema de secreção de *S. cerevisiae* é rapidamente saturado e que a glicosilação pode ser um fator limitante, quando proteínas altamente glicosiladas, como é o caso da proteína *STA2*, são expressas em níveis além do selvagem. Por outro lado, KOTYLAK e EL-GEWELY (1991) descreveram um gene ligado ao gene *STA3* que confere aumento na secreção de glicoamilase em *S. cerevisiae* de aproximadamente 6 vezes em comparação ao selvagem. Este gene foi demonstrado ser específico em relação a atividade amilolítica, pois a secreção de outras enzimas extracelulares examinadas não foram alteradas.

Apesar do vasto conhecimento adquirido sobre a utilização de leveduras em processos fermentativos e a maior facilidade de utilização destes organismos em escala industrial, devido às limitações citadas acima, muitos pesquisadores tem se voltado para a possibilidade de utilização de fungos filamentosos como vetores de expressão de proteínas heterólogas. Este fato é de grande incentivo ao desenvolvimento dos conhecimentos básicos nestes organismos.

2.3 ASPECTOS GENÉTICOS DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DE INTERESSE ECONÔMICO

É sabido que os aspectos e os organismos mais bem estudados em Genética não são aqueles de maior interesse econômico. Isto se deve, por um lado, ao fato que para geneticistas, é mais fácil utilizar modelos genéticos em seus estudos e por outro, melhoristas, pelo menos até certo tempo atrás, conseguiam seus objetivos a despeito de um conhecimento mais profundo dos organismos com os quais trabalhavam.

Esta situação tem se modificado nos últimos anos devido ao desenvolvimento das novas técnicas de recombinação, cuja utilização pode promover ganhos significativos, mas que, em contrapartida, requer maior conhecimento específico da genética e bioquímica do organismo a ser melhorado. Apesar disto, os estudos de regulação gênica de vias metabólicas de produtos de interesse industrial aqui descritos ainda refletem a tendência comentada acima.

CAGLIOTI e SERMONTI (1956) e SERMONTI (1956) isolaram mutantes penicilina negativos em *Penicillium chrysogenum*, que cruzados entre si, determinaram a existência de 2 loci gênicos, localizados em cromossomos diferentes, envolvidos na produção de penicilina nesta espécie. NORMANSELL e col. (1979) obtiveram 78 mutantes do mesmo tipo, entre os quais escolheram 12 com menor título para estudos mais detalhados. Foram determinados 5 loci gênicos, cujos mutantes representantes de cada locus, analisados bioquimicamente, demonstraram diferenças nos produtos acumulados.

Trabalhos utilizando mutantes penicilina negativos também foram realizados em *Aspergillus nidulans*, que, apesar de produzir menor quantidade do antibiótico que *P. chrysogenum*, era vantajoso como modelo genético para estes estudos. EDWARDS e col. (1974) isolaram 28 mutantes com produção de penicilina diminuída, que se distribuíram em 4 grupos de complementação, denominados A, B, C e D. Vinte destas mutações, denominadas *npeA* pertenciam ao grupo de complementação A, localizado posteriormente no cromossomo VI (HOLT e col., 1976) e as mutações pertencentes aos grupos de complementação B, C e D, denominadas *npeB*, *npeC* e *npeD*, foram mapeadas nos cromossomos III, IV e II, respectivamente (MAKINS e col., 1983). As mutações *npe* foram demonstradas serem todas recessivas (EDWARDS e col., 1974).

Mutações que conferiram produção aumentada de penicilina também foram obtidas em *A. nidulans*, denominadas *penA* (recessiva), *penB* (dominante) e *penC* (semi-dominante) localizadas nos cromossomos VIII, III e IV respectivamente

(DITCHBURN e col., 1976). As posições destes genes nos cromossomos III e IV demonstraram que *npeB* e *penB*, assim como *npeC* e *penC* não são mutações nos mesmos genes (EDWARDS e col., 1974; DITCHBURN e col., 1976), o que foi confirmado nos resultados obtidos por MAKINS e col. (1983).

PAPA (1979) obteve 14 mutantes que não produziam aflatoxina em *Aspergillus flavus*, denominados *afl*. O gene *afl1*, localizado no cromossomo VII, foi demonstrado ser dominante. Os demais genes eram todos recessivos e *afl4* foi localizado no cromossomo II. Mais tarde, estudos genéticos e bioquímicos demonstraram que o gene *afl1* não estava diretamente relacionado com a produção da toxina, podendo estar envolvido em passos de sua regulação ou secreção (PAPA, 1980). O gene *nor*, que é responsável pelo acúmulo de um intermediário da síntese de aflatoxina, foi mapeado no cromossomo VII, bem próximo ao gene *afl1* (PAPA, 1982).

Em *Aspergillus parasiticus*, as mutações *afl1* e *afl2*, que impedem a produção de aflatoxina, foram mapeadas em diferentes grupos de ligação (PAPA, 1978) e as mutações *norA* e *verA*, que causam bloqueios e, conseqüentemente, acúmulo de intermediários da síntese da toxina, foram mapeadas no mesmo grupo de ligação (BRADSHAW e col., 1983).

WITTEVEEN e col. (1990) e SWART e col. (1990) isolaram, caracterizaram e mapearam diversos mutantes com alteração na produção de glicose oxidase em *Aspergillus niger* na tentativa de esclarecer pontos básicos do mecanismo de indução da produção. Três genes foram mapeados no grupo de ligação II, um no grupo III, dois no grupo V e dois no grupo VII (SWART e col., 1990). Entre os mutantes obtidos, dois deles possuíam características que demonstraram que fatores genéticos diferentes controlam a indução por glicose, e a influência da tensão de oxigênio na produção da enzima neste fungo (WITTEVEEN e col., 1990).

NGA e col. (1989) obtiveram 14 mutantes lipase negativos na levedura *Yarrowinia lipolytica*, os quais se distribuíram em 3 grupos de complementação. Os 13 mutantes que compreendem o primeiro e o segundo grupo são alterações no gene estrutural e apresentam complementação interalélica para certas combinações. O único mutante que compreende o terceiro grupo pode ter uma alteração em gene envolvido com secreção de lipase.

TAMAKI (1978) demonstrou, através de cruzamento de linhagens de origens diferentes, a existência de 3 genes estruturais da glicoamilase em *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, denominados *STA1*, *STA2* e *STA3*, os quais foram localizados respectivamente nos grupos de ligação IV, II e XIV, através de mapeamento por

eletroforese, por PRETORIUS e MARMUR (1988). Mutação no gene estrutural *STA1* foi detectada por YAMASHITA e FUKUI (1984b) em mutantes não produtores de glicoamilase denominados *amy1*. Uma descrição detalhada dos genes envolvidos na regulação da produção da enzima glicoamilase em *S. cerevisiae* var. *diastaticus* se encontra no item 2.2.1. desta revisão.

Dando início a estudos básicos sobre a regulação e secreção da produção da enzima glicoamilase em uma linhagem industrial de *A. niger* (denominada 10v10, BONATELLI JR., 1981), VALENT (1985) padronizou uma metodologia de avaliação da atividade amilolítica que mede preferencialmente glicoamilase e estabeleceu um método de seleção de mutantes de baixa e média produção. Com este método foram obtidos, dentre 268 colônias sobreviventes a tratamento com luz Ultra-violeta, 3 mutantes com baixa produção (até 30% da produção parental) e 5 mutantes com produção média (de 35 a 50% da produção parental), sendo que todas as mutações se mostraram recessivas em relação ao alelo selvagem.

CALIL (1988) estabeleceu modificação do método de seleção desenvolvido por VALENT (1985), que permitiu a obtenção de mutantes com atividade enzimática de 10 a 60% maior que a da linhagem parental. Três, dos 4 mutantes obtidos, se mostraram recessivos (*hap112*, *hap147* e *hap169*) e um semi-dominante (*hap252*) em relação ao alelo selvagem.

VALENT e col.(1992) sugeriram que pelo menos 3 genes, presentes em diferentes grupos de ligação, são capazes de baixar a produção de glicoamilase em *A. niger*. Um destes genes, *lgaA61*, foi mapeado no grupo de ligação II e os outros 2 não estão ligados aos marcadores dos grupos I e II.

CALIL (1988) sugeriu que, no mínimo, 4 a 5 genes condicionam aumento na produção de glicoamilase nas linhagens de *A. niger* utilizadas em seu trabalho e que os genes *hap147*, *hap169* e *hapA252* estão presentes no grupo de ligação I e *hapB252* no grupo II. O gene *hap112* foi demonstrado não estar presente nos grupos de ligação I e II. Estes genes foram posteriormente denominados *hgp* - high glucoamylase production.

Com o objetivo de se estabelecer novos marcadores genéticos para posterior mapeamento dos mutantes de produção que não puderam ser mapeados nos grupos de ligação disponíveis, foram obtidos mutantes auxotróficos e de resistência a drogas (MASIERO, 1988; MASIERO e BONATELLI JR., 1989), com os quais foi possível identificar 2 novos grupos de ligação (grupos III e IV), além dos 2 inicialmente identificados (grupos I e II) (BONATELLI JR., 1981). O único marcador observado no grupo de ligação III (*lysA₁*) mostrou efeito de redução na produção de glicoamilase de

aproximadamente 95% quando comparado com o alelo selvagem. Este fato poderia constituir um problema na sua utilização para mapeamento de genes com produção alterada, no entanto, isto pode ser contornado através de análise genética cuidadosa (MASIERO e BONATELLI JR., 1989).

Ainda em relação ao estudo da produção de glicoamilase nestas linhagens, VIALTA (1987) e OLIVEIRA (1991) estudaram as interações gênicas em híbridos interespecíficos de *A. niger* e *A. awamori*. VIALTA (1987) observou que estes híbridos apresentavam produção de glicoamilase semelhante ao parental *A. niger*. Esta observação foi mais amplamente estudada nos trabalhos de OLIVEIRA (1991), que demonstrou que não há boa complementação de genes de produção de glicoamilase em híbridos entre as duas espécies, sendo que os resultados obtidos sugeriram dominância dos fatores de produção de *A. niger* sobre os de *A. awamori*, explicado possivelmente por repressão alélica, como descrito por WILSON e col. (1974 a,b) para híbridos interespecíficos de eucariotos. Estes resultados são interessantes, já que se sabe que os genes estruturais das duas espécies são praticamente idênticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. LINHAGENS DE *Aspergillus niger* UTILIZADAS

pab1 fun1 - mutante deficiente para ácido p-aminobenzóico, confídios marrom-claro e produção de glicoamilase considerada como padrão normal (BONATELLI JR., 1981).

nic1 oliv - mutante deficiente para ácido nicotínico, confídios verde-oliva e produção de glicoamilase considerada como padrão normal (BONATELLI JR., 1981).

lgp05 - mutante deficiente para ácido p-aminobenzóico, confídios marrom-claro, crescimento lento em amido como única fonte de carbono e baixa produção de glicoamilase (VALENT e col., 1992).

lgp61 - mutante deficiente para ácido p-aminobenzóico, confídios marrom-claro e baixa produção de glicoamilase (mutação denominada *lgpA₆₁*, gene mapeado no grupo de ligação II, juntamente com o gene *pabA₁*) (VALENT, 1985).

lgp73 - mutante deficiente para ácido nicotínico e ácido p-aminobenzóico, confídios verde-oliva, crescimento lento em amido como única fonte de carbono e baixa produção de glicoamilase (VALENT e col., 1992).

hgp112, *hgp147*, *hgp169*, *hgp252* - mutantes deficientes para ácido p-aminobenzóico, confídios marrom-claro e alta produção de glicoamilase (CALIL, 1988).

SM-13 par. - recombinante deficiente para lisina e metionina, confídios marrom claro e baixa produção de glicoamilase (MASIERO e BONATELLI JR., 1989).

SV-10 par. - recombinante deficiente para lisina e metionina, confídios verde-oliva e baixa produção de glicoamilase (MASIERO e BONATELLI JR., 1989).

3.2. MEIOS DE CULTURA

3.2.1. MEIO MÍNIMO (MM)(PONTECORVO e col., 1953)

Nitrato de sódio	6,00g
Cloreto de potássio	0,52g
Sulfato de magnésio	0,52g

Fosfato dihidrogenado de potássio	1,52g
Sulfato de ferro	traços
Sulfato de zinco	traços
Glicose	10,00g
Água destilada	1000ml

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH (4%) ou HCl (1N); quando desejado sólido, adicionou-se 1,5% de ágar. Quando necessário, adicionaram-se requerimentos nutricionais nas concentrações de 100 µg/ml para aminoácidos e 5 µg/ml para vitaminas.

3.2.2. MEIO MÍNIMO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

A glicose do meio descrito no item 3.2.1. foi substituída por amido (MM+A), maltose (MM+M), lactose (MM+L), galactose (MM+G), xilose (MM+X), sacarose (MM+SA) ou sorbitol (MM+SO), na concentração de 1% (p/v).

3.2.3. MEIO COMPLETO (MC) (PONTECORVO e col., 1953, modificado de acordo com AZEVEDO e COSTA, 1973).

Adicionou-se a 1 litro de MM:

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

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH (4%) ou HCl (1N). Quando desejado sólido, adicionou-se ágar 1,5%.

3.2.4. MEIO DE FERMENTAÇÃO (MAC) (BONATELLI JR. e col., 1984).

Farinha de raspa integral de mandioca	20,0g
Nitrato de sódio	2,0g
Fosfato dihidrogenado de potássio	1,0g
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,5g
Água destilada	1000ml

O pH foi ajustado para 5,5 e a esterilização foi feita por 15 minutos a 1 atm. Quando necessário, adicionaram-se requerimentos nutricionais como especificado no item 3.2.1.

3.2.5. MEIO DE FERMENTAÇÃO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

A farinha de raspa integral de mandioca do meio descrito no item 3.2.4. foi substituída por amido solúvel (MAS), maltose (MAL) ou glicose (MAG) na concentração de 1% (p/v).

3.2.6. MEIO MÍNIMO + 4% DE MEIO COMPLETO (MM + 4% MC)

Foi adicionado 4ml de MC líquido (item 3.2.3.) a 96ml de MM líquido (item 3.2.1.) e porções de 2,5ml da solução final foram distribuídas em tubos de ensaio e esterilizadas (item 3.4.).

3.3. SOLUÇÕES

3.3.1. SOLUÇÃO TWEEN

Foi feita solução de tween 80 0,1% (v/v) com água destilada e porções de 2,5ml desta foram distribuídas em tubos de ensaio e esterilizadas (item 3.4.).

3.3.2. SOLUÇÃO SALINA

Foi feita solução de NaCl 0,85% (p/v) com água destilada e porções de 9,4ml desta foram distribuídas em frascos com tampa de baquelite e esterilizadas (item 3.4.).

3.3.3. SOLUÇÃO DE VITAMINAS

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

A esterilização foi feita por alternância de tratamento em banho-maria 60°C, com tratamento à temperatura ambiente por 30 minutos, durante oito horas.

3.3.4. SOLUÇÃO BENLATE

Dissolveram-se 60mg de benlate (fungicida Metil-1 butil-carbamoil-2-benzimidazol-carbamato) em 1ml de acetona e então acrescentaram-se 99ml de água destilada esterilizada. Conservou-se em frasco escuro a 4°C.

3.3.5. SOLUÇÃO TAMPÃO AMIDO

Dissolveu-se, a quente, 1g de amido solúvel (Reagen ou Merck) em 50ml de água destilada e adicionaram-se 50ml de tampão citrato 0,1M pH 4,0 (aproximadamente 33ml de ácido cítrico 0,1M + 17ml de citrato de sódio 0,1M).

3.4. ESTERILIZAÇÃO

Os meios de cultura e soluções utilizadas foram esterilizados em autoclave a 1 atm por 20 minutos, a não ser para o meio de fermentação MAC, item 3.2.4.

3.5. INCUBAÇÃO E CULTIVO

As linhagens foram inoculadas em placas de Petri e incubadas à temperatura de 30°C por 6 dias para crescimento vegetativo.

3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.6.1. PRODUÇÃO DE GLICOAMILASE (GA)

Os ensaios para produção de GA foram feitos em frascos de 30ml, contendo 5ml de meio de fermentação (itens 3.2.4. e 3.2.5.). Os frascos foram inoculados diretamente com alça de níquel-cromo a partir de colônias cultivadas como descrito no item 3.5.. Os frascos foram incubados a 30°C e, após 4 dias, foi medida a atividade enzimática como descrito no item 3.6.2..

3.6.2. MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Amostras de 0,5ml do meio de fermentação convenientemente diluído, obtido a

partir do procedimento descrito no item 3.6.1. foram incubadas com 0,5ml de solução tampão amido (item 3.3.5.), por 60 minutos a 60°C. As amostras foram então transferidas para banho fervente, para inativação da enzima. A quantidade de açúcares redutores liberada pela GA foi estimada pelo método da ortotoluidina, utilizando-se kits para determinação de glicose (LABTEST, DOLLES ou BIOBRÁS). O espectrofotômetro (Coleman, mod 296) foi ajustado no comprimento de onda, conforme especificações de cada kit (625 ou 630nm). A quantidade de açúcares redutores foi expressa em mg/100ml e cada 10mg/ml correspondeu a uma unidade de GA.

3.7. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DIPLÓIDES

3.7.1. OBTENÇÃO

Os diplóides foram obtidos via ciclo parassexual (ROPER, 1952), misturando-se conídios de linhagens com marcas auxotróficas e/ou morfológicas, em MM + 4% MC (item 3.2.6.). Após 2-3 dias, a película formada foi transferida para MM. Conídios do heterocário formado foram transferidos para solução tween (item 3.3.1.) e, em seguida, semeados em MM para isolamento de diplóides. As colônias que cresceram uniformes em coloração de conídios foram purificadas por estrias em MM e então foi feita a caracterização dos diplóides (item 3.7.2.).

3.7.2. CARACTERIZAÇÃO

Os critérios para caracterização de diplóides foram os seguintes:

1. Prototrofia - devido à complementação de marcas auxotróficas, o diplóide deve crescer em MM.
2. Coloração de conídios - o cruzamento de mutantes de coloração de conídios diferente resulta em diplóide com coloração selvagem (preta) devido à complementação.
3. Teste em benlate - em meio contendo o agente haploidizante benlate (HASTIE, 1970; UPSHALL e col., 1976), os diplóides devem formar setores com coloração de conídios similar às parentais.

3.8. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEGREGANTES HAPLÓIDES

A PARTIR DOS DIPLÓIDES ESTUDADOS

3.8.1. OBTENÇÃO

O isolamento de segregantes haplóides foi feito inoculando-se diplóides por ponto em placas de Petri com MC + 1-2 µg/ml de benlate. Outro procedimento empregado para obtenção de segregantes foi a semeadura de uma suspensão de conídios (10^3 conídios/placa de Petri) dos diplóides por "pour plate" em MC + benlate na concentração de 1-2 µg/ml (BOS e col., 1988). Desta forma, pode-se obter um número maior de segregantes verde-oliva, os quais geralmente crescem mais devagar que os marrom-claro. Os setores observados foram purificados por estria em MC e caracterizados (item 3.8.2.).

3.8.2. CARACTERIZAÇÃO

Os segregantes obtidos foram caracterizados quanto à coloração de conídios, auxotrofia, crescimento em MM+A e produção de glicoamilase. Para se determinarem as marcas auxotróficas dos segregantes, utilizou-se uma bateria de placas de Petri com MC, MM, MM + todos os requerimentos nutricionais envolvidos e ainda uma série de placas, contendo MM + todos os requerimentos nutricionais menos um. O crescimento em MM+A (item 3.2.1.) foi testado nos segregantes dos cruzamentos que envolveram esta marca. A avaliação dos resultados foi feita após 2 dias de crescimento para marcas auxotróficas e 2,5 dias para crescimento em MM+A. A produção de glicoamilase dos segregantes foi avaliada como descrito no item 3.6., com uma repetição por segregante.

3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de produção obtidos foram analisados estatisticamente por Análise de Variância e Teste de Médias (Teste de Tukey) (PIMENTEL GOMES, 1970).

4. RESULTADOS

4.1. CRESCIMENTO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

As linhagens parentais *pab1 fum1* e *nic1 obv3*, os mutantes de baixa produção de glicoamilase *lgp05*, *lgp61* e *lgp73* e os mutantes de alta produção *hgp112*, *hgp147*, *hgp169* e *hgp252* foram inoculados em placas de Petri com MM (item 3.2.1.), MM+A, MM+M, MM+L, MM+G, MM+X, MM+SA e MM+SO (item 3.2.2.) para se verificar o crescimento em diferentes fontes de carbono e se determinarem diferenças entre as linhagens. Foram feitas medidas de diâmetro das colônias após 3 dias de crescimento (3 repetições por linhagem por placa de Petri).

Nenhuma das linhagens foi capaz de crescer em galactose e todas apresentaram crescimento residual em lactose após o terceiro dia. Pela TABELA 1 pode-se observar que não houve diferenças evidentes no tamanho das colônias, a não ser quando amido foi adicionado como única fonte de carbono. Neste meio de cultivo, com 3 dias de incubação, o mutante de baixa produção *lgp73* não formou colônia e o mutante *lgp05* começou a apresentar crescimento residual. Como padrão normal foi observado que as demais linhagens começaram crescer efetivamente após o segundo dia de incubação em MM+A.

TABELA 1 Média do diâmetro das colônias (cm) das linhagens parentais e mutantes *lgp* e *hgp*, crescidas em MM com diferentes fontes de carbono, após 3 dias de incubação.

LINHAGENS	GLICOSE	AMIDO	SORBITOL	MALTOSE	XILOSE	SACAROSE
<i>pab1 fum1</i>	1,7	1,8	1,9	1,7	1,6	1,6
<i>nic1 olvs</i>	1,6	1,6	1,7	1,6	1,2	1,5
<i>lgp05</i>	1,5	0,0	1,8	1,8	1,4	1,6
<i>lgp61</i>	1,5	1,8	1,5	1,7	1,3	1,5
<i>lgp73</i>	1,5	0,0	1,4	1,5	1,7	1,3
<i>hgp112</i>	1,2	1,6	1,6	1,4	1,1	1,5
<i>hgp147</i>	1,5	2,0	1,7	1,7	1,4	1,6
<i>hgp169</i>	1,8	1,8	1,9	1,6	1,7	1,7
<i>hgp252</i>	1,6	2,2	1,7	1,7	1,5	1,7

Não houve crescimento em galactose e em lactose houve crescimento residual.

4.2. PRODUÇÃO DE GA EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

As linhagens parentais e os mutantes de baixa (*lgp*) e alta produção (*hgp*) foram ensaiados para produção de glicoamilase (item 3.6) em meios com farinha de raspa integral de mandioca (MAC, item 3.2.4.), amido solúvel (MAS, item 3.2.5.), maltose (MAL, item 3.2.5.) e glicose (MAG, item 3.2.5.) como fonte de carbono, com o objetivo de se caracterizarem os grupos de linhagens quanto à indução e se identificarem diferenças entre linhagens do mesmo grupo.

Os resultados das médias de produção estão apresentados na TABELA 2 e os resultados completos (5 repetições por linhagem por tratamento) estão na TABELA A1 e A2 (Apêndice de Tabelas).

Para cada tratamento e também para cada linhagem nos diferentes tratamentos, foram feitas as análises de variância (TABELAS A3 a A20 Apêndice de Tabelas), e os testes de médias (Tukey) apresentados nas TABELAS 3 a 20.

Em MAC (TABELA 3) a produção de GA das linhagens *lgp* diferiu significativamente da produção das linhagens parentais *pab1 fum1* e *nic1 olv3*, sendo que o mutante *lgp73* diferiu também dos outros mutantes *lgp*. O mesmo padrão de produção foi encontrado em MAS (TABELA 4), sendo que em MAL (TABELA 5) a linhagem *lgp05* diferiu em produção das demais linhagens *lgp*. Em MAG (TABELA 6), todas as *lgp* mostraram níveis de produção de GA próximos ou iguais a zero.

TABELA 2 Média de produção de GA (U/ml) das linhagens parentais e dos mutantes *lgp* e *hgp* em meio com farinha de raspa integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.

LINHAGENS	MAC	MAS	MAL	MAG
<i>pab1 fun1</i>	12,3	8,5	6,3	3,3
<i>nic1 olv3</i>	7,0	5,8	5,6	3,0
<i>lgp05</i>	1,9	2,2	2,4	0,2
<i>lgp61</i>	1,2	2,2	0,1	0,1
<i>lgp73</i>	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>pab1 fun1</i>	15,3	13,3	5,1	2,4
<i>hgp112</i>	22,1	11,2	6,0	4,5
<i>hgp169</i>	23,7	17,2	10,5	6,0
<i>hgp252</i>	18,9	12,0	8,4	6,3
<i>hgp147</i>	17,9	11,9	8,2	5,4

TABELA 3 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes *lgp*, e das linhagens parentais *pab1 fum1* e *nic1 olv3* em MAC, pelo teste de Tukey.

Linhagem	Média de Produção (U/ml)			
<i>pab1 fum1</i>	12,3	a		
<i>nic1 olv3</i>	7,0		b	
<i>lgp05</i>	1,9			c
<i>lgp61</i>	1,2			c
<i>lgp73</i>	0,0			d

DMS a 5% = 1,2

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%

TABELA 4 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes *lgp*, e das linhagens parentais *pab1 fum1* e *nic1 olv3* em MAS, pelo teste de Tukey.

Linhagem	Média de Produção (U/ml)			
<i>pab1 fum1</i>	8,5	a		
<i>nic1 olv3</i>	5,8		b	
<i>lgp05</i>	2,2			c
<i>lgp61</i>	2,2			c
<i>lgp73</i>	0,0			d

DMS a 5% = 1,3

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%.

TABELA 5 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes *lgp*, e das linhagens parentais *pab1 fum1* e *nic1 olv3* em MAL, pelo teste de Tukey.

Linhagem	Média de Produção (U/ml)	
<i>pab1 fum1</i>	6,3	a
<i>nic1 olv3</i>	5,6	a
<i>lgp05</i>	2,4	b
<i>lgp61</i>	0,1	c
<i>lgp73</i>	0,1	c

DMS a 5% = 0,9

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%

TABELA 6 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes *lgp*, e das linhagens parentais *pab1 fum1* e *nic1 olv3* em MAG, pelo teste de Tukey.

Linhagem,	Média de Produção (U/ml)	
<i>pab1 fum1</i>	3,3	a
<i>nic1 olv3</i>	3,0	a
<i>lgp05</i>	0,2	b
<i>lgp61</i>	0,1	b
<i>lgp73</i>	0,0	b

DMS a 5% = 0,4

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%.

As linhagens parentais apresentaram redução de produção de GA em relação ao MAC, quando cultivadas em MAS, MAL e MAG (TABELAS 7 e 8), sendo que em MAG ocorreu a maior porcentagem de redução observada. Considerando-se o meio MAC como o mais favorável para indução de GA, as linhagens *lgp* apresentaram padrões diferentes de redução de produção nas fontes de carbono testadas, em relação aos níveis obtidos em MAC. A *lgp05* apresentou redução dos níveis de GA apenas em MAG (TABELA 9); a *lgp61* em MAL e MAG (TABELA 10) e a *lgp73* (TABELA 11) diferiu das demais *lgp* por praticamente não produzir GA em todos os meios de fermentação testados.

Em geral, as linhagens *hgp* apresentaram níveis de produção de GA mais altos que a linhagem parental em todos os meios de fermentação testados (TABELAS 12, 13, 14, 15), mas essa diferença não foi significativa a nível de 5%, para todas as linhagens em todos os tratamentos, a não ser em MAG (TABELA 15). Em MAC (TABELA 12), meio de fermentação utilizado na seleção destes mutantes, a *hgp147* não diferiu da parental *pab1 fum1* a nível de 5%. Em meio com amido solúvel (TABELA 13) ou maltose (TABELA 14) como fonte de carbono, apenas a *hgp169* diferiu da parental.

A glicose (TABELA 15) não é considerada um bom indutor da produção de GA, no entanto, as *hgp* tiveram produção de enzima significativamente maior que a parental e apresentaram valores mais constantes de produção em MAG do que nos outros meios de fermentação utilizados (TABELA A2, Apêndice de Tabelas).

TABELA 7 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem *pab1 fun1* nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.

Meio de Cultivo	Média de Produção (U/ml)		
MAC	12,3	a	
MAS	8,5		b
MAL	6,3		c
MAG	3,3		d

DMS a 5% = 1,4

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%.

TABELA 8 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem *nic1 olv3* nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.

Meio de Cultivo	Média de Produção (U/ml)		
MAC	7,0	a	
MAS	5,8		b
MAL	5,6		b
MAG	3,0		c

DMS a 5% = 0,7

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%.

TABELA 9 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem *lpp05* nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.

Meio de Cultura	Média de Produção (U/ml)	
MAL	2,4	a
MAS	2,2	a
MAC	1,9	a
MAG	0,2	b

DMS a 5% = 1,3

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%.

TABELA 10 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem *lpp61* nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.

Meio de Cultivo	Média de Produção (U/ml)	
MAS	2,2	a
MAC	1,2	b
MAL	0,1	c
MAG	0,1	c

DMS a 5% = 0,9

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente nível de 5%.

TABELA 11 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem *hgp73* nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.

Meio de Cultura	Média de Produção (U/ml)		
MAL	0,1	a	
MAS	0,0		b
MAC	0,0		b
MAG	0,0		b

DMS a 5% = 0,04

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%.

TABELA 12 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes *hgp* e da linhagem parental *pab1 fum1* em MAC, pelo teste de Tukey.

Linhagens	Média de Produção (U/ml)			
<i>hgp169</i>	23,7	a		
<i>hgp112</i>	22,1	a	b	
<i>hgp252</i>	18,9		b	c
<i>hgp147</i>	17,9		c	d
<i>pab1 fum1</i>	15,3			d

DMS a 5% = 3,6

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%

TABELA 13 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes *hgp* e da linhagem parental *pab1 fum1* em MAS, pelo teste de Tukey.

Linhagens	Média de Produção (U/ml)	
<i>hgp169</i>	17,2	a
<i>pab1 fum1</i>	13,3	b
<i>hgp252</i>	12,0	b
<i>hgp147</i>	11,9	b
<i>hgp112</i>	11,2	b

DMS a 5% = 2,5

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%.

TABELA 14 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes *hgp* e da linhagem parental *pab1 fum1* em MAL, pelo teste de Tukey.

Linhagens	Média de Produção (U/ml)		
<i>hgp169</i>	10,5	a	
<i>hgp252</i>	8,4	a	b
<i>hgp147</i>	8,2	a	b
<i>hgp112</i>	6,0		b
<i>pab1 fum1</i>	5,1		b

DMS a 5% = 3,4

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%.

TABELA 15 Comparação das médias de produção de GA dos mutantes *hgp* e da linhagem parental *pab1 fum1* em MAG, pelo teste de Tukey.

Linhagens	Média de Produção (U/ml)		
<i>hgp252</i>	6,3	a	
<i>hgp169</i>	6,0	a	b
<i>hgp147</i>	5,4	a	b
<i>hgp112</i>	4,5		b
<i>pab1 fum1</i>	2,4		c

DMS a 5% = 1,7

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%.

Do mesmo modo como observado nos mutantes *lgp*, nos mutantes *hgp*, os níveis de produção de GA mais elevados foram observados com farinha de raspa integral de mandioca como fonte de carbono (MAC). Através das TABELAS 16, 17, 18, 19 e 20 pôde-se verificar que os mutantes *hgp* apresentaram redução de produção de GA em MAS, MAL e MAG diferente da observada na linhagem parental. Nesta, os níveis de produção em MAC e em MAS foram semelhantes, assim como os níveis em MAL e MAG (TABELA 16). Nos mutantes, a produção em MAS foi menor que em MAC, e em relação aos níveis obtidos em MAL e MAG, pôde-se agrupá-los em duas classes: os que apresentaram produção semelhante nestes meios de fermentação, *hgp112* e *hgp147* (TABELAS 18 e 20), e os que apresentaram produção significativamente diferente, *hgp169* e *hgp252* (TABELAS 17 e 19).

TABELA 16 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem *pab1 fun1* nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.

Meio de Cultivo	Média de Produção (U/ml)	
MAC	15,3	a
MAS	13,3	a
MAL	5,1	b
MAG	2,4	b

DMS a 5% = 3,2

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%.

TABELA 17 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem *hgp169* nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.

Meio de Cultivo	Média de Produção (U/ml)	
MAC	23,7	a
MAS	17,2	b
MAL	10,5	c
MAG	6,0	d

DMS a 5% = 2,3

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%.

TABELA 18 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem *hgp112* nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.

Meio de Cultivo	Médias de Produção (U/ml)	
MAC	22,1	a
MAS	11,2	b
MAL	6,0	c
MAG	4,5	c

DMS a 5% = 2,9

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%.

TABELA 19 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem *hgp252* nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.

Meio de Cultivo	Médias de Produção (U/ml)	
MAC	18,9	a
MAS	12,0	b
MAL	8,4	c
MAG	6,3	d

DMS a 5% = 2,1

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%.

TABELA 20 Comparação das médias de produção de GA pelo teste de Tukey, da linhagem *hgp147* nos meios de fermentação com farinha integral de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) como fonte de carbono.

Meio de Cultivo	Média de Produção (U/ml)	
MAC	17,9	a
MAS	11,9	b
MAL	8,2	c
MAG	5,4	c

DMS a 5% = 3,2

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%.

4.3. ANÁLISE GENÉTICA DO MUTANTE *lgp73*

4.3.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO DIPLÓIDE

lgp73//SM-13 par. E SEGREGANTES.

Foi obtido diplóide entre o mutante *lgp73* e a linhagem SM-13 par. via ciclo parassexual, como descrito no item 3.7.1., com o objetivo de se mapear a mutação que ocasiona redução da produção, em relação aos grupos de ligação III e IV (MASIERO e BONATELLI JR, 1989). Após caracterização, conforme proposto no item 3.7.2., tendo sido confirmado se tratar de um diplóide, foram obtidos 60 segregantes (item 3.8.1.), apresentados na TABELA 21 e caracterizados conforme item 3.8.2. A média de produção de GA das linhagens parentais neste experimento foi de 0,01 U/ml para a *lgp73* e 0,24 U/ml para a SM-13 par. (dados completos TABELA A21, Apêndice de Tabelas).

4.3.2. MAPEAMENTO

O alelo mutante *lysA*⁻, presente na linhagem testadora SM-13 par. (item 3.1.), causa diminuição na produção de GA a níveis ao redor de 0 a 0,5 U/ml (MASIERO e BONATELLI JR, 1989). A mutação, induzida na linhagem *lgp73*, também acarreta níveis igualmente baixos de produção e ainda não crescimento em amido como fonte de carbono (TABELA 1). Segregantes com produção normal são esperados em cruzamentos com dois genes que reduzem a produção se não houver ligação entre eles, e a possibilidade é praticamente nula se houver ligação. As possíveis combinações genotípicas resultantes do cruzamento citado acima estão descritas na TABELA 22 e os resultados obtidos, agrupados em classes quanto à produção de GA, o genótipo em relação ao gene *lysA* e crescimento ou não em meio com amido como fonte de carbono, estão apresentados na TABELA 23.

TABELA 21 Marcas auxotróficas, morfológicas e produção de GA (U/ml) dos segregantes do diplóide *lgp73//SM-13* par.

SEGREGANTES	<i>pabA</i>	<i>nicA</i>	<i>lysA</i>	<i>metA</i>	MM+A	<i>lgpB</i> **	cor	GA
SM-1	-	+	+	-	-	-	<i>fun</i>	0,78
SM-2	+	+	+	-	-	+	<i>fun</i>	0,44
SM-3	-	+	+	-	-	-	<i>fun</i>	0,15
SM-4	+	+	+	+	-	+	<i>fun</i>	1,01
SM-5	+	+	+	-	-	+	<i>fun</i>	0,22
SM-6	+	+	+	+	+	-	<i>fun</i>	0,84
SM-7	-	+	+	+	-	-	<i>fun</i>	0,19
SM-8	+	+	+	-	+	-	<i>fun</i>	0,69
SM-9	+	+	+	-	-	+	<i>fun</i>	0,22
SM-10	+	+	+	+	-	+	<i>fun</i>	0,67
SM-11	+	+	-	-	+	*	<i>fun</i>	0,24
SM-12	-	+	+	+	-	-	<i>fun</i>	0,15
SM-13	+	+	+	+	+	-	<i>fun</i>	6,81
SM-14	+	+	+	+	+	+	<i>fun</i>	13,32
SM-15	+	+	+	-	-	+	<i>fun</i>	0,67
SM-16	+	+	+	+	-	-	<i>fun</i>	0,25
SM-17	+	+	+	-	-	+	<i>fun</i>	0,18
SM-18	+	+	+	-	-	+	<i>fun</i>	0,30
SM-19	-	+	+	+	-	-	<i>fun</i>	0,18
SM-20	+	+	-	+	+	*	<i>fun</i>	0,04
SM-21	+	+	+	+	-	+	<i>fun</i>	0,87
SM-22	+	+	+	+	+	-	<i>fun</i>	6,63
SM-23	-	+	+	+	+	+	<i>fun</i>	11,00
SM-24	+	+	+	+	+	-	<i>fun</i>	3,23
SM-25	+	+	-	-	-	*	<i>fun</i>	0,03
SM-26	-	+	+	+	+	+	<i>fun</i>	15,70
SM-27	+	+	-	+	+	*	<i>fun</i>	0,06
SM-28	-	+	-	+	-	*	<i>fun</i>	0,01
SM-29	-	+	+	+	+	-	<i>fun</i>	2,23
SM-30	-	+	+	-	-	-	<i>fun</i>	0,14
SV-31	+	-	+	+	+	+	<i>olv</i>	7,73
SV-32	+	-	+	+	+	+	<i>olv</i>	10,83
SV-33	-	-	+	-	-	-	<i>olv</i>	3,43
SV-34	-	-	+	+	-	-	<i>olv</i>	0,92
SV-35	-	-	+	-	-	-	<i>olv</i>	0,69
SV-36	-	-	+	-	+	-	<i>olv</i>	2,13
SV-37	-	-	+	-	+	-	<i>olv</i>	0,62
SV-38	+	-	-	-	+	*	<i>olv</i>	0,05
SV-39	+	-	+	+	-	+	<i>olv</i>	0,50
SV-40	+	-	+	-	-	+	<i>olv</i>	1,21
SV-41	-	-	-	+	-	*	<i>olv</i>	0,01
SV-42	+	-	+	-	-	-	<i>olv</i>	0,17
SV-43	+	-	+	+	+	+	<i>olv</i>	12,14

SEGREGANTES	<i>pabA</i>	<i>nicA</i>	<i>lysA</i>	<i>metA</i>	MM+A	<i>lgpB</i> **	cor	GA
SV-44	-	-	-	+	-	*	<i>olv</i>	0,21
SV-45	+	-	-	+	+	*	<i>olv</i>	0,25
SV-46	+	-	-	-	-	*	<i>olv</i>	0,18
SV-47	+	-	+	+	+	+	<i>olv</i>	10,50
SV-48	-	-	-	-	+	*	<i>olv</i>	0,03
SV-49	-	-	+	+	-	-	<i>olv</i>	0,68
SV-50	-	-	-	-	+	*	<i>olv</i>	0,00
SV-51	-	-	-	-	+	*	<i>olv</i>	0,05
SV-52	+	-	+	-	-	+	<i>olv</i>	0,28
SV-53	+	-	+	+	-	-	<i>olv</i>	0,35
SV-54	-	-	+	+	+	-	<i>olv</i>	3,08
SV-55	+	-	+	+	-	+	<i>olv</i>	0,51
SV-56	-	-	+	-	-	-	<i>olv</i>	0,12
SV-57	+	-	+	+	+	-	<i>olv</i>	3,49
SV-58	+	-	+	+	+	+	<i>olv</i>	9,72
SV-59	+	-	+	+	-	+	<i>olv</i>	0,66
SV-60	-	-	-	-	+	*	<i>olv</i>	0,00
<i>lgp73</i>	-	-	+	+	-	-	<i>olv</i>	0,01
SM-13 par.	+	+	-	-	+	+	<i>fun</i>	0,24

Os sinais + e - indicam respectivamente prototrofia e auxotrofia para as marcas ensaiadas, crescimento e não crescimento em MM+A e presença ou não do gene *lgpB* mutado.

* a diminuição de produção de GA, devido ao efeito do alelo *lysA*⁻ impossibilita a identificação dos segregantes *lgpB*⁺ e *lgpB*⁻ entre os segregantes deficientes em lisina.

** presença ou ausência do alelo mutante *lgpB* foi deduzida a partir de dados obtidos ao longo desse trabalho (TABELA A24), sendo aqui apresentados por uma questão de facilidade.

As médias de produção de GA dos parentais *lgp73* e SM-13 par. foram obtidas a partir de 15 repetições (dados completos TABELA A21, Apêndice de Tabelas).

TABELA 22 Resultados esperados para crescimento em amido como fonte de carbono e produção de GA das possíveis combinações genotípicas dos segregantes do diplóide *lgp73//SM-13* par.

NÃO LIGAÇÃO	PRODUÇÃO DE GA	CRESCIMENTO EM AMIDO
(A) <i>lysA</i> ⁺ <i>lgpB</i> ⁻	baixa	-
(B) <i>lysA</i> ⁺ <i>lgpB</i> ⁺	normal	+
(C) <i>lysA</i> ⁻ <i>lgpB</i> ⁻	baixa	-
(D) <i>lysA</i> ⁻ <i>lgpB</i> ⁺	baixa	+

LIGAÇÃO	PRODUÇÃO DE GA	CRESCIMENTO EM AMIDO
(A) <i>lysA</i> ⁺ <i>lgpB</i> ⁻	baixa	-
(D) <i>lysA</i> ⁻ <i>lgbB</i> ⁺	baixa	+

TABELA 23 Crescimento em amido como fonte de carbono, produção de GA (U/ml), genótipos em relação ao gene *lysA* e número de segregantes obtidos do diplóide *lgp73//SM-13* par. para cada classe.

NÚMERO DE SEGREGANTES	PRODUÇÃO DE GA	CRESCIMENTO EM AMIDO
(a) <i>lysA</i> ⁺ 28	0,1 a 3,4	-
(b) <i>lysA</i> ⁺ 18	0,6 a 15,7	+
(c) <i>lysA</i> ⁻ 5	0,0 a 0,2	-
(d) <i>lysA</i> ⁻ 9	0,0 a 0,2	+

Os tipos de segregantes obtidos nas classes (a), (c) e (d) (TABELA 23) podem ser explicados pelos genótipos apresentados respectivamente em (A), (C) e (D) (TABELA 22), mas o tipo (b) não pode ser explicado pelo genótipo sugerido em (B), pois inclui 10 segregantes com produção abaixo de 6,8 U/ml, apesar de crescerem em MM+A. Este resultado chamou bastante atenção pois, no mutante *lgp73*, a diminuição na produção de GA sempre foi considerada combinada com ausência de crescimento em amido. Este fato sugeriu que as características de não crescimento em amido e baixa produção fossem resultado de mutações em genes diferentes, localizados em diferentes grupos de ligação e que segregaram nos setores haplóides obtidos. Se esta suposição for considerada, novas combinações gênicas serão possíveis e a classe (b) observada poderá ser explicada.

Para se verificar a possibilidade da hipótese de 2 genes alterando a produção de GA na linhagem *lgp73*, primeiramente uma amostra dos segregantes tipo (b) foi retestada para produção de GA (cinco repetições por segregante) e os resultados estão na TABELA 24. Pode-se verificar que estes resultados são reproduzíveis e que esta redução na produção não parece ser resultado da combinação de alelos mutantes para auxotrofia e/ou morfologia, pois tanto segregantes com o genótipo *funA⁻*, quanto segregantes *olvA⁻ nicA⁻ pabA⁻ metA⁻* foram encontrados e não diferem significativamente a nível de 5% (TABELAS A22 e A23, Apêndice de Tabelas).

Na TABELA 25 podem-se observar os genótipos, fenótipos e o número de segregantes esperados e obtidos, quando se consideram três genes afetando a produção de GA no cruzamento entre a linhagem SM-13 par e o mutante *lgp73*. O terceiro gene que afeta a produção foi chamado provisoriamente de *snuA* (starch non utilization) e posteriormente de *ssu* (slow starch utilization; item 4.5). Os desvios no número de segregantes obtidos nas três últimas classes deve ser devido à baixa recuperação de segregantes com o alelo *lysA⁻*, fato este já observado anteriormente (MASIERO, 1988).

Na tentativa de se distinguir entre os possíveis segregantes *lysA⁺ snuA⁻ lgpB⁻* (segregante tipo I) e *lysA⁺ snuA⁻ lgpB⁺* (segregante tipo II), esses foram ensaiados em meio de fermentação com maltose como fonte de carbono (item 3.2.5.) para se verificar a produção de GA (item 3.6.). O esperado era que os segregantes com o genótipo *lysA⁺ snuA⁻ lgpB⁺* produzissem níveis de enzima mais elevados que os *lysA⁺ snuA⁻ lgpB⁻*, já que não teriam os efeitos da mutação no gene *lgpB* e os efeitos da mutação *snuA* poderiam ser superados devido ao crescimento em maltose. Esta estratégia poderia também mostrar alguma diferença entre efeitos dos genes *snuA* e *lgpB* e com isso reforçar a hipótese da existência de dois genes mutados na linhagem *lgp73*. Os resultados obtidos estão na FIGURA 1 e pode-se verificar que os segregantes se dividem em dois grupos, com produção de GA de 0 a 1 U/ml (segregantes tipo I) e 1,5 a 3,5 U/ml (segregantes tipo II) (dados completos, TABELA A24, Apêndice de Tabelas).

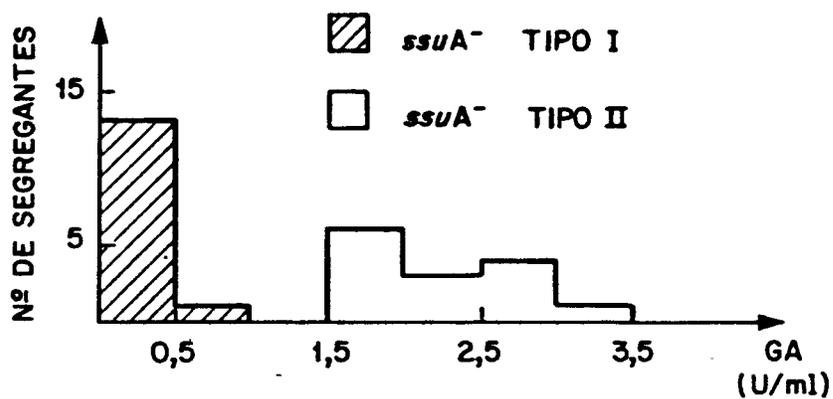
TABELA 24 Genótipo, auxotrofia, coloração de conídios e produção de GA (U/ml) em MAC de alguns segregantes *lysA*⁺ que crescem em amido como fonte de carbono (diplóide *lgp73*//SM-13par.) comparados com as parentais referência de produção normal (*pab1 fun1* e *nic1 olv3*) e as parentais do cruzamento.

LINHAGENS	REPETIÇÕES					MÉDIA DE PRODUÇÃO	GENÓTIPO
<i>pab1 fun1</i>	14,1	14,1	13,4	14,5	13,4	13,9	<i>pabA</i> ₁ ; <i>funA</i> ₁
<i>nic1 olv3</i>	7,0	4,6	7,7	7,2	7,5	6,8	<i>nicA</i> ₁ ; <i>olvA</i> ₃
<i>lgp73</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<i>nicA</i> ₁ ; <i>olvA</i> ₃ ; <i>pabA</i> ₁ ; <i>lgpB</i> ₇₃
SM-13 par.	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	<i>funA</i> ₁ ; <i>metA</i> ₁ ; <i>lysA</i> ₁
SM-6	1,6	2,6	3,0	2,2	1,5	2,2	<i>funA</i> ₁
SM-8	4,0	2,1	1,9	2,5	2,1	2,5	<i>funA</i> ₁ ; <i>metA</i> ₁
SM-13	2,0	3,1	4,2	3,2	2,4	3,0	<i>funA</i> ₁
SM-22	3,5	2,2	3,4	2,9	0,7	2,5	<i>funA</i> ₁
SM-24	6,2	4,0	2,7	5,7	4,0	4,5	<i>funA</i> ₁
SM-29	2,6	0,6	2,6	2,5	1,5	2,0	<i>funA</i> ₁ ; <i>pabA</i> ₁
SV-36	3,6	3,1	2,1	2,9	3,2	3,0	<i>olvA</i> ₃ ; <i>pabA</i> ₁ ; <i>nicA</i> ₁ ; <i>metA</i> ₁
SV-37	1,8	3,1	3,3	3,5	3,1	2,9	<i>olvA</i> ₃ ; <i>pabA</i> ₁ ; <i>nicA</i> ₁ ; <i>metA</i> ₁
SV-54	4,5	3,8	3,9	3,6	3,6	3,9	<i>olvA</i> ₃ ; <i>pabA</i> ₁ ; <i>nicA</i> ₁
SV-57	4,4	4,4	4,5	3,8	3,1	4,0	<i>olvA</i> ₃ ; <i>nicA</i> ₁

TABELA 25 Possíveis genótipos, fenótipos e número de segregantes esperados e obtidos, considerando-se a presença de três genes afetando a produção de GA no cruzamento entre as linhagens *lgp73* e SM-13 par.

GENÓTIPOS			FENÓTIPOS		Nº DE SEGREGANTES	
<i>ssuA</i>	<i>lgpB</i>	<i>lysA</i>	Produção de GA(U/ml)	Crescimento em amido	esperados	obtidos
+	+	+	7,7 a 15,7	+	7,5	8
+	-	+	1 a 6,8	+	7,5	10
+	+	-	0 a 0,2	+	15	9
+	-	-				
-	+	-	0 a 0,2	-	15	5
-	-	-				
-	-	+	0 a 3,4	-	15	28
-	+	+				

FIGURA 1 Distribuição em classes de produção de GA dos segregantes *ssuA*⁻ (*snuA*⁻) obtidos a partir do diplóide *lgp73//SM-13* par., cultivados em meio de fermentação com maltose como fonte de carbono



Para se verificar se estes dois tipos de segregantes tinham realmente genótipos distintos, foram obtidos diplóides entre alguns destes segregantes e outros segregantes com marcas auxotróficas compatíveis e genótipo *lysA⁺ snuA⁺ lgpB⁻*. Foi determinada a produção de GA em meio com maltose como fonte de carbono e os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 26. Pode-se constatar que, tanto os segregantes tipo I (SM-1; SM-3; SM-30), quanto os diplóides do tipo I (SM-1//SV-57; SM-3//SV-57; SM30//SV-57) diferem significativamente a nível de 1% dos segregantes do tipo II (SM-5; SV-40) e diplóides do tipo II (SM-5//SV-54; SM-17//SV-54; SV-40//SM-29) (TABELA A25 resultados completos; TABELA A26 análise de variância, Apêndice de Tabelas).

Os níveis de produção das linhagens parentais e diplóide parental (controle selvagem para os genes *snuA* e *lgpB*) foram baixos devido, provavelmente, à menor indução da produção de GA pela maltose (TABELA 26). Assim, os níveis de produção atingidos pelos diplóides do tipo II estão plenamente de acordo com o esperado para um diplóide heterozigoto para o gene *lgpB*.

Com os dados da Tabela 21, foi feita a análise mitótica (TABELA 27), que mostra que os genes *lgpB* e *snuA* não pertencem ao mesmo grupo de ligação dos genes *lysA₁* (grupo de ligação III) e *metA₁* (grupo de ligação IV) (MASIERO e BONATELLI JR, 1989).

Confirmou-se que o alelo *lgpB* é recessivo em relação ao alelo selvagem (dados não mostrados)(VALENT, 1985). Quanto ao gene *snuA*, o diplóide *lgp73//SM-13* par. foi testado para crescimento em amido como fonte de carbono e pôde-se verificar que há um pequeno atraso no crescimento em relação aos parentais selvagens (dados não mostrados).

TABELA 26 Genótipos prováveis e produção de GA (U/ml) em maltose como fonte de carbono dos parentais, segregantes do tipo I* e II** e diplóides obtidos entre estes segregantes e segregantes *ssuA*⁺ *lgbB*⁻ (*ssuA*⁺ *lgbB*⁻)

LINHAGEM	GENÓTIPO		PRODUÇÃO DE GA (U/ml)	TESTE DE TUKEY		
	<i>ssuA</i>	<i>lgbB</i>				
<i>pab1 fum1</i>	+	+	2,9	a		
SM-17//SV-54	-//+	+//-	2,2	a	b	
SM-5//SV-54	-//+	+//-	2,1		b	
SV-40//SM-29	-//+	+//-	2,1		b	
<i>nic1 olv3</i>	+	+	2,1		b	
dipl. parent.	+//+	+//+	2,0		b	
SM-5**	-	+	1,7	b	c	
SV-40**	-	+	1,5	b	c	
SM-17**	-	+	1,2		c	d
SV-57	+	-	1,1		c	d
SM-29	+	-	1,1		c	d
SV-54	+	-	1,0		c	d
SM-3//SV-57	-//-	+//-	0,6			d e
SM-30//SV-57	-//-	+//-	0,6			d e
SM-1//SV-57	-//-	+//-	0,5			d e
SM-13 par.	+	+	0,2			e
SM-1*	-	-	0,1			e
<i>lgb73</i>	-	-	0,0			e
SM-3*	-	-	0,0			e
SM-30*	-	-	0,0			e

dipl. parent. corresponde ao diplóide controle obtido entre as linhagens parentais selvagens *pab1 fum1* e *nic1 olv3*.

DMS a 1% = 0,8

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 1%.

Dados completos e análise de variância pelo teste de F dos dados acima estão apresentados nas Tabelas A25 e A26, respectivamente, no Apêndice de Tabelas.

TABELA 27 Análise mitótica do diplóide *lgp73*//SM-13 par.

GENÓTIPOS PARENTAIS:

lgp73: *fwnA*⁺ *olvA*⁻ *pabA*⁻ *nicA*⁻ *lysA*⁺ *metA*⁺
 SM-13 par.: *fwnA*⁻ *olvA*⁺ *pabA*⁺ *nicA*⁺ *lysA*⁻ *metA*⁻

	<i>lysA</i> ⁺	<i>lysA</i> ⁻		<i>metA</i> ⁺	<i>metA</i> ⁻
<i>ssuA</i> ⁺	18	9	<i>ssuA</i> ⁺	18	9
<i>ssuA</i> ⁻	28	5	<i>ssuA</i> ⁻	16	17

	<i>lysA</i> ⁺	<i>lysA</i> ⁻		<i>metA</i> ⁺	<i>metA</i> ⁻
<i>lgpB</i> ⁺	22		<i>lgpB</i> ⁺	14	8
		14			
<i>lgpB</i> ⁻	24		<i>lgpB</i> ⁻	14	10

4.4. ANÁLISE GENÉTICA DO MUTANTE *lgp05*

4.4.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO DIPLÓIDE

lgp05//SV10 par. E SEGREGANTES.

Foi obtido diplóide entre o mutante *lgp05* e a linhagem SV-10 par. via ciclo parassexual, como descrito no item 3.7.1., com o objetivo de se mapear a mutação, ou mutações que acarretam redução da produção e atraso de 3 dias no crescimento em amido como fonte de carbono, em relação aos grupos de ligação I, II (VALENT, 1985), III e IV (MASIERO e BONATELLI JR, 1989). Após caracterização conforme o proposto no item 3.7.2., tendo sido confirmado se tratar de um diplóide, foram obtidos 73 segregantes (item 3.8.1.) apresentados na TABELA 28 e caracterizados conforme item 3.8.2. A média de produção de GA das linhagens parentais, neste experimento, foi de 3,0 U/ml para a linhagem *lgp05*, e 0,1 U/ml para a SV-10 par. (dados completos TABELA A27, Apêndice de Tabelas).

4.4.2. MAPEAMENTO

Dentre os segregantes obtidos, foram observados 24 com genótipo *lysA*⁻ e com produção de GA e crescimento em amido similares à linhagem SV-10 par.; 48 *lysA*⁺, com produção e crescimento similares à linhagem *lgp05*; e 1 segregante *lysA*⁺ com produção no nível da linhagem SV-10 par. e crescimento semelhante a outra parental (TABELA 28). Dos 73 segregantes analisados, 72 apresentaram combinação parental, indicando que a mutação ou mutações presentes na linhagem *lgp05* e o gene *lysA*₁ pertencem ao mesmo grupo de ligação (grupo III, MASIERO e BONATELLI, 1989).

Outra evidência de que estes genes estão ligados foi a obtenção de um diplóide homozigoto para o gene *lysA*⁺, com as características mutantes de produção e crescimento em amido. A FOTO 1 mostra o crescimento das linhagens parentais *pab1 fum1* e *nic1 olv3*, do mutante *lgp05*, do diplóide homozigoto, dos diplóides heterozigotos e do diplóide heterozigoto selvagem, após 36 horas de crescimento em MM+A. Pode-se observar que o diplóide homozigoto e o mutante *lgp05* não apresentam crescimento em comparação com as demais linhagens.

TABELA 28 Marcas auxotróficas, morfológicas e produção de GA (U/ml) dos segregantes do diplóide *lpp05//SV-10* par.

SEGREGANTES	<i>pabA</i>	<i>nicA</i>	<i>lysA</i>	<i>metA</i>	MM+A	cor	GA
SM-1	+	+	-	-	+	<i>fwn</i>	0,3
SM-2	+	+	-	-	+	<i>fwn</i>	0,3
SM-3	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	2,5
SM-4	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	2,7
SM-5	-	+	+	+	-	<i>fwn</i>	2,4
SM-6	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	2,8
SM-7	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	2,7
SM-8	+	+	+	-	-	<i>fwn</i>	3,5
SM-9	+	+	-	-	+	<i>fwn</i>	0,2
SM-10	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	2,7
SM-11	+	+	+	-	-	<i>fwn</i>	2,5
SM-12	+	+	+	-	-	<i>fwn</i>	2,4
SM-13	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	3,8
SM-14	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	2,8
SM-15	+	+	-	+	+	<i>fwn</i>	0,2
SM-16	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	2,7
SM-17	+	+	-	+	+	<i>fwn</i>	0,2
SM-18	+	+	+	-	-	<i>fwn</i>	3,1
SM-19	+	+	+	-	-	<i>fwn</i>	2,3
SM-20	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	2,6
SM-21	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	2,7
SM-22	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	2,3
SM-23	-	+	+	-	-	<i>fwn</i>	1,8
SM-24	+	+	-	-	+	<i>fwn</i>	0,2
SM-25	+	+	-	+	+	<i>fwn</i>	0,3
SM-26	-	+	+	-	-	<i>fwn</i>	3,1
SM-27	-	+	-	-	+	<i>fwn</i>	0,3
SM-28	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	3,0
SM-29	+	+	-	+	+	<i>fwn</i>	0,2
SM-30	+	+	-	-	+	<i>fwn</i>	0,2
SM-31	+	+	-	-	+	<i>fwn</i>	0,2
SM-32	+	+	-	-	+	<i>fwn</i>	0,2
SM-33	-	+	+	-	-	<i>fwn</i>	3,3
SM-34	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	2,7
SM-35	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	1,9
SM-36	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	2,9
SM-37	-	+	+	+	-	<i>fwn</i>	3,3
SM-38	+	+	-	-	+	<i>fwn</i>	0,3
SM-39	+	+	+	+	-	<i>fwn</i>	3,2
SM-40	-	+	+	+	-	<i>fwn</i>	3,3

continuação da Tabela 28.

SEGREGANTES	<i>pabA</i>	<i>nicA</i>	<i>lysA</i>	<i>metA</i>	MM+A	cor	GA
SM-41	+	+	-	+	+	<i>fun</i>	0,3
SM-42	+	+	+	+	-	<i>fun</i>	2,6
SM-43	-	+	+	+	-	<i>fun</i>	2,6
SM-44	+	+	-	+	+	<i>fun</i>	0,3
SM-45	+	+	-	+	+	<i>fun</i>	0,3
SM-46	-	+	+	+	-	<i>fun</i>	2,8
SM-47	+	+	-	-	+	<i>fun</i>	0,3
SM-48	+	+	+	-	-	<i>fun</i>	2,9
SM-49	+	+	+	-	-	<i>fun</i>	2,1
SM-50	+	+	+	+	-	<i>fun</i>	3,3
SM-51	+	+	+	+	-	<i>fun</i>	2,7
SM-52	+	+	-	-	+	<i>fun</i>	0,3
SM-53	-	+	+	+	-	<i>fun</i>	2,5
SM-54	+	+	+	+	-	<i>fun</i>	0,1
SM-55	+	+	+	+	-	<i>fun</i>	2,9
SM-56	-	+	+	+	-	<i>fun</i>	3,0
SM-57	-	+	+	+	-	<i>fun</i>	2,8
SM-58	-	+	-	-	+	<i>fun</i>	0,3
SM-59	-	+	+	+	-	<i>fun</i>	2,7
SM-60	+	+	-	+	+	<i>fun</i>	0,2
SM-61	+	+	-	-	+	<i>fun</i>	0,2
SM-62	+	+	+	+	-	<i>fun</i>	2,7
SV-63	+	-	+	-	-	<i>olv</i>	1,6
SV-64	+	-	+	+	-	<i>olv</i>	2,2
SV-65	-	-	+	-	-	<i>olv</i>	3,3
SV-66	+	-	+	-	-	<i>olv</i>	2,7
SV-67	+	-	-	-	+	<i>olv</i>	0,1
SV-68	-	-	+	+	-	<i>olv</i>	1,9
SV-69	+	-	-	-	+	<i>olv</i>	0,1
SV-70	-	-	+	+	-	<i>olv</i>	2,3
SV-71	+	-	+	+	-	<i>olv</i>	2,4
SV-72	-	-	+	-	-	<i>olv</i>	4,1
SV-73	+	-	-	-	+	<i>olv</i>	0,2
<i>lgp05</i>	-	-	+	+	-	<i>olv</i>	3,0
SV-10 par.	+	+	-	-	+	<i>fun</i>	0,1

Os sinais + e - indicam respectivamente prototrofia e auxotrofia para as marcas ensaiadas, crescimento e não crescimento em MM+A.

As médias de produção de GA dos parentais *lgp05* e SV-10 par. foram obtidas a partir de 10 repetições (dados completos TABELA A27, Apêndice de Tabelas).

A TABELA 29 mostra a produção de GA e o crescimento em amido das linhagens parentais selvagens, dos diplóides homozigoto e heterozigoto e dos parentais *lgp05* e SV-10 par., juntamente com a comparação de médias de produção pelo teste de Tukey (dados completos, TABELA A28; análise de variância, TABELA A29, Apêndice de Tabelas). Os resultados sugerem que a mutação ou mutações presentes na linhagem *lgp05* são recessivas em relação ao alelo selvagem, pois o diplóide heterozigoto não diferiu significativamente a nível de 1% das linhagens *pab1 fum1* e *nic1 olv3* e a produção do diplóide homozigoto não diferiu significativamente da produção da linhagem *lgp05*. Os resultados de crescimento em amido como fonte de carbono confirmaram os resultados de produção.

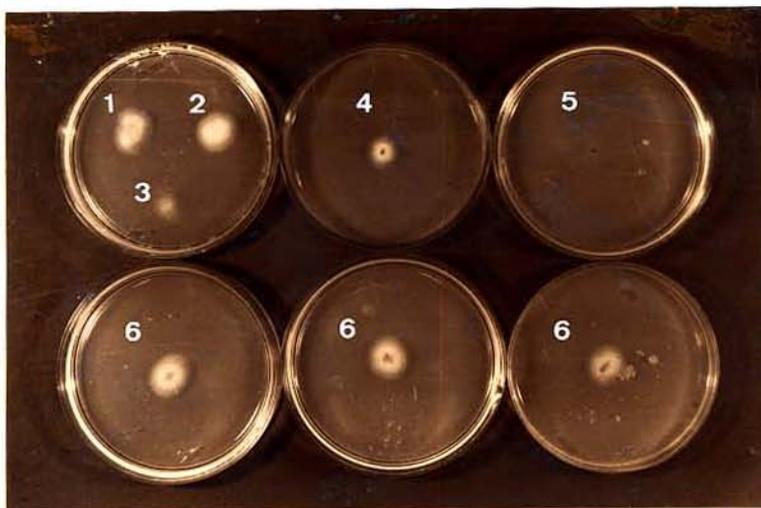
TABELA 29 Comparação das médias de produção de GA (U/ml) pelo teste de Tukey e crescimento em amido como fonte de carbono dos diplóides homozigoto* e heterozigoto** para o alelo *lysA*⁺ e alelo ou alelos mutados na linhagem *lgp05*, em relação aos parentais selvagens e parentais envolvidos no cruzamento.

Linhagens	Média de Produção (U/ml)	Crescimento em amido
<i>pab1 fum1</i>	12,5 a	+
<i>lgp05</i> //SV-10** par.	9,7 a b	+
<i>nic1 olv3</i>	7,9 b	+
<i>lgp05</i> //SV-10* par.	4,6 c	-
<i>lgp05</i>	1,8 c	d -
SV-10 par.	0,3	d +

DMS a 1% = 3,1

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 1%

FOTO 1 Comparação de crescimento de colônias das linhagens parentais, diplóide controle* e diplóides homozigoto** e heterozigoto***, para o gene *lysA*⁺ e alelo(s) mutado(s) na linhagem *lgp05* em MM+A.



- 1- *pab1 fum1*
- 2- *nic1 olv3*
- 3- *lgp05*
- 4- *pab1 fum1*//*nic1 olv3**
- 5- *lgp05*//SV-10par.**
- 6- *lgp05*//SV-10par.***

4.5. CRESCIMENTO EM AMIDO COMO FONTE DE CARBONO

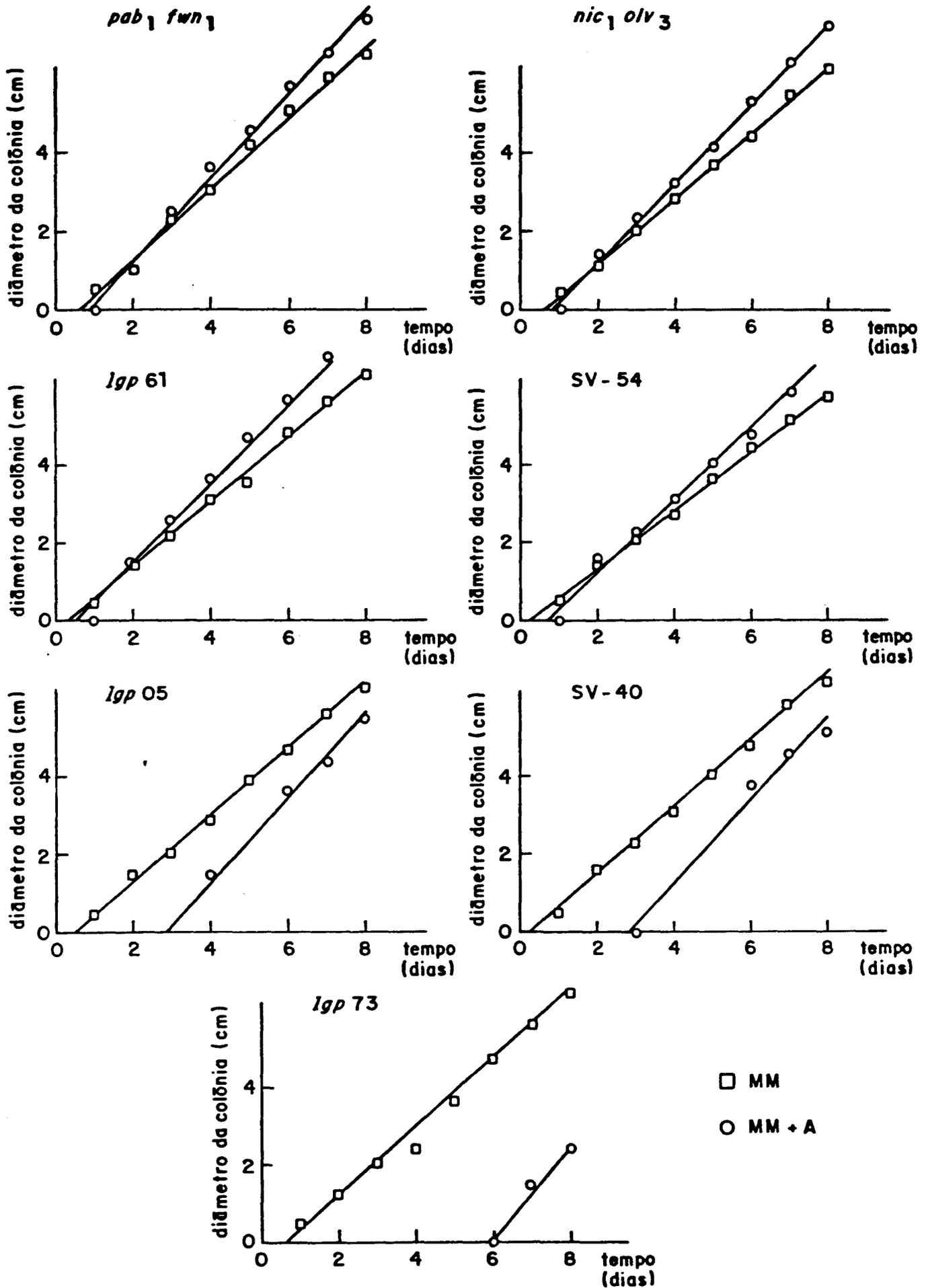
Os parentais selvagens *pab1 fum1* e *nic1 olv3*, os mutantes *lgp05*, *lgp73* e *lgp61* e os segregantes do diplóide *lgp73//SM-13par.*, SV-40 (genótipo *snuA⁻ lgpB⁺*) e SV-54 (genótipo *snuA⁺ lgpB⁻*), foram inoculados em placas de Petri com MM (item 3.2.1.) e MM+A (item 3.2.2.), com o objetivo de se comparar o crescimento das linhagens selvagens com os mutantes afetados para crescimento em amido por um período maior que o observado anteriormente (3 a 4 dias). Foi inoculada uma placa por linhagem com três repetições por placa e as medidas de diâmetro das colônias foram feitas diariamente, até 8 dias de crescimento (TABELA A30, Apêndice de Tabelas).

A FIGURA 2 mostra as retas obtidas a partir dos resultados apresentados na TABELA A30 (Apêndice de Tabelas). Observou-se que todas as linhagens têm um padrão de crescimento semelhante em MM e que aquelas que não têm mutação afetando crescimento em amido, apresentaram padrões em MM+A semelhantes entre si (linhagens *pab1 fum1*; *nic1 olv3*; *lgp61*; SV-54). Os mutantes *lgp05*; *lgp73* e o segregante SV-40 apresentaram crescimento atrasado em MM+A em relação às demais linhagens.

A mutação ou mutações presentes na linhagem *lgp05* e a mutação *snuA⁻* (SV-40) causam padrão similar de atraso no crescimento em MM+A (3 dias), apesar de possuírem diferentes genes mutados e diferentes padrões de produção de GA. Comparando o mutante *lgp73*, e os segregantes SV-40 e SV-54, verifica-se que a mutação *lgpB* (SV-54) realmente não afeta o crescimento como a mutação *snuA* (SV-40), no entanto, a combinação destas mutações (*lgp73*) é muito mais drástica. O crescimento, uma vez iniciado, obedece a um padrão similar ao encontrado nas demais linhagens.

A mutação *snuA* foi denominada *ssuA* (slow starch utilization), pois não impede o crescimento, como inicialmente pensado, mas acarreta atraso no mesmo e redução de produção de GA nas condições estudadas.

FIGURA 2 Crescimento em meio com glicose (MM) ou amido (MM+A) como única fonte de carbono.



5. DISCUSSÃO

5.1. CRESCIMENTO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Não foram observadas diferenças marcantes de crescimento entre as linhagens parentais e os mutantes *lgp* e *hgp* em meio de cultivo com glicose, maltose, sacarose, xilose, sorbitol, lactose e galactose como fonte de carbono (TABELA 1), indicando que as linhagens mutantes de baixa e de alta produção de glicoamilase possuem as mesmas características das linhagens parentais em relação a este aspecto.

O estudo do crescimento de mutantes em diferentes fontes de carbono foi realizado com o intuito de se obter informações sobre a existência de alterações na assimilação de outras fontes de carbono, o que indicaria que os genes afetados nestes mutantes teriam efeito geral. A ausência de diferenças, a não ser quando amido foi usado, sugeriu a especificidade destas mutações para o sistema amilolítico. Estudos posteriores de caracterização devem ser conduzidos em relação as quantidades de enzima intra e extracelular e de mRNA específico da glicoamilase para se saber se as alterações nos mutantes são a nível de secreção e/ou de indução.

Em meio com amido como única fonte de carbono, houve diferenças entre as linhagens em relação ao período necessário para dar início ao crescimento. As linhagens parentais selvagens *pab1 fum1* e *nic1 olv3* tiveram um atraso de 1 dia para iniciar o crescimento neste meio de cultivo, em comparação com meio com glicose (TABELA A30, Apêndice de Tabelas). Este fato pode ser devido à necessidade de indução do sistema de enzimas extracelulares que metabolizam o amido. No mutante *lgp05* e no segregante SV-40, essa indução levou 3 dias e no mutante *lgp73* levou 6 dias (FIGURA 2). Esses resultados podem indicar que a indução do sistema de degradação do amido foi alterada nesses mutantes.

Se a α -amilase for a enzima responsável pela degradação inicial do amido para que moléculas menores sejam geradas e entrem na célula, desencadeando a indução do sistema enzimático, como sugerido por BARTON e col. (1972) e FOWLER e col. (1990), então os mutantes ou segregantes de baixa produção de glicoamilase que têm atraso no crescimento em amido como única fonte de carbono, devem possuir alterações em genes relacionados com a produção e/ou secreção de α -amilase. Esta hipótese poderia ser estudada através da análise da produção de α -amilase de linhagens mutantes e selvagens. Inicialmente, poderiam ser feitos testes qualitativos em meio sólido com amido PAT e Dextran T-10 (Pharmacia Diagnostics, Upsala, Sweden). O amido PAT é um tipo de polímero de glicose, resistente à ação exo-hidrolítica da glicoamilase (MARCINIAK e KULA, 1982), ligado a um corante azul. Este produto foi usado, com bons resultados,

por STEYN e PRETORIUS (1991) para diferenciar a atividade amilolítica da glicoamilase de levedura, da atividade amilolítica de α -amilase bacteriana, quando os autores promoveram a introdução de ambos os genes no genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Em contrapartida, Dextran T-10 é um produto composto por dextrana, sendo hidrolizado apenas por glicoamilase (KUEK e KIDBY, 1984).

É possível que o uso destes compostos como única fonte de carbono no meio de cultivo possa evidenciar a presença de cada uma das enzimas, nos diferentes mutantes aqui estudados, em comparação com as linhagens parentais selvagens. Se α -amilase realmente possuir papel inicial na indução do sistema amilolítico, os genes envolvidos com sua produção ou secreção poderão ter efeito epistático sobre os genes envolvidos com a produção e secreção de glicoamilase, pois a indução desta dependerá da ação inicial da α -amilase. YABUKI e col. (1977) sugeriram que a indução de α -amilase em *Aspergillus oryzae* obedece a um mecanismo de dois estágios. Inicialmente, uma permease constitutiva permite a entrada de pequenas quantidades de indutor, que induz a síntese de grandes quantidades de permease, que então permite a entrada de grandes quantidades daquela substância para a indução da α -amilase. No trabalho de YABUKI e col. (1977) foi utilizada maltose como indutor, contudo, quando amido é usado, níveis constitutivos de uma enzima como a α -amilase, por exemplo, seriam necessários para produzir os níveis iniciais do indutor. Outra maneira, mais direta da elucidação do papel da α -amilase na indução do sistema amilolítico em *A. niger* poderia ser feita como descrito por EL-GOGARY e col. (1989) para a celobiohidrolase, que dispara a indução do sistema de enzimas celulolíticas em *Trichoderma reesei* e que foi baseado na inativação da enzima constitutiva com anticorpos específicos e análise do mRNA específico por "Southern blotting".

A estreita relação entre glicoamilase e α -amilase é bem conhecida. Sabe-se que a ação conjunta destas enzimas tem um efeito sinérgico (MONTENECOURT e EVELEIGH, 1985), aumentando ao redor de 3 vezes a soma da ação de cada enzima individualmente sobre o amido (UEDA e SAHA, 1981). A α -amilase atua como endoglucanase, hidrolizando o amido de forma a produzir maior número de extremidades não redutoras, que servem de substrato para a glicoamilase. Além disso, MANJUNATH e col. (1983) relataram que a glicoamilase tem uma atuação mais eficaz sobre as ligações glicosídicas α -1,6 na presença de α -amilase.

Em leveduras, foi demonstrada a aplicação prática deste sinergismo através da transformação com plasmídios contendo os genes de ambas as enzimas. Os transformantes foram capazes de hidrolizar o amido mais rápida e eficientemente, convertendo-o todo em glicose (KIM e col., 1988; STEYN e PRETORIUS, 1991). Os

fungos, principalmente os do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus*, possuem naturalmente ambos os genes presentes em seus genomas. Foram verificadas 2 a 3 cópias do gene da α -amilase (KORMAN e col., 1990; WIRSEL e col., 1989) contra apenas 1 cópia do gene da glicoamilase nestes fungos (ASHIKARI e col., 1986; BOEL e col., 1984b; NUNBERG e col., 1984). O maior número de cópias do gene da α -amilase nestes fungos pode indicar sua importância no sistema de degradação do amido e, como consequência, na indução da glicoamilase.

Seria importante, em estudos posteriores, incluir análises da produção de α -amilase, principalmente nos estágios iniciais de fermentação, para se avaliar o papel desta enzima na indução da produção de glicoamilase. A obtenção de mutantes α -amilase negativos também deve colaborar para este esclarecimento.

5.2. PRODUÇÃO DE GA EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Através da análise da produção de GA em meio com farinha de raspa de mandioca (MAC), amido solúvel (MAS), maltose (MAL) e glicose (MAG) foi possível identificar diferenças entre as linhagens de baixa produção de glicoamilase (TABELA 2). O mutante *lgp73* difere dos demais mutantes por não produzir GA em qualquer meio de fermentação testado (TABELA 2 a 6); o mutante *lgp05* é capaz de produzir níveis ao redor de 2 U/ml de GA em MAC, MAS e MAL (TABELA 2 a 5); e o mutante *lgp61* pode ser identificado por produzir mais de 1 U/ml de GA em MAC e MAS e praticamente não produzir GA em MAL e MAG (TABELAS 2 a 6). Este tipo de diferenciação é bastante útil, quando se necessita identificar genes mutados presentes em um recombinante obtido por cruzamento entre mutantes.

As linhagens de alta produção não puderam ser totalmente diferenciadas entre si, mas foi possível agrupá-las. Os mutantes *hgp112* e *hgp147*, assim como a linhagem parental, apresentam níveis de produção de GA que não diferem significativamente em MAL e MAG, ao contrário dos mutantes *hgp169* e *hgp252* (TABELAS 16 a 20).

Em relação à indução da produção da enzima dos mutantes, nos diferentes meios de fermentação testados, a farinha de raspa integral de mandioca foi o melhor indutor para todas as linhagens parentais e mutantes, com exceção da *lgp61*, que teve melhor indução com amido solúvel como fonte de carbono (TABELA 2).

BARTON e col. (1972) relataram que o amido e outros polissacarídeos, nem sempre eram os melhores indutores de GA e que isto dependeria dos outros componentes do meio de fermentação e da presença de α -amilase. FOWLER e col.

(1990) obtiveram níveis máximos de GA em meio com amido ou maltose, níveis mínimos em glicose e inibição catabólica com xilose. No presente trabalho, não se obtiveram bons níveis de produção de GA com maltose como indutor (TABELA 2). De qualquer forma, os resultados de FOWLER e col. e os aqui obtidos não podem ser comparados diretamente, pois as linhagens, a composição dos meios de fermentação, as condições de cultivo e o método de ensaio da glicoamilase diferem totalmente.

A glicose poderia ser usada como fonte de carbono para seleção de mutantes alto produtores de GA, pois todos os mutantes *hgp* testados apresentaram produção maior que a linhagem parental e menor variação entre repetições da mesma linhagem neste meio de cultivo (TABELA 15 e A2, Apêndice de Tabelas).

5.3. ANÁLISES GENÉTICAS

5.3.1. MUTANTE *lgp73*

Foi demonstrada a existência de dois genes que afetam a produção no mutante *lgp73*, denominados *lgpB* e *ssuA*, não ligados entre si e também não ligados aos marcadores genéticos disponíveis nas linhagens estudadas neste trabalho (MASIERO e BONATELLI JR., 1989). O alelo *lgpB*⁻ causa redução da produção de GA para níveis de 2 a 4,5 U/ml (TABELA 24). O alelo *ssuA*⁻ causa atraso de 3 dias no crescimento em amido como fonte de carbono e em combinação com o alelo *lgpB*⁻ causa um atraso de 6 dias (FIGURA 2). A produção de GA dos mutantes *ssuA*⁻ pode ser considerada como abaixo de 1 U/ml, já que foram encontrados apenas 1 segregante com 3,4 U/ml e dois com pouco mais de 1 U/ml, entre os 15 segregantes *ssuA*⁻ *lysA*⁺ obtidos (TABELA 21 e 25). O efeito da combinação dos dois genes mutados na produção de GA pode ser observado na linhagem *lgp73* (TABELA 2), sendo provavelmente resultado do próprio atraso de 6 dias no crescimento, já que a análise da enzima foi sempre feita com 4 dias de fermentação.

Os genes *ssuA* e *lysA* têm efeito epistático sobre o gene *lgpB*, pois todos os segregantes, com qualquer um daqueles genes mutados, apresentaram produção reduzida a níveis abaixo de 1 U/ml (TABELA 21). A distinção entre segregantes *lysA*⁺ *ssuA*⁻ *lgpB*⁻ e *lysA*⁺ *ssuA*⁻ *lgpB*⁺ foi feita por análise da produção de GA em meio com maltose como fonte de carbono (TABELA A24). Os resultados obtidos mostraram dois grupos de segregantes, um com produção abaixo de 1 U/ml e outro com produção entre 1,5 e 3,5 U/ml (FIGURA 1). O cruzamento teste com segregantes com genótipo *lysA*⁺ *ssuA*⁺ *lgpB*⁻ demonstrou que estes dois grupos possuem genótipos diferentes, indicando que o grupo

de menor produção pode ser identificado como *lgpB*⁻ e o outro como *lgpB*⁺ (TABELA 26). Assim, o meio com maltose como fonte de carbono é útil para caracterizar os segregantes *lysA*⁺ *ssuA*⁻, quanto ao gene *lgpB* (TABELA 21 e TABELA A24, Apêndice de Tabelas). Em contrapartida, não se pode distinguir entre os segregantes *lysA*⁻ *ssuA*⁺ e *lysA*⁻ *ssuA*⁻.

O alelo *lgpB*⁻ é recessivo em relação ao alelo selvagem, como já demonstrado por VALENT (1985). O alelo *ssuA*⁻ pode ser considerado recessivo ou semi-dominante, pois observou-se um pequeno atraso no crescimento de diplóides heterozigotos em MM+A. Esta questão poderia ser melhor avaliada através do acompanhamento do crescimento do diplóide e das linhagens parentais, durante 4 a 6 dias.

Neste trabalho não foram utilizados testes estatísticos para o mapeamento de mutantes de produção, como sugerido por MACDONALD e col. (1972) e que serviram para mapear genes de baixa (VALENT e col., 1992) e alta (CALIL, 1988) produção de GA em *A. niger*, pois foi possível diferenciar os alelos mutantes e selvagens sem este artifício. Outros autores também conseguiram mapear genes de produção desta forma (SERMONTI, 1956; CAGLIOTI e SERMONTI, 1956; NORMANSELL e col., 1979; MAKINS e col., 1983; SWART e col., 1990).

SERMONTI (1956) mapeou duas mutações de baixa produção de penicilina em *Penicillium chrysogenum* a partir de um único diplóide heterozigoto, graças a diferentes características de redução da produção destes mutantes, da mesma forma que no presente trabalho, em relação aos genes *ssuA* e *lgpB*.

5.3.2. MUTANTE *lgp05*

Através dos resultados da análise mitótica dos segregantes do diplóide heterozigoto, obtido entre a linhagem testadora e o mutante *lgp05*, pôde-se constatar a ligação entre o (s) gene (s) presente (s) no mutante e o marcador *lysA*₁ (grupo de ligação III; MASIERO e BONATELLI JR., 1989). Essa conclusão se baseou na presença de 72 segregantes do tipo parental entre os 73 segregantes obtidos (TABELA 28). Não foram observados segregantes com produção selvagem, pois o gene *lysA*₁ também causa redução na produção de GA. BRADSHAW e col. (1983) localizaram duas mutações que acarretavam baixa produção de penicilina em *Aspergillus parasiticus* no mesmo grupo de ligação a partir da constatação da ausência de segregantes do tipo selvagem.

Outra evidência de ligação entre esses genes foi a obtenção de um diplóide homozigoto de genótipo *lysA*⁺ e mutante para as características de produção e

crescimento. O aparecimento deste diplóide pode ser explicado através de não disjunção mitótica, já que ele apresenta combinação parental dos genes em questão.

Apesar das características de redução da produção de GA e atraso no crescimento em meio com amido como fonte de carbono (FIGURA 2), presentes na linhagem *lgp05*, terem sido observadas sempre juntas, não se pode afirmar, com certeza, que resultam de efeito pleiotrópico da mesma mutação. Os dados obtidos não excluem a possibilidade da existência de 2 genes ligados, causando cada uma destas alterações, como no mutante *lgp73*, já que em análises mitóticas, recombinação entre genes ligados ocorre em baixa frequência. O isolamento de revertentes de uma das características (crescimento em amido) e verificação de reversão ou não da outra característica (produção) poderia elucidar esta questão. Outra alternativa de estudo seria o isolamento de recombinantes originados por crossing over mitótico, verificando se há segregação das características descritas. SERMONTI (1956) também observou a presença de 2 características: redução na produção de penicilina e alteração na coloração de conídios, em um mutante de *Penicillium chrysogenum*, e sugeriu que estas características eram resultado de uma única mutação a partir da observação da não segregação das mesmas.

Os resultados de produção e crescimento em amido do diplóide heterozigoto (TABELA 29) demonstram que as características em questão são recessivas em relação ao (s) alelo (s) selvagem (ens).

5.4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Côm os resultados obtidos nos trabalhos de VALENT e col. (1992), CALIL (1988), MASIERO e BONATELLI JR. (1989) e os aqui apresentados, observa-se que existem pelo menos 4 genes que podem condicionar aumento de produção de glicoamilase em *A. niger* e no mínimo 4 que podem condicionar redução na produção, distribuídos em diferentes cromossomos, como mostrados abaixo:

GRUPO I *hgp*₁₄₇ *hgp*₁₆₉ *hgpA*₂₅₂

GRUPO II *hgpB*₂₅₂ *lgpA*₆₁

GRUPO III *ssuB*₀₅ ou *lgpC*₀₅ *ssuB*₀₅

GRUPO V *lgpB*₇₃

GRUPO VI *ssuA*₇₃

Como não foi possível constatar se as características mutadas na linhagem *lgp05* são resultado da alteração de 1 ou 2 genes ligados, o grupo de ligação III apresenta as duas alternativas possíveis. A mutação ou uma das mutações presentes na linhagem *lgp05* foi chamada de *ssuB*, pois, da mesma forma que aquela presente na linhagem *lgp73* (*ssuA*), tem efeito tanto no crescimento quanto na produção de GA.

Os índices numéricos referem-se ao mutante no qual foi identificada a mutação, por isso, os genes *lgpB* e *ssuA*, assim como os genes *hgpA* e *hgpB*, recebem o mesmo índice. A ordem dos genes, nos grupos de ligação I e II, não foi determinada.

A distribuição dos genes de um mesmo sistema de regulação, em diferentes cromossomos no genoma é uma característica comum de sistemas de regulação de eucariotos (CAGLIOTI e SERMONTI, 1956; EDWARDS e col., 1974; HOLT e col., 1976; DITCHBURN e col., 1976; PAPA, 1978; 1980; 1982; MAKINS e col., 1983; SWART e col., 1990). Dada a presença de apenas um gene estrutural da glicoamilase no genoma de *A. niger* (BOEL e col., 1984b), a presença de diferentes genes capazes de afetar a produção de glicoamilase indica que eles devem estar envolvidos na sua regulação e/ou secreção. O estudo aqui descrito fornece bases para trabalhos futuros de elucidação do modo de ação dos genes envolvidos na regulação e secreção de enzimas amilolíticas no fungo *A. niger*.

6. CONCLUSÕES

1 - Os mutantes de alta e baixa produção de glicoamilase são semelhantes às linhagens selvagens quanto a crescimento em meio mínimo com glicose, maltose, sacarose, xilose, sorbitol, lactose ou galactose, como fonte de carbono.

2 - Os mutantes *lgp05* e *lgp73* e o segregante SV-40 apresentam atraso de 3; 6 e 3 dias respectivamente, para iniciar o crescimento em meio mínimo com amido como fonte de carbono.

3 - As análises de produção de glicoamilase em meios com amido solúvel, maltose ou glicose como fonte de carbono, são capazes de diferenciar os genes mutados de baixa produção, presentes nas linhagens *lgp73*, *lgp61* e *lgp05*. A linhagem *lgp73* não produz glicoamilase em nenhum dos meios de fermentação testados; a linhagem *lgp61* não produz em meio com maltose e glicose como fonte de carbono e a linhagem *lgp05* não produz em meio com glicose.

4 - As análises de produção de glicoamilase em meios com amido solúvel, maltose ou glicose como fonte de carbono, permitem diferenciar os mutantes de alta produção de glicoamilase em dois grupos: as linhagens *hgp112* e *hgp147* têm produções semelhantes em meios com maltose e glicose, tal qual a linhagem parental *pab1 fum1*, e as linhagens *hgp169* e *hgp252* têm produções significativamente diferentes em meios com maltose e glicose.

5 - Existem 2 genes mutados na linhagem *lgp73* causando a redução da produção de glicoamilase, que não estão ligados entre si, nem aos marcadores dos grupos de ligação I, II, III e IV. Um gene foi denominado *lgpB₇₃* (low glucoamylase production) e reduz a produção a níveis entre 2 e 4,5 U/ml da enzima. O outro, denominado *ssuA₇₃* (slow starch utilization) acarreta atraso de 3 dias para iniciar crescimento em meio mínimo com amido como fonte de carbono e redução da produção de glicoamilase a níveis abaixo de 1 U/ml.

6 - O gene *ssuA₇₃* tem efeito epistático sobre o gene *lgpB₇₃*, sendo que a combinação destes dois genes mutados causa a redução da produção de glicoamilase a níveis mínimos, e atrasa em 6 dias o início do crescimento em meio mínimo com amido como fonte de carbono.

7 - A análise da produção de glicoamilase em meio com maltose como fonte de carbono é útil para distinguir segregantes *ssuA⁻ lgpB⁻* de *ssuA⁻ lgpB⁺*.

8 - As características de atraso de três dias no crescimento em meio mínimo com amido como fonte de carbono, e produção de glicoamilase ao redor de 3 U/ml, presentes na linhagem *lgp05* estão ligadas ao marcador *lysA₁*, no grupo de ligação III. Estas características são recessivas e podem ser efeitos de uma única mutação (*ssuB₀₅*) ou de duas mutações independentes (*lgpC₀₅* e *ssuB₀₅*).

7. RESUMO

Mutantes com produção alterada de glicoamilase foram caracterizados quanto a crescimento em diferentes fontes de carbono e mapeados em grupos de ligação, no intuito de se contribuir para o entendimento do papel destes genes na regulação e secreção de glicoamilase no fungo *Aspergillus niger*. Os mutantes são semelhantes às linhagens parentais quanto a crescimento em glicose, maltose, sacarose, xilose, sorbitol, lactose ou galactose como fonte de carbono, e em amido, os mutantes de baixa produção, *lgp05* e *lgp73* e o segregante SV-40, apresentam atraso de 3; 6 e 3 dias, respectivamente, para iniciar o crescimento. Foi possível diferenciar os mutantes de baixa produção entre si e separar os mutantes de alta produção em dois grupos, através das análises das quantidades de glicoamilase produzidas em meios de fermentação com amido solúvel, maltose ou glicose como fonte de carbono. Dois genes alterados estão presentes no mutante *lgp73*, denominados *lgpB* e *ssuA*, um, reduzindo a produção da enzima e o outro acarretando atraso no crescimento em amido como fonte de carbono, respectivamente, sendo o gene *ssuA₇₃* epistático sobre *lgpB₇₃*. O alelo mutante *lgpB⁻* é recessivo e *ssuA⁻* pode ser recessivo ou semi-dominante. O fato de não estarem ligados entre si, nem localizados nos 4 grupos de ligação conhecidos, sugere a existência de mais 2 grupos de ligação na linhagem estudada. A sugestão é que o gene *lgpB₇₃* constitua marcador do grupo de ligação V e *ssuA₇₃*, marcador do grupo de ligação VI. As características de atraso no crescimento em amido e redução da produção de glicoamilase, presentes no mutante *lgp05*, estão ligadas ao marcador *lysA₁*, no grupo de ligação III, são recessivas e tanto podem ser efeitos de uma mutação em um único gene, como em 2 genes ligados.

8. ABSTRACT

Mutants with altered glucoamylase production were characterized regarding the ability to grow on different carbon sources and the genes assigned to linkage groups aiming a better understanding of the role of these genes in the regulation and secretion of the enzyme in the fungi *Aspergillus niger*. All the mutants were shown to behave similarly to the parental strains when growing on media containing glucose, maltose, sucrose, xylose, sorbitol, lactose or galactose as sole carbon sources. The initiation of growth, using starch as the carbon source, for the mutants *lgp05* and *lgp73* and segregant SV-40 happens after only 3; 6 and 3 days of incubation respectively, showing a considerable delay when compared to the parental strains which start growth after one day post inoculation. Using the analysis of the enzyme production on media containing starch, maltose or glucose we are able to distinguish between each of the 3 low producing mutants and separate the 4 overproducing mutants in two distinct groups. Two mutations are found in strain *lgp73*. One of them, *lgpB₇₃* is recessive allele and the locus was assigned as the first marker for the linkage group V, being responsible for the impairment of glucoamylase production. The other, *ssuA₇₃* is a recessive or semidominant allele, being epistatic over the former, causing low yields of glucoamylase and delay in growth in media containing starch as the carbon source. The locus was assigned as the first marker for linkage group VI. In the case of mutant *lgp05* both characteristics of low glucoamylase production and growth delay are recessive and are located in linkage group III. The characteristics can be determined by a single mutation (*ssuB₀₅*) or by two mutations located on different but linked genes (*lgpC₀₅* and *ssuB₀₅*).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARST, H.N., Jr., 1989. The *areA* gene mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. In: THE EMBO-ALKO WORKSHOP ON MOLECULAR BIOLOGY OF FILAMENTOUS FUNGI. Proceedings...Helsinki, NEVALAINEN, H. & PENTILA, M. (eds.). Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, 6: 53-62.
- ARST, H.N., Jr. & C. SCAZZOCCHIO, 1985. Formal Genetics and Molecular Biology of the control of gene expression in *Aspergillus nidulans*. In: BENNET, J.W. & LASURE, L.L. (eds.) Gene manipulations in fungi. Academic Press. p. 309-343.
- ASHIKARI, T.; N. NAKAMURA; Y. TANAKA; N. KIUCHI; Y. SHIBANO; T. TANAKA; T. AMACHI; H. YOSHIZUMI, 1986. *Rhizopus* raw-starch-degrading glucoamylase: its cloning and expression in Yeast. Agricultural Biological Chemistry, 50: 957-964
- ASHIKARI, T.; N. KIUCHI-GOTO; Y. TANAKA; Y. SHIBANO; T. AMACHI; H. YOSHIZUMI, 1989. High expression and efficient secretion of *Rhizopus oryzae* glucoamylase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 30: 515-520.
- AZEVEDO, J.L. & S.O.P. COSTA, 1973. Exercícios práticos de Genética. São Paulo, EDUSP. 288p.
- BARTON, L.L.; C.E. GEORGI; D.R. LINEBACK, 1972. Effect of maltose on glucoamylase formation by *Aspergillus niger*. Journal of Bacteriology, 111: 771-777.
- BENOIST, C.; K. O'HARE; R. BREATHNACH; P. CHAMBON, 1980. The ovalbumin gene-sequence of putative control regions. Nucleic Acids Research, 8: 127-142.
- BHELLA, R.S. & I. ALTOSAAR, 1987. Translational control of α -amylase gene expression in *Aspergillus awamori*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2: 287-293.

- BHELLA, R.S. & I. ALTOSAAR, 1988. Role of cAMP in the mediation of glucose catabolite repression of glucoamylase synthesis in *Aspergillus awamori*. Current Genetics, 14: 247-252.
- BOEL, E.; I. HJORT; B. SVENSSON; F. NORRIS; K.E. NORRIS; N.P. FIIL, 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.; M.T. HANSEN; I. HJORT; I. HOEGH; N.P. FIIL, 1984b. Two different types of intervening sequences in the glucoamylase gene from *Aspergillus niger*. The EMBO Journal, 3: 1581-1585.
- BONATELLI JR., R., 1981. Parassexualidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, ESALQ/USP. 91p. (Tese de Doutorado).
- BONATELLI JR., R.; G.U. VALENT; M. MASIERO; A. VIALTA & M.R. CALIL, 1984. Genetics of amyloglucosidase production in *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori*. In: JAPAN-BRAZIL SYMPOSIUM ON SCIENCE AND TECHNOLOGY, 4, Rio de Janeiro. v.2. p. 34-41.
- BOS, C.J.; A.J.M. DEBETS; K. SWART; A. HUYBERS; G. KOBUS; S.M. SLAKHORST, 1988. Genetic analysis and the construction of master strains for the assignment of genes to six linkage groups in *Aspergillus niger*. Current Genetics, 14: 437-443.
- BRADSHAW, R.E.; J.W. BENNETT; J.F. PEBERDY, 1983. Parasexual analysis of *Aspergillus parasiticus*. Journal of General Microbiology, 129: 2117-2123.
- BRAUS, G.H., 1991. Aromatic amino acid biosynthesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eucaryotic biosynthetic pathway. Microbiological Reviews, 55: 349-370.
- BRITTEN, R.J. & E.H. DAVIDSON, 1969. Gene regulation for higher cells: A Theory. Science, 165: 349-357.
- CAGLIOTI, M.T. & G. SERMONTI, 1956. A study of the genetics of penicillin-producing capacity in *Penicillium chrysogenum*. Journal of General Microbiology, 14: 38-46.
- CALIL, M.R., 1988. Isolamento e análise genética de mutantes de *Aspergillus niger* com aumento na produção de amiloglicosidase. Campinas, UNICAMP. 108p. (Tese de Mestrado).

- CLANCY, M.J.; L.M. SMITH; P.T. MAGEE, 1982. Developmental regulation of a sporulation-specific enzyme activity in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology, 2: 171-178.
- COLONNA, W.J. & P.T. MAGEE, 1978. Glycogenolytic enzymes in sporulating Yeast. Journal of Bacteriology, 134: 844-853.
- DEBETS, A.J.M.; K. SWART; E.F. HOLUB; T. GOOSEN; C.J. BOS, 1990a. Genetic analysis of *amdS* transformants of *Aspergillus niger* and their use in chromosome mapping. Molecular and General Genetics, 222: 284-290.
- DEBETS, A.J.M.; K. SWART; C.J. BOS, 1990b. Genetic analysis of *Aspergillus niger*: isolation of chlorate resistance mutants, their use in mitotic mapping and evidence for an eighth linkage group. Molecular and General Genetics, 221: 453-458.
- DEVCHAND, M. & D. GWYNNE, 1991. Expression of heterologous proteins in *Aspergillus*. Journal of Biotechnology, 17: 3-10.
- DITCHBURN, P.; G. HOLT; K.D. MACDONALD, 1976. The genetic location of mutation increasing penicillin yield in *Aspergillus nidulans*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE GENETICS OF INDUSTRIAL MICROORGANISMS. Proceedings...MACDONALD, K.D. (ed.). New York, Academic Press. v.2 p.213-227.
- DIXON, M. & E.C. WEBB, 1962. Enzymes. 2 ed. London, Longmans. 193p.
- DRANGINIS, A.M., 1986. Regulation of cell type in yeast by the mating-type locus. Trends in Biochemical Science, 11: 328-331.
- DRANGINIS, A.M., 1989. Regulation of *STA1* gene expression by *MAT* during the life cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology, 9: 3992-3998.
- EDWARDS, G.F.StL.; G. HOLT; K.D. MACDONALD, 1974. Mutants of *Aspergillus nidulans* impaired in penicillin biosynthesis. Journal of General Microbiology, 84: 420-422.
- EL-GOGARY, S.; A. LEITE; O. CRIVELLARO, D.E. EVELEIGH; H. EL-DORRY, 1989. Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America, 86: 6138-6141.

- ERRAT, J.A.; P.E. DOUGLAS; F. MORANELLI; V.L. SELIGY, 1984. The induction of α -amylase by starch in *Aspergillus oryzae*: evidence for controlled mRNA expression. Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology, 62: 678-690.
- ERRAT, J.A. & A. NASIM, 1986. Allelism within the *DEX* and *STA* gene families in *Saccharomyces diastaticus*. Molecular and General Genetics, 202: 255-256.
- FELENBOK, B.; V. SOPHIANOPOULOU; M. MATHIEU, D. SEQUEVAL; P. KULMBURG; G. DIALLINAS; C. SCAZZOCCHIO, 1989. Regulation of genes involved in the utilisation of carbon sources in *Aspergillus nidulans*. In: THE EMBO-ALKO WORKSHOP ON MOLECULAR BIOLOGY OF FILAMENTOUS FUNGI. Proceedings... Helsinki, NEVALAINEN, H. & PENTTILA, M. (eds.) Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, 6: 73-83.
- FOGARTY, W.M. & C.T. KELLY, 1979. Starch degrading enzymes of microbial origin. In: BULL, M.J. (ed.) Progress in Industrial Microbiology, New York, Elsevier. cap.15. p. 87-150.
- FOGARTY, W.M. & C.T. KELLY, 1980. Amylases, amyloglucosidases and related glucanases. In: ROSE, A.H. (ed) Microbial enzymes and Bioconversions. London, Academic Press. cap.3. p. 115-170.
- FOWLER, T.; R.M. BERKA; M. WARD, 1990. Regulation of the *glaA* gene of *Aspergillus niger*. Current Genetics, 18: 537-545.
- GHOSH, A.; B. CHATTERJEE; A. DAS, 1990. Induction and catabolite repression of high-affinity glucoamylase in *Aspergillus terreus* strain 4. Journal of General Microbiology, 136: 1307-1311.
- GILES, N.H.; M.E. CASE; J. BAUM; R. GEEVER; L. HUIET; V. PATEL; B. TYLER, 1985. Gene organization and regulation in the *qa* (Quinic Acid) gene cluster of *Neurospora crassa*. Microbiological Reviews, 49: 338-358.
- HASTIE, A.C., 1970. Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. Nature, 226: 771.

- HAYASHIDA, S.; K. NAKAHARA; K. KURODA; T. KAMACHI; K. OHTA; S. IWANAGA, 1988. Evidence for post-translational generation of multiple forms of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* glucoamylase. Agricultural and Biological Chemistry, 52: 273-275.
- HAWKINS, A.R. & C.F. ROBERTS, 1989. Molecular interactions between the quinic acid catabolic and shikimate pathways in *Aspergillus nidulans*. In: THE EMBO-ALKO WOKSHOP ON MOLECULAR BIOLOGY OF FILAMENTOUS FUNGI. Proceedings... Helsinki, NEVALAINEN, H. & PENTTILA, M. (eds.) Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, v.6. p. 85-100.
- HEESWIJCK, R. & M.J. HYNES, 1991. The *amdR* product and a CCAAT-binding factor bind to adjacent, possible overlapping DNA sequences in the promoter region of the *Aspergillus nidulans amdS* gene. Nucleic Acids Research, 19: 2655-2660.
- HINNEBUSCH, A.G., 1988. Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiological Reviews, 52: 248-273.
- HOLT, G.; G.F.StL. EDWARDS; K.D. MACDONALD, 1976. The genetics of mutants impaired in the biosynthesis of penicillin. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE GENETICS OF INDUSTRIAL MICROORGANISMS. Proceedings... MACDONALD, K.D. (ed.). New York, Academic Press. v.2. p. 199-211.
- INNIS, M.A.; M.J. HOLLAND; P.C. McCABE; G.E. COLE; V.P. WITTMAN; R. TAL; K.W.K. WATT; D.H. GELFAND; J.P. HOLLAND; J.H. MEADE, 1985. Expression, glycosylation and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. Science, 228: 21-26.
- INUI, M.; S. FUKUI; I. YAMASHITA, 1989. Genetic controls of *STA* gene expression in Yeast. Agricultural and Biological Chemistry, 53: 741-748.
- JACOB, F. & J. MONOD, 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. Journal of Molecular Biology, 3: 318-356.

- JAMIESON, J. & G. PALADE, 1967a. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. I. Role of peripheral elements of the Golgi complex. Journal of Cellular Biology, 34: 577-596.
- JAMIESON, J. & G. PALADE, 1967b. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. Journal of Cellular Biology, 34: 597-615.
- JAMIESON, J. & G. PALADE, 1968a. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. III. Dissociation of intracellular transport from protein synthesis. Journal of Cellular Biology, 39: 580-588.
- JAMIESON, J. & G. PALADE, 1968b. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. IV. Metabolic requirements. Journal of Cellular Biology, 39: 598-603.
- JOHNSTON, M., 1987. A model fungal gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiological Reviews, 51: 458-476.
- KELLY, J.M. & M.J. HYNES, 1985. Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. The EMBO Journal, 4: 475-479.
- KIM, K.; C.S. PARK; J.R. MATTOON, 1988. High-efficiency, one-step starch utilization by transformed *Saccharomyces* cells which secrete both yeast glucoamylase and mouse α -amylase. Applied and Environmental Microbiology, 54: 966-971.
- KORMAN, D.R.; F.T. BAYLISS; C.C. BARNETT; C.L. CARMONA; K.H. KODAMA; T.J. ROYER; S.A. THOMPSON; M. WARD; L.J. WILSON; R.M. BERKA, 1990. Cloning, characterization and expression of two α -amylase genes from *Aspergillus niger* var. *awamori*. Current Genetics, 17: 203-212.
- KOTYLAK, Z. & M.R. EL-GEWELY, 1991. A genetic analysis of an alpha-amylase super-secretor in yeast; implications for the regulatory pathway. Current Genetics, 20: 181-184.
- KUEK, C. & D.K. KIDBY, 1984. Screening fungi for improved glucoamylase productivity using buffered Dextran broth cultures. Biotechnology Letters, 6: 561-566.

- KUMAGAI, M.H.; M. SHAH; M. TERASHIMA; Z. VRKLJAN; J.R. WHITAKER; R.L. RODRIGUEZ, 1990. Expression and secretion of rice alpha-amylase by *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 94: 209-216.
- LAMBRECHTS, M.G.; I.S. PRETORIUS; P. SOLLITTI; J. MARMUR, 1991. Primary structure and regulation of a glucoamylase-encoding gene (*STA2*) in *Saccharomyces diastaticus*. Gene, 100: 95-103.
- LANGFORD, C.J. & D. GALLWITZ, 1983. Evidence for an intron-contained sequence required for the splicing of yeast RNA polymerase II transcripts. Cell, 33: 519-527.
- LINEBACK, D.R.; I.J. RUSSELL; C. RASMUSSEN, 1969. Two forms of the glucoamylase of *Aspergillus niger*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 134: 539-553.
- MACDONALD, K.D.; G. HOLT; P. DITCHBURN, 1972. The genetics of penicillin production. In: IFS: FERMENTATION TECHNOLOGY TODAY, 4. Proceedings... p. 251-257.
- MAKINS, J.F.; G. HOLT; K.D. MACDONALD, 1983. The genetic location of three mutations impairing penicillin production in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 129: 3027-3033.
- MANJUNATH, P.; B. C. SHENOY; M. R. R. RAO, 1983. Fungal glucoamylases. Journal of Applied Biochemistry, 5: 235-260.
- MARCINIAK, V.G.P. & M.R. KULA, 1982. A comparative study of the methods for the determination of the activity of the bacterial α -amylases. Stärke, 34: 422-430.
- MARZLUF, G.A., 1981. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. Microbiological Reviews, 45: 437-461.
- MASIERO, M., 1988. Parassexualidade e produção de amiloglicosidase em *Aspergillus niger*. Campinas, UNICAMP. 110p. (Tese de Mestrado).
- MASIERO, M. & BONATELLI JR, R., 1989. Genetic study of auxotrophic and resistant mutants of *Aspergillus niger* and their glucoamylase production. Brazilian Journal of Genetics, 12: 707-718.

- MONTENECOURT, B.S. & D.E. EVELEIGH, 1985. Fungal carbohydrases: amylases and cellulases. In: BENNET, J.W. & LASURE, L.L. (eds.) Gene Manipulations in fungi. New York, Academic Press p.491-512.
- NGA, B.H.; C.M. GAILLARDIN; P. FOURNIER; H. HESLOT, 1989. Genetic analysis of lipase low-producing mutants of *Yarrowia lipolytica*. Journal of General Microbiology, 135: 2439-2443.
- NORMANSELL, P.J.M.; I.D. NORMANSELL; G. HOLT, 1979. Genetic and biochemical studies of mutants of *Penicillium chrysogenum* impaired in penicillin production. Journal of General Microbiology, 112: 113-126.
- NOVICK, P.; C. FIELD; R. SCHEKMAN, 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the Yeast secretory pathway. Cell, 21: 205-215.
- NOVICK, P.; S. FERRO; R. SCHEKMAN, 1981. Order of events in the Yeast secretory pathway. Cell, 25: 461-469.
- NUNBERG, J.H.; J.H. MEADE; G. COLE; F.C. LAWYER; P. McCABE; V.SCHWEICKART; R. TAL; V.P. WITTMAN; J.E. FLATGAARD; M.A. INNIS, 1984. Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of *Aspergillus awamori*. Molecular and Cellular Biology, 4: 2306-2315.
- OKIMOTO, Y.; H. YOSHIMOTO; H. SHIMA; R. AKADA; O. NIMI; I. YAMASHITA, 1989. Genes required for transcription of *STA1* encoding an extracellular glucoamylase in the yeast *Saccharomyces*. Agricultural and Biological Chemistry, 53: 2797- 2800.
- OLIVEIRA, A.L.Z.G., 1991. Interação gênica e produção de glicoamilase em híbridos interespecíficos entre *Aspergillus niger* e *Aspergillus awamori*. Campinas, UNICAMP. 124p. (Tese de Mestrado).
- PALADE, G., 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science, 189: 347-358.
- PAPA, K.E., 1978. The parasexual cycle in *Aspergillus parasiticus*. Mycologia, 70: 766-773.
- PAPA, K.E., 1979. Genetics of *Aspergillus flavus*: complementation and mapping of aflatoxin mutants. Genetical Research, 34: 1-9.

- PAPA, K.E., 1980. Dominant aflatoxin mutant of *Aspergillus flavus*. Journal of General Microbiology, 118: 279-282.
- PAPA, K.E., 1982. Norsolorinic acid mutant of *Aspergillus flavus*. Journal of General Microbiology, 128: 1345-1348.
- PARDO, J.M.; J. POLAINA; A. JIMÉNEZ, 1986. Cloning of the *STA2* and *SGA* genes encoding glucoamylases in yeasts and regulation of their expression by the *STA10* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Research, 14: 4701-4718.
- PARDO, J.M.; E. LÁNEZ; M. ZALACAÍN; M.G. CLAROS; A. JIMÉNEZ, 1988. Similar short elements in the 5' regions of the *STA2* and *SGA* genes from *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters, 239: 179-184.
- PATEL, D.; I.H. EVANS; E.A. BEVAN, 1990. A genetic analysis of glucoamylase activity in the diastatic yeast *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 625. Current Genetics, 17: 281-288.
- PENTTILA, M.E.; K.M.H. NEVALAINEN; A. RAYNAL; J.K.C. KNOWLES, 1984. Cloning of *Aspergillus niger* genes in Yeast. Expression of the gene coding *Aspergillus* β -glucosidase. Molecular and General Genetics, 194: 494-499.
- PIKIELNY, C.W.; J.L. TEEN; M. ROSBASH, 1983. Evidence for the biochemical role of an internal sequence in yeast nuclear mRNA introns: implications for U1-RNA and metazoan mRNA splicing. Cell, 34: 395-403.
- PIMENTEL GOMES, F.P., 1970. Curso de Estatística Experimental. 4 ed. São Paulo, Gráfica Benetti. 430p.
- POLAINA, J. & M.Y. WIGGS, 1983. *STA10*: a gene involved in the control of starch utilization by *Saccharomyces*. Current Genetics, 7: 109-112.
- PONTECORVO, G.; J.A. ROPER; E. FORBES, 1953a. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. Journal of General Microbiology, 8: 198-210.
- PONTECORVO, G.; J.A. ROPER; L.M. HEMMONS; K.D. MACDONALD; A.W.J. BUFTON, 1953b. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, 5: 141-238.

- PRETORIUS, I.S.; T. CHOW; J. MARMUR, 1986a. Identification and physical characterization of yeast glucoamylase structural genes. Molecular and General Genetics, 203: 36-41.
- PRETORIUS, I.S.; T. CHOW, D. MODENA; J. MARMUR, 1986b. Molecular cloning and characterization of the *STA2* glucoamylase gene of *Saccharomyces diastaticus*. Molecular and General Genetics, 203: 29-35.
- PRETORIUS, I.S.; D. MODENA; M. VANONI; S. ENGLARD; J. MARMUR, 1986c. Transcriptional control of glucoamylase synthesis in vegetatively growing and sporulating *Saccharomyces* species. Molecular and Cellular Biology, 6: 3034-3041.
- PRETORIUS, I.S. & J. MARMUR, 1988. Localization of yeast glucoamylase genes by PFGE and OFAGE. Current Genetics, 14: 9-13.
- PRETORIUS, I.S. & M.G. LAMBRECHTS, 1991. The glucoamylase multigene family in *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*: An overview. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 26: 53-76.
- PUGH, T.A. & M.J. CLANCY, 1990. Differential regulation of *STA* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and General Genetics, 222: 87-96.
- ROGERS, J. & R. WALL, 1980. A mechanism for RNA splicing. Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America, 77: 1877-1879.
- SCHMIDELL, W.; M. C. R. FACCIOTTI; B.V. KILIKIAN; H. ABONTBOUL, 1989. Development of glucoamylase synthesis studies in a biochemical engineering laboratory. International Industrial Biotechnology, 2: 15-17.
- SERMONTI, G., 1956. Complementary genes which affect penicillin yields. Journal of General Microbiology, 15: 599-608.
- SHIMA, H.; M. INUI, R. AKADA; I. YAMASHITA, 1989. Upstream region of the yeast glucoamylase gene which are required for efficient transcription. Agricultural and Biological Chemistry, 53: 749-755.
- SMILEY, K.L.; D.E. HENSLEY; M.J. SMILEY; H.J. GASDORF, 1971. Kinetic patterns of glucoamylase isozymes isolated from *Aspergillus* species. Archives of Biochemistry and Biophysics, 144: 694-699.

- SMITH, J.E. & J.A. PATEMAN, 1977. Genetics and physiology of *Aspergillus*. London, Academic Press. 552p.
- SOGAARD, M & B. SVENSSON, 1990. Expression of cDNAs encoding barley α -amylase 1 and 2 in Yeast and characterization of the secreted proteins. Gene, 94: 173-179.
- STEYN, A.J.C. & I.S. PRETORIUS, 1991. Co-expression of *Saccharomyces diastaticus* glucoamylase-encoding gene and a *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase-encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 100: 85-93.
- SVENSSON, B; T.G. PEDERSEN; I. SVENDSEN; T. SAKAI; M. OTTESEN, 1982. Characterization of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. Carlsberg Research Communications, 47: 55-69.
- SVENSSON, B.; K. LARSEN; A. GUNNARSSON, 1986. Characterization of glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*. European Journal of Biochemistry, 154: 497-502.
- SWART, K.; P. van de VONDERVOORT; C.F.B. WITTEVEEN; J. VISSER, 1990. Genetic localization of a series of genes affecting glucose oxidase levels in *Aspergillus niger*. Current Genetics, 18: 435-439.
- TADA, S.; K. GOMI; K. KITAMOTO; K. TAKAHASHI; G. TAMURA; S. HARA, 1991. Construction of a fusion gene comprising the TAKA-amylase A promotor and the *Escherichia coli* β -glucuronidase gene and analysis of its expression in *Aspergillus oryzae*. Molecular and General Genetics, 229: 301-306.
- TAKAHASHI, T.; Y. TSUCHIDA; M. IRIE, 1978. Purification and some properties of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* species. Journal of Biochemistry, 84: 1183-1194.
- TAKAHASHI, T.; K. KATO; Y. IKEGAMI; M. IRIE, 1985. Different behavior towards raw starch of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* sp. Journal of Biochemistry, 98: 663-671.
- TAMAKI, H., 1978. Genetic studies of ability to ferment starch in *Saccharomyces*: gene polymorphism. Molecular and General Genetics, 164: 205-209.

- TANAKA, Y.; T. ASHIKARI; N. NAKAMURA; N. KIUCHI; Y. SHIBANO; T. AMACHI; H. YOSHIZUMI, 1986a. Comparison of amino acid sequences of three glucoamylases and their structure-function relationships. Agricultural and Biological Chemistry, 50: 965-969.
- TANAKA, Y.; T. ASHIKARI; N. NAKAMURA; N. KIUCHI; Y. SHIBANO; T. AMACHI; H. YOSHIZUMI, 1986b. Glucoamylase produced by *Rhizopus* and by a recombinant Yeast containing the *Rhizopus* glucoamylase gene. Agricultural and Biological Chemistry, 50: 1737-1742.
- UEDA, S.; 1981. Fungal glucoamylases and raw starch digestion. Trends in Biochemical Science, 6: 89-90.
- UEDA, S. & B.C. SAHA, 1981. Raw starch digestion by microbial amylase. Utilization Research, 1: 9-17.
- UPSHALL, A.; B. GIDDINGS; T.D. MORTIMORE, 1977. The use of Benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*. Journal of General Microbiology, 100: 413-418.
- VALENT, G.U., 1985. Isolamento e análise genética de mutantes com alteração na produção de amiloglicosidase em *Aspergillus niger*. Campinas, UNICAMP. 113p (Tese de Mestrado).
- VALENT, G.U.; M.R. CALIL; R. BONATELLI JR, 1992. Isolation and genetic analysis of *Aspergillus niger* mutants with reduced extracellular glucoamylase. Brazilian Journal of Genetics, 15: 19-32.
- VANONI, M.; M. LOTTI; L. ALBERGHINA, 1989. Expression of cloned *Saccharomyces diastaticus* glucoamylase under natural and inducible promoters. Biochimica et Biophysica Acta, 1008: 168-176.
- VIALTA, A., 1987. Genética e produção de amiloglicosidase em *Aspergillus awamori* e no híbrido interespecífico com *Aspergillus niger*. Campinas, UNICAMP. 173p. (Tese de Mestrado).
- VIALTA, A. & R. BONATELLI JR, 1990. Parasexual analysis of *Aspergillus awamori* by using intraespecific diploids and interespecific hybrids with *Aspergillus niger*. Brazilian Journal of Genetics, 13: 445-458.

- WILSON, A.C.; L.R. MAXSON; V.M. SARICH, 1974a. Two types of molecular evolution: evidence from studies of interespecific hybridization. Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America, 71: 2843-2847.
- WILSON, A.C.; V.M. SARICH; L.R. MAXSON, 1974b. The importance of gene rearrangement in evolution: evidence from studies on rates of chromosomal, protein and anatomical evolution. Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America, 71: 3028- 3030.
- WIRSEL, S.; A. LACHMUND; G. WILDHARDT; E. RUTTKOWSKI, 1989. Three α -amylase genes of *Aspergillus oryzae* exhibit identical intron-exon organization. Molecular Microbiology, 3: 3-14.
- WITTEVEEN, C.F.B.; P. van de VONDERVOORT, K. SWART; J. VISSER, 1990. Glucose oxidase overproducing and negative mutants of *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology, 33: 683-686.
- YABUKI M., N. ONO, K. HOSHINO; S. FUKUI, 1977. Rapid induction of α -amylase by nongrowing mycelia of *Aspergillus oryzae*. Applied and Environmental Microbiology, 34: 1-6.
- YAMASHITA, I & S. FUKUI, 1983a. Molecular cloning of a glucoamylase producing gene in the Yeast *Saccharomyces*. Agricultural and Biological Chemistry, 47: 2689-2692.
- YAMASHITA, I & S. FUKUI, 1983b. Mating signals control expression of both starch fermentation genes and a novel flocculation gene *FLO8* in the Yeast *Saccharomyces*. Agricultural and Biological Chemistry, 47: 2889-2896.
- YAMASHITA, I. & S.FUKUI, 1984a. Genetic background of glucoamylase production in the Yeast *Saccharomyces*. Agricultural and Biological Chemistry, 48: 137-142.
- YAMASHITA, I. & S. FUKUI, 1984b. Isolation of glucoamylase non-producing mutants in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. Agricultural and Biological Chemistry, 48: 131-136.
- YAMASHITA, I. & S. FUKUI, 1985. Transcriptional control of the sporulation-specific glucoamylase gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology, 5: 3069-3073.

- YAMASHITA, I.; T. MAEMURA; T. HATANO; S. FUKUI, 1985a. Polymorphic extracellular glucoamylase genes and their evolutionary origin in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. Journal of Bacteriology, 161: 574-582.
- YAMASHITA, I.; K. SUZUKI; S. FUKUI, 1985b. Nucleotide sequence of the extracellular glucoamylase gene *STA1* in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. Journal of Bacteriology, 161: 567-573.
- YAMASHITA, I.; Y. TAKANO; S. FUKUI, 1985c. Control of *STA1* gene expression by the mating-type locus in yeasts. Journal of Bacteriology, 164: 769-773.
- YAMASHITA, I.; M. NAKAMURA; S. FUKUI, 1987. Gene fusion is a possible mechanism underlying the evolution of *STA1*. Journal of Bacteriology, 169: 2142-2149.
- YOSHIMOTO, H. & I. YAMASHITA, 1991. The *GAM1/SNF2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a highly charged nuclear protein required for transcription of the *STA1* gene. Molecular and General Genetics, 228: 270-280.
- YOSHINO, E. & S. HAYASHIDA, 1978. Enzymatic modification of glucoamylase of *Aspergillus awamori* var. *kawachi*. Journal of Fermentation Technology, 56: 289-295.
- ZARET, K.S. & F. SHERMAN, 1982. DNA sequence required for efficient transcription terminaton in Yeast. Cell, 28: 563-573.

APÊNDICE DE TABELAS

TABELA A1 Produção de GA (U/ml) dos parentais e mutantes *lgp* em MAC, MAS, MAL e MAG (5 repetições por linhagem por tratamento).

	MAC					MAS				
<i>pab1 fum1</i>	11,4	13,2	12,8	13,2	10,8	8,7	8,9	8,2	8,7	8,0
<i>nic1 olv3</i>	6,7	7,5	7,3	6,2	7,3	5,9	5,5	6,2	5,9	5,5
<i>lgp05</i>	1,6	1,9	2,1	2,0	1,9	1,1	2,1	1,2	4,7	2,2
<i>lgp61</i>	0,5	2,1	2,3	0,7	0,6	2,1	2,4	2,8	1,6	2,1
<i>lgp73</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MAL					MAG				
<i>pab1 fum1</i>	7,7	6,2	5,4	6,7	5,4	3,6	3,4	2,8	3,8	3,0
<i>nic1 olv3</i>	5,4	5,9	6,4	5,4	5,0	3,1	3,0	3,3	3,1	2,4
<i>lgp05</i>	2,7	2,5	2,0	2,3	2,7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<i>lgp61</i>	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0	0,2	0,2	0,0
<i>lgp73</i>	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

TABELA A2 Produção de GA (U/ml) da linhagem parental e dos mutantes *hgp* em MAC, MAS, MAL e MAG (5 repetições por linhagem por tratamento).

	MAC					MAS				
<i>pab1 fum1</i>	17,9	13,5	14,7	16,4	13,9	15,1	11,5	12,4	13,9	13,5
<i>hgp169</i>	22,4	24,6	23,8	24,6	23,1	16,0	17,8	16,4	17,8	18,3
<i>hgp252</i>	18,4	16,9	18,9	18,4	21,8	10,9	11,2	12,2	12,2	13,6
<i>hgp147</i>	14,0	15,6	20,0	18,9	21,2	11,5	11,5	10,0	14,3	12,2
<i>hgp112</i>	21,2	21,2	22,4	21,2	24,6	10,6	9,4	11,2	13,6	11,5
	MAL					MAG				
<i>pab1 fum1</i>	5,9	2,8	5,1	8,9	3,0	1,9	3,4	1,0	2,5	3,5
<i>hgp169</i>	13,1	9,4	11,6	10,4	7,9	5,2	6,2	7,2	5,2	6,5
<i>hgp252</i>	7,9	8,4	7,9	9,9	8,1	6,9	6,3	6,7	6,7	4,8
<i>hgp147</i>	7,5	8,6	7,7	8,4	8,8	5,5	6,2	4,8	4,2	6,3
<i>hgp112</i>	10,2	4,5	5,1	4,7	5,5	3,4	4,6	5,6	4,6	4,5

TABELA A3 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da tabela A1 relativos a crescimento em farinha integral de mandioca (MAC).

	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Linhagens	4	522,10	130,52	283,73*
Resíduo	20	9,32	0,46	
Total	24	531,42		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A4 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da Tabela A1 relativos a crescimento em amido solúvel (MAS).

	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Linhagens	4	227,3	56,8	113,6*
Resíduo	20	10,1	0,5	
Total	24	227,3		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A5 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da tabela A1 relativos a crescimento em maltose (MAL).

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Linhagens	4	170,2	42,5	141,6*
Resíduo	20	5,9	0,3	
Total	24	175,5		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A6 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da Tabela A1 relativos a crescimento em glicose (MAG).

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Linhagens	4	55,96	13,99	279,8*
Resíduo	20	1,11	0,05	
Total	24	57,08		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A7 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da tabela A1 relativos à linhagem *pab1 fum1*.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	3	213,85	71,28	114,9*
Resíduo	16	9,92	0,62	
Total	19	223,77		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A8 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da Tabela A1 relativos à linhagem *nic1 olv3*.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	3	43,07	14,30	75,2*
Resíduo	16	3,10	0,19	
Total	19	46,17		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A9 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da tabela A1 relativos à linhagem *lgp05*.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	3	15,75	5,25	9,3*
Resíduo	16	8,93	0,56	
Total	19	24,68		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A10 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da Tabela A1 relativos à linhagem *lgp61*.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	3	3,30	1,10	4,5*
Resíduo	16	3,94	0,24	
Total	19	7,24		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A11 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da tabela A1 relativos à linhagem *lgp73*.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	3	0,096	0,03	30*
Resíduo	16	0,012	0,001	
Total	19	0,108		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A12 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da Tabela A2 relativos a crescimento em farinha integral de mandioca (MAC).

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Linhagens	4	225,48	56,37	14,9*
Resíduo	20	75,68	3,78	
Total	24	301,16		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A13 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da tabela A2 relativos a crescimento em amido solúvel (MAS).

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Linhagens	4	116,6	29,1	16,4*
Resíduo	20	35,3	1,7	
Total	24	151,9		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A14 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da Tabela A2 relativos a crescimento em maltose (MAL).

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Linhagens	4	89,8	22,4	6,6*
Resíduo	20	67,5	3,3	
Total	24	157,3		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A15 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da tabela A2 relativos a crescimento em glicose (MAG).

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Linhagens	4	47,8	11,9	14,9*
Resíduo	20	16,0	0,8	
Total	24	63,8		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A16 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da Tabela A2 relativos à linhagem *pab1 fun1*.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	3	577,1	192,3	61,0*
Resíduo	16	50,4	3,1	
Total	19	627,5		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A17 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da tabela A2 relativos à linhagem *hgp169*.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	3	897,9	299,3	180*
Resíduo	16	26,6	1,6	
Total	19	924,5		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A18 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da Tabela A2 relativos à linhagem *hgp252*.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	3	456,5	152,2	108,7*
Resíduo	16	23,1	1,4	
Total	19	479,7		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A19 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da tabela A2 relativos à linhagem *hgp147*.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	3	440,4	146,8	45,8*
Resíduo	16	51,1	3,2	
Total	19	491,6		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A20 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da Tabela A2 relativos à linhagem *hgp112*.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	3	952,2	317,4	117,5*
Resíduo	16	43,2	2,7	
Total	19	995,5		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A21 Produção de GA (U/ml) dos parentais do diplóide *lgp73//SM-13* par.

REPETIÇÕES	<i>lgp73</i>	SM-13 par.
1	0,01	0,27
2	0,02	0,28
3	0,01	0,24
4	0,01	0,27
5	0,01	0,38
6	0,02	0,15
7	0,01	0,17
8	0,01	0,22
9	0,02	0,22
10	0,01	0,08
11	0,01	0,21
12	0,00	0,25
13	0,01	0,30
14	0,00	0,32
15	0,01	0,28

TABELA A22 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da tabela 24, relativos aos segregantes *lysA⁺ lgpB⁻*, que crescem em amido como fonte de carbono.

	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Linhagens	13	749,61	57,66	90,09*
Resíduo	56	36,16	0,64	
Total	69	785,78		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A23 Comparação de médias de produção de GA dos segregantes *lysA⁺ lgpB⁻*, que crescem em amido como fonte de carbono.

Linhagens	Média de Produção (U/ml)							
<i>pab1 fun1</i>	13,9	a						
<i>nic1 olv3</i>	6,8		b					
SM-24	4,5			c				
SV-57	4,0			c	d			
SV-54	3,9			c	d	e		
SM-13	3,0			c	d	e	f	
SV-36	3,0			c	d	e	f	
SV-37	2,9			c	d	e	f	
SM-8	2,5				d	e	f	
SM-22	2,5				d	e	f	
SM-6	2,2					e	f	
SM-29	2,0						f	g
SM-13 par.	0,3							g
<i>lgp73</i>	0,0							h

DMS a 5% = 1,78

As médias com as mesmas letras não diferem significativamente a nível de 5%.

TABELA A24 Produção de GA (U/ml) dos segregantes *ssuA*⁻ (ou *snuA*⁻) obtidos a partir do diplóide *lgp73//SM-13* par., cultivados em meio de fermentação com maltose como fonte de carbono.

SEGREGANTES	PRODUÇÃO
SM-1	0,35
SM-2	1,60
SM-3	0,36
SM-4	2,25
SM-5	2,51
SM-7	0,29
SM-9	1,99
SM-10	1,99
SM-12	0,22
SM-15	2,41
SM-16	0,43
SM-17	2,69
SM-18	1,88
SM-19	0,44
SM-21	2,50
SM-30	0,30
SV-33	0,43
SV-34	0,37
SV-35	0,44
SV-39	2,80
SV-40	3,41
SV-42	0,43
SV-49	0,43
SV-52	2,51
SV-53	0,86
SV-55	1,63
SV-56	0,59
SV-59	1,89

TABELA A25 Produção de GA (U/ml) das linhagens parentais, segregantes e diplóides dos tipos I e II com 5 repetições em meio com maltose como fonte de carbono.

LINHAGEM	PRODUÇÃO DE GA				
<i>pab1 fum1</i>	2,1	3,1	2,9	2,6	3,7
<i>nic1 olv3</i>	1,9	2,2	2,2	2,2	1,9
<i>lcp73</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SM-13 par.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
SV-54	1,1	1,0	1,0	1,2	1,0
SV-57	1,1	1,0	1,1	1,3	1,1
SV-59	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1
SM-1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3
SM-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SM-30	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SM-5	2,5	1,8	1,7	1,2	1,4
SM-17	1,1	1,2	1,3	1,2	1,5
SV-40	1,4	1,3	1,5	1,2	2,4
dipl. parent.	1,9	2,1	2,2	1,9	1,9
SM-1//SV-57	0,7	0,6	0,5	0,5	0,4
SM-3//SV-57	0,8	0,6	0,4	0,5	0,7
SM-30//SV-57	0,5	0,6	0,8	0,5	0,5
SM-5//SV-54	1,8	1,7	1,4	3,3	2,2
SM-17//SV-54	1,6	2,6	2,5	2,3	2,3
SV-40//SM-29	1,8	1,8	2,2	2,2	2,6

TABELA A26 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da tabela A25.

	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Linhagens	19	75	3,9	43,3*
Resíduo	80	7	0,1	
Total	99	82		

* significante a nível de 1%.

TABELA A27 Produção de GA (U/ml) dos parentais do diplóide *lgp05//SV-10* par.

REPETIÇÕES	<i>lgp05</i>	SV-10 par.
1	3,04	0,12
2	3,09	0,14
3	2,59	0,11
4	2,72	0,12
5	3,05	0,14
6	3,05	0,12
7	2,74	0,10
8	3,13	0,33
9	3,02	0,14
10	3,42	0,12

TABELA A28 Produção de GA (U/ml) das linhagens parentais e diplóides homocigoto* e heterocigoto** para o gene *lysA*⁺ e para o(s) gene(s) mutado(s) na linhagem *lgp05* (5 repetições por linhagem).

LINHAGEM.	PRODUÇÃO DE GA				
<i>pab1 fum1</i>	9,2	13,9	13,9	13,1	12,7
<i>nic1 olv3</i>	9,2	5,5	7,3	8,2	9,2
<i>lgp05</i>	1,4	2,0	1,8	2,0	1,9
SM-10 par.	0,4	0,4	0,1	0,3	0,4
<i>lgp05</i> //SV-10 par.**	10,6	8,2	11,5	7,2	11,2
<i>lgp05</i> //SV-10 par.*	3,3	4,6	6,2	4,6	4,4

TABELA A29 Análise de variância pelo teste F dos dados de produção de GA da tabela A28, relativos a produção de parentais e diplóides homocigoto e heterocigoto para o gene *lysA*⁺ e para a mutação ou mutações presentes na linhagem *lgp05*.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Linhagens	5	560,2	112,0	62,2*
Resíduo	24	44,1	1,8	
Total	29	604,3		

* significativo a nível de 1%.

TABELA A30 Crescimento em MM e MM+A expresso na forma de diâmetro da colônia (cm).

		DIAS DE CRESCIMENTO							
		1	2	3	4	5	6	7	8
<i>pab1 fum1</i>	MM	0,5	1,0	2,3	3,0	4,2	5,0	5,9	6,6
	MM+A	0,0	1,0	2,6	3,6	4,6	5,7	6,6	7,4
<i>nic1 olv3</i>	MM	0,4	1,1	2,0	2,8	3,7	4,4	5,5	6,2
	MM+A	0,0	1,4	2,3	3,2	4,2	5,3	6,3	7,2
<i>lgp73</i>	MM	0,5	1,2	2,0	2,5	3,7	4,7	5,9	6,5
	MM+A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	2,5
<i>lgp61</i>	MM	0,5	1,4	2,2	3,1	3,6	4,9	5,6	6,3
	MM+A	0,0	1,7	2,6	3,7	4,7	5,7	6,8	7,1
<i>lgp05</i>	MM	0,4	1,5	2,0	2,9	3,9	4,7	5,7	6,3
	MM+A	0,0	0,0	0,0	1,5	*	3,7	4,5	5,5
SV-40	MM	0,5	1,7	2,3	3,1	4,1	4,9	5,9	6,5
	MM+A	0,0	0,0	0,0	*	*	3,8	4,6	5,1
SV-54	MM	0,5	1,4	2,1	2,7	3,6	4,4	5,2	5,8
	MM+A	0,0	1,6	2,3	3,0	4,1	4,8	5,9	6,9

* dados não tomados.