

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/10230
IB/80429

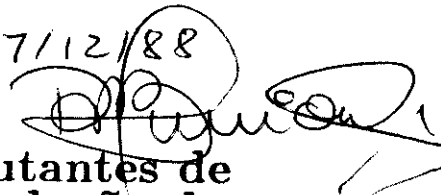
MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1988

120 Este exemplar corresponde à Redação Final da Tese defendida pela candidata Maria Regina Calil e aprovada pela Comissão Julgadora

7/12/88



Isolamento e Análise Genética de Mutantes de *Aspergillus niger* com Aumento na Produção de Amiloglicosidase

MARIA REGINA CALIL

Orientador: Prof. Dr. Renato Bonatelli Junior

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

Campinas SP
1988

CLASSIF. <u>1</u>
AUTOR <u>CL28i</u>
V. EX
FORMBO BY <u>Jo230</u>
<u>13/10/59</u>

13/ 80429
24/ 30230

À
Meus pais, Simão e Vilma
Minhas irmãs, Simone e Eliane

Dedico

Agradecimentos

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

- Ao Prof. Dr. Renato Bonatelli Junior, pelo apoio inestimável, amizade, paciência e excelente orientação.
- Aos Professores: Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner, Dra. Yoko Bomura Rosato e Dr. Ivanhoé Rodrigues Baracho, pela atenção na leitura e valiosas sugestões durante a análise prévia desta.
- Ao Prof. Dr. Aquiles Eugenio Piedrabuena, pela disponibilidade e auxílio na parte estatística.
- À sempre amiga Elãene Machado Vieira, pelo carinho, confiança, incentivo e amizade sincera.
- À meus pais, que sempre me apoiaram, possibilitaram meus estudos e propiciaram meu desenvolvimento pessoal.
- Aos companheiros: Dilaine R. Silva, Neiva T. O. Aguiar, Ângela C. Cavalaro, Cristina M. Costa, Juverlandi Lugli, Airton Vialta, Antonio Marcos Pupin, Ivo Pierozi, Drauzio E. Rangel e Ricardo Henry, pela amizade, compreensão e incentivo.
- Aos amigos: Márcia Masiero, Ana Maria P. Cardoso, Claudia L. Soraggi e Ivo Pierozi, pelo desprendimento e companheirismo fraterno.
- À Gisela Umbuzeiro Valent, pelo carinho, amizade e excelentes sugestões.
- Às minhas irmãs Simone e Eliane, vovó Zulmira, Tia Nair e toda família, pela força e carinho que me deram durante todo o trabalho.
- À prima Zilda, pela ternura, disponibilidade e colaboração.

- Aos amigos Nádía M. Marchi, Olair Coan, Renato C. Scomparim, Lourdes P. Castelucci e todos os colegas portofelicenses, que me acompanharam e sempre me estimularam para a realização deste trabalho
- Aos estagiários Iramaia e Alfredo, aos técnicos e auxiliares do Laboratório de Genética de Microrganismos e aos funcionários do Departamento de Genética e Evolução, pela colaboração.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de Mestrado como também, a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela concessão de bolsa de incentivo acadêmico.

Conteúdo

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica	2
2.1	O fungo <i>Aspergillus niger</i> e o Ciclo Parassexual	2
2.2	A enzima amiloglicosidase	4
2.2.1	A produção de amiloglicosidase por <i>Aspergillus</i>	6
2.3	Melhoramento genético de microrganismos de interesse industrial	7
3	Materiais e Métodos	10
3.1	Microrganismos utilizados	10
3.2	Meios de Cultura	10
3.2.1	Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO e col., 1953b)	10
3.2.2	Meio Completo (MC) (AZEVEDO e COSTA, 1973)	11
3.2.3	Meio de Fermentação MAC (BONATELLI Jr. e col., 1984)	11
3.2.4	Meio Mínimo (MM) líquido mais 4% de Meio Completo (MC)	11
3.3	Soluções	12
3.3.1	Solução de Tween 80 (0,1%)	12
3.3.2	Solução Salina (0,85%)	12
3.3.3	Solução de Vitaminas	12
3.3.4	Solução de Amido 1% em Tampão Citrato 0,05M - pH 4,0	12
3.3.5	Solução Benlate	12
3.3.6	Solução do Inibidor (UEDA e KOBA, 1973)	13
3.3.7	Solução de lisol 10%	13
3.3.8	Suplementos adicionados ao MM (item 3.2.1.)	13
3.4	Esterilização e Temperatura de Incubação	13
3.5	Luz Ultravioleta (LUV)	13
3.6	Método de Cultivo e Manutenção das Linhagens	13
3.7	Curva de Sobrevivência da Linhagem <u>pab₁fwn₁</u>	14
3.8	Obtenção de Mutantes para Produção da Enzima	14

3.9	Avaliação da Atividade Enzimática	15
3.9.1	Produção da Enzima Amiloglicosidase (AG)	15
3.9.1.1	Tubos de ensaio ou Frascos de 30 ml	15
3.9.1.2	Frascos Erlenmeyer	15
3.9.2	Metodologia para Medida da Atividade Enzimática ¹	15
3.9.2.1	Em tubos de Ensaio	15
3.9.2.2	Em frascos de 30 ml ou Erlenmeyer	15
3.9.3	Medida da Quantidade de Açúcares Redutores	16
3.10	Determinação do Peso Seco do Micélio	16
3.11	Curva de Acúmulo da Enzima em Função do Tempo de Incubação	16
3.12	Teste para Verificar a Auxotrofia dos Mutantes <u>hap</u>	16
3.13	Atividade Enzimática na Presença de um Inibidor Específico	17
3.14	Obtenção e Caracterização dos Diplóides	17
3.14.1	Obtenção dos Diplóides	17
3.14.2	Caracterização dos Diplóides	18
3.15	Manutenção dos Diplóides	18
3.16	Obtenção e Caracterização dos Segregantes	18
3.16.1	Obtenção	18
3.16.2	Caracterização	19
3.17	Mapeamento dos genes que alteram a produção	19
3.18	Análises Estatísticas	19
4	Resultados	20
4.1	Curva de Sobrevivência da Linhagem <u>pab₁fwn₁</u> Após Tratamento com Luz Ultravioleta	20
4.2	Curva de Acúmulo de Amiloglicosidase em Função do Tempo de Incubação	22
4.3	Indução de Mutantes para Produção de AG e Teste em Tubos de Ensaio	24
4.4	Curva de Acúmulo de AG em Diferentes Tipos de Frascos	26
4.5	Produção de AG em Frascos de 30 ml (Fb) Após Tratamento com Luz Ultravioleta	32
4.6	Teste em Erlenmeyer das Colônias Seleccionadas em Frascos Fb	34

4.7	Teste para Verificar a Auxotrofia dos Mutantes <u>hap</u>	34
4.8	Quantificação da AG na Presença de um Inibidor	37
4.9	Obtenção de Diplóides e sua Produção de AG	37
4.9.1	Obtenção e Caracterização de Diplóides	37
4.9.2	Produção de AG dos Diplóides	39
5	Discussão	72
5.1	Curvas de Acúmulo de Amiloglicosidase da linhagem <u>pab₁fwn₁</u> de <i>Aspergillus niger</i>	72
5.2	Obtenção de mutantes para produção de amiloglicosidase	73
5.3	Quantificação de AG na presença de um inibidor específico	74
5.4	Obtenção e caracterização dos diplóides	74
5.5	Teste de interação alélica	75
5.6	Análise dos segregantes e mapeamento das marcas <u>hap</u>	76
6	Conclusões	78
7	Resumo	79
8	Summary	80
9	Referências Bibliográficas	81
	Apêndice de Tabelas	90

Lista de Tabelas

TABELA 1 - Número e Porcentagem relativa de Colônias Sobreviventes da Linhagem <u>pab₁fwn₁</u> , ao Tratamento com Luz Ultravioleta.	21
TABELA 2 - Acúmulo de AG, Quantidade de GR e pH em Função do Tempo de Incubação da linhagem <u>pab₁fwn₁</u>	22
TABELA 3 - Acúmulo de AG, quantidade de GR e peso seco da linhagem <u>pab₁fwn₁</u> , em função do tempo de incubação, com diferentes tipos de frascos.	27
TABELA 4 - Produção média de AG em U/ml dos mutantes selecionados e da parental <u>pab₁fwn₁</u> , e a distribuição das repetições em classes de 2 Unidades.	35
TABELA 5 - Análise do Crescimento dos Mutantes e da Linhagem <u>pab₁fwn₁</u> em Diferentes Tipos de Meios de Cultura.	36
TABELA 6 - Comparação da Atividade Enzimática dos Mutantes Selecionados e da Linhagem <u>pab₁fwn₁</u> na Presença ou Ausência de Inibidor Específico para AG.	37
TABELA 7 - Características dos Diplóides e Respetivos Parentais.	38
TABELA 8 - Produção de AG em U/ml dos diplóides <u>hap112//nic₁olv₃</u> , <u>hap169//nic₁olv₃</u> e <u>pab₁fwn₁//nic₁olv₃</u> e respectivos parentais.	39
TABELA 9 - Análise de Variância dos Dados da TABELA 8.	40
TABELA 10 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA 9.	40
TABELA 11 - Produção de AG em U/ml dos diplóides <u>hap112//nic₁olv₃</u> , <u>hap147 //nic₁olv₃</u> e <u>pab₁fwn₁//nic₁olv₃</u> e respectivos parentais.	41
TABELA 12 - Análise de Variância dos Dados da TABELA 11.	42
TABELA 13 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA 12.	42
TABELA 14 - Análise de Variância dos resultados obtidos do mutante <u>hap112</u> , linhagem <u>pab₁fwn₁</u> e <u>nic₁olv₃</u> e respectivos diplóides em dois ensaios (TABELAS 8 e 11).	43
TABELA 15 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey, dos dados da TABELA 14.	43
TABELA 16 - Produção de AG em U/ml dos diplóides <u>hap252//nic₁olv₃</u> e <u>pab₁fwn₁//nic₁olv₃</u> e seus respectivos parentais.	44
TABELA 17 - Análise de Variância dos Dados da TABELA 16.	45

TABELA 18 – Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA 17.	45
TABELA 19 – Marcas Auxotróficas, Morfológicas e Produção de AG (U/ml) dos Segregantes do Diplóide <u>hap112</u> // <u>nic₁olv₃</u>	48
TABELA 20 – Produção de AG (U/ml) dos Parentais do Diplóide <u>hap112</u> // <u>nic₁olv₃</u>	49
TABELA 21 – Teste de KOLMOGOROV & SMIRNOV para os Segregantes do Diplóide <u>hap112</u> // <u>nic₁olv₃</u>	50
TABELA 22 – Análise Mitótica do Diplóide <u>hap112</u> // <u>nic₁olv₃</u>	50
TABELA 23 – Teste de U para verificação de possíveis ligações da marca <u>hap112</u> com os genes marcadores utilizados.	51
TABELA 24 – Marcas auxotróficas, morfológicas e produção de AG dos segregantes do diplóide <u>hap147</u> // <u>nic₁olv₃</u>	53
TABELA 25 – Produção de AG (U/ml) dos Parentais do Diplóide <u>hap147</u> // <u>nic₁olv₃</u>	54
TABELA 26 – Teste de KOLMOGOROV & SMIRNOV para os Segregantes do Diplóide <u>hap147</u> // <u>nic₁olv₃</u>	56
TABELA 27 – Análise Mitótica do Diplóide <u>hap147</u> // <u>nic₁olv₃</u>	56
TABELA 28 – Teste de U para verificação de possíveis ligações da marca <u>hap147</u> com os genes marcadores utilizados.	57
TABELA 29 – Marcas Auxotróficas, Morfológicas e Produção de AG (U/ml) dos Segregantes do Diplóide <u>hap169</u> // <u>nic₁olv₃</u>	59
TABELA 30 – Produção de AG (U/ml) dos Parentais do Diplóide <u>hap169</u> // <u>nic₁olv₃</u>	60
TABELA 31 – Teste de KOLMOGOROV & SMIRNOV para os Segregantes do Diplóide <u>hap169</u> // <u>nic₁olv₃</u>	62
TABELA 32 – Análise Mitótica do Diplóide <u>hap169</u> // <u>nic₁olv₃</u>	62
TABELA 33 – Teste de U para verificação de possíveis ligações da marca <u>hap169</u> com os genes marcadores utilizados.	63
TABELA 34 – Marcas Auxotróficas, Morfológicas e Produção de AG (U/ml) dos Segregantes do Diplóide <u>hap252</u> // <u>nic₁olv₃</u>	65
TABELA 35 – Produção de AG (U/ml) dos Parentais do Diplóide <u>hap252</u> // <u>nic₁olv₃</u>	66
TABELA 36 – Teste de KOLMOGOROV & SMIRNOV para os Segregantes do Diplóide <u>hap252</u> // <u>nic₁olv₃</u>	68

TABELA 37 - Análise Mitótica do Diplóide <u>hap252</u> // <u>nic₁olv₃</u>	68
TABELA 38 - Teste de U para verificação de possíveis ligações da marca <u>hap252</u> com os genes marcadores utilizados.	69
TABELA 39 - Análise de Variância com os Dados da TABELA 34.	70
TABELA 40 - Comparação das Médias pelo Teste t de Student dos Dados da TABELA 39.	70

Lista de Figuras

FIGURA 1 – Curva de acúmulo de amiloglicosidase, quantidade de GR e pH em função do tempo de incubação da linhagem <u>pab₁fw_n₁</u>	23
FIGURA 2 – Distribuição da Produção de Amiloglicosidase das Colônias Seleccionadas em Tubos de Ensaio Comparadas com a Parental <u>pab₁fw_n₁</u>	25
FIGURA 3 – Curva de acúmulo de AG, quantidade de GR e peso seco, em função do tempo de incubação da linhagem <u>pab₁fw_n₁</u> , observada em ensaio realizado com tubos de ensaio (Fa).	28
FIGURA 4 - Curva de acúmulo de AG, quantidade de GR e peso seco, em função do tempo de incubação da linhagem <u>pab₁fw_n₁</u> , observada em ensaio realizado com frasco de 30 ml (Fb).	29
FIGURA 5 – Curva de acúmulo de AG, quantidade de GR e peso seco, em função do tempo de incubação da linhagem <u>pab₁fw_n₁</u> , observada em ensaio realizado em frasco de 30ml (Fc).	30
FIGURA 6 – Curva de acúmulo de AG, quantidade de GR e peso seco, em função do tempo de incubação da linhagem <u>pab₁fw_n₁</u> , observada em ensaio realizado com frasco Erlenmeyer (Fd).	31
FIGURA 7 – Distribuição da Produção de Amiloglicosidase das Colônias seleccionadas em Frascos de 30 ml (F2) Comparadas com a Parental <u>pab₁fw_n₁</u>	33
FIGURA 8 – Distribuição da Produção de AG dos Segregantes e Parentais do Diplóide <u>hap112//nic₁olv₃</u>	47
FIGURA 9 – Distribuição da Produção de AG dos Segregantes e Parentais do Diplóide <u>hap147//nic₁olv₃</u>	55
FIGURA 10 – Distribuição da Produção de AG dos Segregantes e Parentais do Diplóide <u>hap169//nic₁olv₃</u>	61
FIGURA 11 – Distribuição da Produção de AG dos Segregantes e Parentais do Diplóide <u>hap252//nic₁olv₃</u>	67
FIGURA 12 – Distribuição da Produção de AG dos Segregantes com fenótipos parentais e fenótipos recombinantes do Diplóide <u>hap252//nic₁olv₃</u>	71

Lista de Tabelas do Apêndice

TABELA A1 – Produção de Amiloglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem <u>pab₁fwn₁</u>	91
TABELA A2 – Análise de Variância dos Dados da TABELA A1.	92
TABELA A3 – Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A2.	93
TABELA A4 – Produção de Amiloglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem <u>pab₁fwn₁</u>	94
TABELA A5 – Análise de Variância dos Dados da TABELA A4.	95
TABELA A6 – Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A5.	95
TABELA A7 – Produção de Amiloglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem <u>pab₁fwn₁</u>	96
TABELA A8 – Análise de Variância dos Dados da TABELA A7.	97
TABELA A9 – Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A8.	97
TABELA A10 – Produção de Amiloglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem <u>pab₁fwn₁</u>	98
TABELA A11 – Análise de Variância dos Dados da TABELA A10.	99
TABELA A12 – Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A11.	99
TABELA A13 – Produção de Amiloglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem <u>pab₁fwn₁</u>	100
TABELA A14 – Análise de Variância dos Dados da TABELA A13.	101
TABELA A15 – Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A14.	101
TABELA A16 – Produção de Amiloglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem <u>pab₁fwn₁</u>	102
TABELA A17 – Análise de Variância dos Dados da TABELA A16.	103
TABELA A18 – Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A17.	103
TABELA A19 – Produção de Amiloglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV, linhagem <u>pab₁fwn₁</u> e <u>nic₁olv₃</u>	104

TABELA A20 – Análise de Variância dos Dados da TABELA A19.	105
TABELA A21 – Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A20.	105
TABELA A22 – Produção de Amiloglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem <u>pab₁fwn₁</u>	106
TABELA A23 – Análise de Variância dos Dados da TABELA A22.	107
TABELA A24 – Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A23.	107
TABELA A25 – Produção de Amiloglicosidase em U/ml das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem <u>pab₁fwn₁</u>	108
TABELA A26 – Análise de Variância dos Dados da TABELA A25.	109
TABELA A27 – Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A26.	109

1 Introdução

O fungo filamentoso *Aspergillus niger* produz a enzima amiloglicosidase (E.C.3.2.1.3.) a qual pode ser utilizada na sacarificação de vários substratos amiláceos, como por exemplo, a mandioca (BANKS e col., 1976). Vários microrganismos são capazes de produzir essa enzima. Entre os microrganismos usados industrialmente, os fungos são os maiores produtores (SINKAR e LEWIS, 1982). Várias espécies do gênero *Aspergillus* vem sendo utilizadas na produção da enzima, além de outros gêneros como *Rhizopus* (FAITH e col., 1971).

A enzima amiloglicosidase tem considerável interesse industrial, devido a sua capacidade de hidrolisar ligações glicosídicas alfa-1,4 e alfa-1,6 do amido, partindo de extremidades não redutoras, liberando unidades de glicose (DIXON e WEBB, 1962). O produto obtido, pode ser utilizado como substrato no processo de fermentação alcoólica, entre outros fins (BANKS e col., 1976).

Apesar dos trabalhos conduzidos sobre parassexualidade em *Aspergillus niger* (LHOAS, 1961, 1967; TUYLL, 1977; BONATELLI Jr. e col., 1983; BOS, 1987), existe apenas um relato disponível, nesse fungo, sobre estudos dos genes envolvidos na produção de amiloglicosidase (VALENT, 1985).

Este trabalho tem portanto, como objetivos:

- Selecionar linhagens mutantes de *Aspergillus niger*, que apresentem aumento na produção de amiloglicosidase, utilizando, como mutagênico, a luz ultravioleta.
- Analisar o tipo de interação alélica dos genes que aumentam a produção, através de diplóides heterozigotos obtidos entre os mutantes isolados e linhagens parentais e;
- Mapear as mutações isoladas em relação às marcas auxotróficas e morfológicas disponíveis nas linhagens, através de segregantes isolados dos diplóides heterozigotos.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 O fungo *Aspergillus niger* e o Ciclo Parassexual

O fungo *Aspergillus niger* considerado por RAPER e FENNELL (1965) como um organismo tipo do grupo niger, apresenta, quando cultivado em meio Czapek sólido, conídios pretos globosos quando maduros, de aspecto rugoso com equinulações descontínuas, sendo evidenciado duas séries de esterígmias, medindo aproximadamente $5\mu\text{m}$ de diâmetro na maturidade. É abundante em todos os solos examinados, capaz de crescer em grande variedade de substratos orgânicos.

O fungo *Aspergillus niger* é classificado como sendo Deuteromiceto (SubDivisão Deuteromicotina) devido a inexistência ou não evidenciação do ciclo sexual.

Uma alternativa de recombinação genética nos Deuteromicetos é o ciclo parassexual, descrito inicialmente por PONTECORVO e ROPER (1952) em *Aspergillus nidulans*. Em 1953a, PONTECORVO e col. descreveram esse ciclo em *Aspergillus niger*. O ciclo parassexual ocorre em vários gêneros de fungos filamentosos, tendo sido demonstrado em várias espécies (AZEVEDO, 1976; MESSIAS, 1979; CATEN, 1981; RIBA e RAVELOJOANA, 1984; VIALTA, 1987).

Para que ocorra o ciclo parassexual é necessário que haja fusão de núcleos haplóides, com a consequente formação de diplóides, recombinação e haploidização (PONTECORVO, 1956).

Evidências de que a fusão de núcleos haplóides seja um processo possível de ocorrer na natureza são dados pelos trabalhos de NGA e col. (1975) em *A. niger*, WHELAN e MAGEE (1981) em *Candida albicans* e UPSHALL (1981) em *A. nidulans*.

O processo de formação de diplóides ocorre após anastomose de hifas e heterocariose (CATEN e JINKS, 1966; DAVIS, 1966; TINLINE e MCNEILL, 1969). Como consequência da heterocariose, ou seja, a proximidade de núcleos diferentes no mesmo citoplasma, pode ocorrer a cariogamia (fusão de núcleos), originando um

diplóide heterozigoto. A frequência de ocorrer tal evento é normalmente ao redor de 1 diplóide por 10^6 a 10^7 conídios coletados do heterocário porém, essa frequência pode ser aumentada através de tratamento com luz ultravioleta (ISHITANI e SAKAGUCHI, 1956), ou agentes químicos como a cânfora (PONTECORVO e col., 1953a,b; ROPER, 1966) ou colchicina (SHCHERBAKOVA e RESVAYA, 1978). Em *A. niger*, devido a alta frequência de diplóides obtidos espontaneamente, PONTECORVO e col. (1953a) julgaram o tratamento com cânfora desnecessário. BONATELLI Jr. (1981) obteve 1 diplóide em 10^5 conídios e a frequência encontrada por BOS (1985) em outra linhagem de *A. niger* foi de 1 diplóide em 10^6 conídios.

Os diplóides assim obtidos, se assemelham à linhagem selvagem com relação as características auxotróficas e morfológicas, podendo entretanto, serem separados de linhagens haplóides por características como: conteúdo de DNA nuclear (HEAGY e ROPER, 1952), diâmetro de conídios 1,1 a 1,3 vezes maior (PONTECORVO e ROPER, 1952; PONTECORVO e col., 1953a; LHOAS, 1967,1968; CHANG e col., 1974; DAS e ROY, 1978; BONATELLI Jr. e col., 1983; VIALTA, 1987). Entretanto, segundo alguns autores, o diâmetro de conídios não é um critério muito confiável, como citado nos trabalhos de ISHITANI e col. (1956) em *Aspergillus oryzae* e *A. sojae*; HOLLIDAY (1961) em *Ustilago maydis*; TINLINE (1962) em *Cochliobolus sativus*; PAPA (1973) em *Aspergillus flavus*; PAPA (1978) em *Aspergillus parasiticus*; ROSIM e col.(1978) em *Aspergillus niger* e MESSIAS e AZEVEDO (1980) em *Metarhizium anisopliae*.

Outro critério para distinguir colônias diplóides de haplóides é a utilização de agentes haploidizantes, ou seja, substâncias que induzem a formação de segregantes haplóides. Uma série de substâncias com tal efeito tem sido utilizadas. Os primeiros relatos nesse sentido foram feitos com *p*.fluorfenilalanina (pFA) em trabalhos com *Aspergillus niger* e *A. nidulans* (LHOAS, 1961; MORPURGO, 1961). Relatos da utilização do pFA em outras espécies de fungos foram feitos por PAPA (1976, 1978, 1984); BENNET (1979); BRADSHAW e col. (1983). Outra substância que atua como agente haploidizante é o fungicida Benlate, inicialmente utilizado por HASTIE (1970) em *Aspergillus nidulans* para obter segregantes de colônias diplóides. Tem sido utilizado para essa finalidade também em outras espécies por UPSHALL e col. (1976); BONATELLI Jr. (1981); BRADSHAW e col. (1983); BONATELLI Jr. e col. (1983); VALENT (1985); VIALTA (1987); MASIERO (1988).

A recombinação no ciclo parassexual pode ocorrer através de permuta mitótica, que foi estudada por ROPER e PRITCHARD (1955) e PONTECORVO e KÄFER (1958), os quais concluíram que o fenômeno é raro, ocorrendo uma permuta a cada 500 mitoses, forma produtos recíprocos e ocorre em estágio de quatro fios. De acordo com KÄFER (1960, 1961) a ocorrência de segregantes haplóides, diplóides e aneuplóides, podem ser devido à perdas sucessivas de cromossomos, que originariam diversos estados aneuplóides instáveis.

FORBES (1959) estabeleceu técnica baseada em segregação mitótica para localizar novos mutantes em grupos de ligação de *Aspergillus nidulans* e outros fungos, sendo a mesma fundamentada na observação de que linhagens diplóides sofrem haploidizações raras, apresentando ainda mais raramente, permuta mitótica. Desse modo, os membros individuais de cada par de grupos de ligação segregam como unidades inteiras e independentes, fazendo com que marcadores localizados em diferentes grupos mostrem recombinação livre, enquanto que marcadores no mesmo grupo de ligação raramente recombinam.

LHOAS (1967) constatou em *Aspergillus niger* alta frequência de recombinação mitótica e, BONATELLI Jr. e col. (1983), verificaram que na linhagem 10V10 de *A. niger* a frequência parece ser ainda maior tendo sido sugerido o termo paramioseose para denominar o fenômeno caracterizado pelo isolamento diretamente do heterocário de haplóides recombinantes e diplóides homozigotos para as marcas genéticas estudadas. BAGALHI (1987) detectou esse fenômeno em *Metarhizium anisopliae*, o qual parece ser similar ao descrito em *Cephalosporium acremonium* por BALL E HAMLIN (1982) pois, diplóides heterozigotos não foram detectados.

O ciclo parassexual, além de sua importância como fonte de variabilidade, permite o mapeamento em fungos imperfeitos (AZEVEDO, 1972, 1976), o melhoramento de fungos que possuem características de interesse econômico (SERMONTI, 1969; BONATELLI Jr., 1977; MESSIAS, 1977; BONATELLI Jr., 1981; VALENT, 1985) e, através da análise mitótica, pode-se estabelecer o número de grupos de ligação de uma determinada espécie. Assim, foram sugeridos seis grupos de ligação para *Aspergillus niger* (LHOAS, 1967, 1968; TUYLL, 1977; BOS, 1987).

2.2 A enzima amiloglicosidase

A enzima amiloglicosidase ou glucoamilase (AG) (E.C. 3.2.1.3.) é capaz de hidrolisar ligações glicosídicas alfa-1,4 e alfa-1,6 do amido, liberando unidades de glicose a partir de extremidades não redutoras das cadeias. Portanto, essa enzima é capaz de converter totalmente a maltose, a amilose e amilopectina em glicose (DIXON e WEBB, 1962; BARMAN, 1969).

KERR e col. (1951) estudaram em *Aspergillus niger* a ação da amiloglicosidase em amilose e amilopectina, demonstrando que a AG atua nas extremidades das moléculas de amido, liberando como produto final, somente glicose.

PAZUR e KEPPLER (1962) purificaram a AG de *A. niger*, determinando também seu modo de ação e seu peso molecular de aproximadamente $97000 \pm 5\%$.

MOHSIN e col. (1979a,b,c) verificaram a produção de AG por algumas espécies do gênero *Aspergillus*, purificando essa enzima de *Aspergillus foetidus* e *A. awamori* e fizeram o fracionamento da enzima purificada.

Duas formas da enzima, a amiloglicosidase I e II foram demonstradas em *Aspergillus niger* por FLEMING e STONE (1965); LINEBACK (1968); FINCH e LEONARD (1978); SVENSSON e col. (1982); RAMANESH e col. (1982), as quais, segundo MANJUNATH e RAO (1980), possuem atividades enzimáticas similares e são imunologicamente indistinguíveis.

SVENSSON e col. (1983), determinaram toda a sequência de aminoácidos de glucoamilase GI de *Aspergillus niger*, sendo que GA I e GA II tem cadeia polipeptídica com a extremidade NH₂ idêntica. BOEL e col. (1984a) descreveram clonagem do cDNA sintetizado a partir do mRNA de glucoamilase de *A. niger* e sugeriram que montagem diferencial do mRNA pode explicar a existência de duas formas da enzima nesse organismo e, BOEL e col. (1984b) evidenciaram que deve existir somente um gene estrutural para a glucoamilase no genoma.

Em *Aspergillus oryzae*, MIAH e UEDA (1977a,b), encontraram três formas de amiloglicosidase: I, II e III com diferentes peso moleculares (76000, 38000 e 38000, respectivamente), estudando inclusive sua ação em diferentes substratos. SAHA e col. (1979) além de estudarem isoladamente a forma I, mostraram que as formas I, II e III apresentavam-se na proporção de 51(I) : 3(II) : 1(III). Entretanto, RAZZAQUE e UEDA (1978), estudando uma outra linhagem de *A. oryzae* que apresentava alta produção de AG, observaram que ela também produzia três formas de AG porém, essas formas eram diferentes dos tipos relatados anteriormente, apresentando baixa capacidade na digestão do amido cru.

TAKAHASHI e col. (1978), trabalhando com *Rhizopus* sp., também purificaram três formas de amiloglicosidase, estudando suas propriedades. Em *Aspergillus awamori*, HAYASHIDA e col.(1982), evidenciaram na AG I, um sítio de afinidade para amido cru.

UEDA e KOBAYASHI (1973) descobriram um composto produzido por uma linhagem de *Streptomyces* sp. n^o 280 que é capaz de inativar algumas amilases. Esse composto apresenta um pequeno peso molecular e age como inibidor de glucoamilase, alfa-amilases pancreática e salivar e alfa-amilase de bactérias. Essa substância inibidora mostrou um efeito acentuado sobre glucoamilase de *Rhizopus*, inibindo 72,2% da atividade. Em *Aspergillus niger* sua ação inibe apenas 8,3% da atividade da alfa-amilase. Esse composto foi purificado por NAKANO e col. (1981) e se revelou complexo, apresentando pelo menos duas frações principais: uma que se comporta como oligossacarídeo com grupamento amino livre e outra que é provavelmente um glicopeptídeo

MEDDA e col. (1981) estudando a ação desse inibidor purificado contra glucoamilase I purificada de *Aspergillus*, obtiveram 97% de inibição usando uma concentração de 1,6 µg/ml de inibidor em 1,8 U/ml da enzima. VALENTI (1985) verificou em linhagens de *Aspergillus niger* que 60% de inibição da atividade da amiloglicosidase é conseguida com 7,0 µg/ml sendo que esse índice aumentava para 80% de inibição quando se usava uma concentração de 23,0 µg/ml do inibidor. VIALTA (1987), traba-

lhando com *Aspergillus awamori* e o mesmo inibidor, constatou 85% de inibição usando uma concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$.

2.2.1 A produção de amiloglicosidase por *Aspergillus*

LE MENSE e col. (1947) testaram várias culturas do gênero *Aspergillus*, onde verificaram que a linhagem NRRL337 de *Aspergillus niger* era a melhor produtora da enzima dextrinizante, além de estudarem os fatores que afetavam a produção nessa linhagem. Em 1964, SMILEY e col. mostraram que a linhagem NRRL3112 de *Aspergillus awamori* produzia mais amiloglicosidase que a linhagem NRRL337 de *Aspergillus niger*. Em 1966, CADMUS e col. verificaram que as linhagens NRRL3112 de *A. awamori* e NRRL3122 de *A. niger* apresentavam maior eficiência na digestão do amido, que a linhagem NRRL337 de *A. niger*. Observaram também que isso era devido a menor atividade de transglicosidase, que é a enzima responsável pela polimerização de unidades de glicose em oligossacarídeos.

PARK e PAPINI (1970), trabalhando com as linhagens NRRL3122 de *A. niger* e NRRL3112 de *A. awamori* fizeram determinação de condições ótimas para produção de glicose do amido da mandioca. PARK e col. (1971) fizeram tentativas para melhorar a produção através da mudança de meio de cultura líquido para sólido.

PARK e DE LIMA (1972) examinaram a produção de amiloglicosidase de 20 linhagens de fungos obtidas de vários laboratórios e 10 linhagens isoladas de amostras do solo pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* onde verificaram que somente 7 eram produtoras da enzima e, entre essas, as linhagens NRRL3112 de *A. awamori* e NRRL3122 de *A. niger* produziam em maior quantidade.

SINKAR e LEWIS (1980) utilizando um meio com ingredientes não sintéticos observaram um aumento de 10 a 15 vezes na produção de amiloglicosidase e, em 1981, LEWIS e SINKAR estudaram outros fatores que afetavam a produção.

KVESITADZE e col. (1981a) testaram linhagens verdes e pretas do gênero *Aspergillus* e observaram que somente as pretas produziam amiloglicosidase sendo que as boas produtoras eram linhagens de *Aspergillus niger* e *A. awamori*.

FUNGARO (1984), verificando a produção de enzimas amilolíticas de linhagens de *A. niger* e *A. awamori*, verificou que as linhagens ATCC 22342 de *A. awamori* e ATCC 22343 de *A. niger* eram as mais promissoras.

2.3 Melhoramento genético de microrganismos de interesse industrial

O melhoramento genético de microrganismos que produzem metabólitos de interesse industrial pode ser feito em diversos aspectos. Além da produtividade, pode ser melhorada a eficiência na utilização de substratos ou novos compostos relacionados com o produto original podem ser produzidos. As técnicas usadas incluem mutação e recombinação para aumentar o número de variantes genéticas seguidos por triagem e seleção para detecção dos variantes preferidos. As mutações podem ser induzidas nos microrganismos através do uso de mutagênicos físicos ou químicos.

Em 1969, GRATZNER e SHEEMAN isolaram um mutante de *Neurospora crassa*, desreprimido para produção de amilase e invertase, através de irradiação com luz ultravioleta.

YONEDA e MARUO (1975) conseguiram isolar 15 mutantes de *Bacillus subtilis* usando nitrosoguanidina (NTG) como mutagênico, os quais apresentaram produção de duas a três vezes maior de alfa-amilase e cinco a dezesseis vezes maior de protease, que a linhagem parental.

NEVALAINEN (1981) usando NTG e raios gama, isolou um mutante de *Aspergillus niger* com produção de três a quatro vezes maior de beta-galactosidase que a linhagem original.

HAYASHIDA e FLOR (1981) utilizaram os mutagênicos NTG e luz ultravioleta para isolar mutantes de *Aspergillus awamori* com menor produção de protease. Obtiveram um mutante com baixa e outro com alta produção entre os 110 clones testados.

Quanto a produção de ácido cítrico, ILCZUK (1970) e BONATELLI Jr. e col. (1982), relataram aumento de produção em mutantes auxotróficos de *Aspergillus niger*. Porém, essa característica não foi observada nos trabalhos relatados por CHANG e TERRY (1973), DAS e ROY (1978) e DAS (1980).

GOLUBTSOVA e col. (1980) tentaram obter mutantes com a proporção de ácido oxálico diminuída em relação ao ácido cítrico. Conseguiram um mutante produzindo 85% de ácido cítrico e 15% de ácido oxálico, porém, apresentou juntamente, características degenerativas e não foi considerado promissor para produção de ácido cítrico.

Na tentativa de melhoramento do título de Cefalosporina C, BALL e HAMLYM (1982), através de hibridação por fusão de protoplastos, testaram aproximadamente 600 recombinantes de *Acremonium chrysogenum* entre os quais, um isolado mostrou aumento de 40% na produção do antibiótico.

Com relação a enzima amiloglicosidase, CHANG e TERRY (1973) tra-

balhando com uma linhagem de *Aspergillus foetidus* obtiveram, usando luz ultravioleta como mutagênico, mutantes auxotróficos de produção reduzida da enzima. Os diplóides sintetizados entre esses mutantes, recuperaram a produção de AG, que ficou próxima da linhagem parental prototrófica.

PARK e DE SANTI (1977) usando nitrosoguanidina (NTG) como mutagênico, isolaram um mutante de *Aspergillus awamori* que produzia o dobro de amiloglicosidase em relação à parental.

BALL e col. (1978) através de recombinação via ciclo parassexual, obtiveram do diplóide sintetizado, um segregante recombinante de *Aspergillus niger*, que apresentou alta produção de amiloglicosidase.

NEVALAINEN e PALVA (1979) conseguiram através do uso de vários mutagênicos, isolar mutantes de *Aspergillus awamori* com 2,5 vezes maior produção de amiloglicosidase que a linhagem parental. Esses mutantes também apresentavam um aumento na produção de alfa-amilase.

KVEZITADZE e col. (1981b) testaram várias linhagens de fungos, na qual o *Aspergillus niger* 475 foi um dos melhores produtores. Através do uso da luz ultravioleta, obtiveram um mutante que mostrou produção de alfa-amilase estável em ácido, dez vezes maior que a linhagem original, e aumento de duas vezes na produção de amiloglicosidase.

IVANOVA e IROKHINA (1983) usando o mutagênico nitrosoguanidina e seleção de mutantes desreprimidos para maltose, isolaram linhagem de *Aspergillus niger* com produção de AG 2,5 vezes maior que a linhagem parental.

GRIGOROV e col. (1986) obtiveram diplóides de *Rhizopus pygmaeus* com produção aumentada de amiloglicosidase em relação a linhagem selvagem maior produtora.

ILCZUK e FIEDUREK (1986) selecionaram revertentes de mutantes auxotróficos de *Aspergillus niger* com produção de AG 40% maior que o prototrófico melhor produtor.

Outro aspecto importante para a escolha de técnicas de melhoramento, além da produtividade em si, é o estudo dos genes envolvidos na produção de metabólitos. Para essa finalidade podem ser induzidos mutantes com alteração na produção do metabólito de interesse.

Vários estudos nesse sentido foram feitos com relação à produção de antibióticos. BALL (1972) estudando produção de penicilina em *Penicillium chrysogenum* verificou mutações diferentes que, combinadas entre si, ocasionava um aumento na produção. Essas mutações estavam localizadas em três diferentes grupos de ligação.

EDWARDS e col. (1974) e HOLT e col. (1976), estudaram mutantes de *Aspergillus nidulans* que não produziam penicilina e, nos testes de complementação

realizados, verificaram que 20 entre os 28 mutantes analisados, pertenciam ao mesmo grupo de ligação e, os 8 restantes, à pelo menos outros 4 grupos. Os mutantes que permaneceram sem alteração de morfologia e não produziam penicilina eram do mesmo grupo de complementação, e foram designados npeA. Através da análise dos segregantes, verificaram que npeA estava localizado no grupo de ligação VI. MAKINS e col. (1983), continuando essa linha de pesquisa, mapearam mais 3 mutações npe B, C e D nos grupos de ligação III, IV e II, respectivamente.

RUDD e HOPWOOD (1979) trabalhando com *Streptomyces coelicolor*, obtiveram 76 mutantes incapazes de produzir o antibiótico "actinorhodin". Eles foram divididos em sete classes fenotípicas considerando a síntese de antibiótico, acúmulo de pigmentos ou produtos precursores. Um membro de cada classe de mutantes foi mapeado num pequeno segmento entre os loci his D e gua A, sugerindo que os genes estruturais para a biossíntese desse antibiótico podem formar um agregado gênico.

Em *Aspergillus nidulans*, MACDONALD e col. (1972) estudaram 3 mutações que foram denominadas pen-01, pen-02 e pen-03, as quais conferiam aumento na produção de penicilina, produzindo respectivamente, 20, 12 e 20 U/ml. Mapeamento dessas mutações feita através de análise mitótica entre os mutantes e linhagem testadora MSE, que apresentava produção de 5 U/ml, indicou que pen-01 estava localizado no grupo de ligação VIII, pen-02 no III e pen-03 no IV, sendo confirmado pela análise meiótica. MACDONALD (1972) confirma a localização de pen-01 no cromossomo VIII, mostrando que esta era distal à marca cha A. Em 1976, DITCHBURN e col., observaram que a mutação pen-A1 (pen-01) era recessiva, pen-B2 (pen-02) dominante e pen-C3 (pen-03) semi-dominante, verificando também, que pen-A1 e pen-C3 eram epistáticas à pen-B2.

Estudos de mutações que afetavam a produção de amiloglicosidase foram feitos por YAMASHITA e FUKUI (1984) e VALENT (1985). Os primeiros, trabalhando com *Saccharomyces diastaticus* e utilizando etilmetanosulfonato (EMS) como mutagênico, isolaram mutantes que não produziam amiloglicosidase (amy-). Foi também verificado que essas mutações pertenciam a dois grupos de complementação amy1 e amy2 e eram recessivas. As mutações amy1 mapeavam no gene STA I, produtor de AG I. A segunda, trabalhando com linhagens de *Aspergillus niger* isolou mutantes que apresentavam baixa produção de AG. Constatou, através de testes de interações alélicas, que todas as mutações induzidas eram recessivas e, no teste de complementação, foram revelados pelo menos dois genes que afetavam a produção de AG: o lap61 e o lap73 ou lap38.

3 Materiais e Métodos

3.1 Microrganismos utilizados

As linhagens de *Aspergillus niger* utilizadas neste trabalho foram linhagens mutantes denominadas:

pab₁fwn₁ : apresenta deficiência nutricional para ácido *p*.aminobenzóico e conídios marron claro.

nic₁olv₃ : apresenta deficiência nutricional para ácido nicotínico e conídios verde oliva.

Essas linhagens foram derivadas da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger*, por tratamento com luz Ultravioleta (BONATELLI Jr., 1981).

pab₁fwn₁/nic₁olv₃ : diplóide controle, gentilmente cedido por Gisela Umbuzeiro Valent.

3.2 Meios de Cultura

3.2.1 Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO e col., 1953b)

Nitrato de Sódio	6,00 g
Cloreto de Potássio	0,52 g
Sulfato de Magnésio	0,52 g
Fosfato dihidrogenado de Potássio	1,52 g
Sulfato de Ferro	traços
Sulfato de Zinco	traços
Glicose (Dextrose)	10,00 g
Água Destilada	1,00 l

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

3.2.2 Meio Completo (MC) (AZEVEDO e COSTA, 1973)

Adicionou-se a 1 litro de MM:

Peptona	2,0 g
Caseína Hidrolizada	1,5 g
Extrato de Leveduras	0,5 g
Solução de Vitaminas (item 3.3.3.)	1,0 ml
Ácido Nucleíco de Leveduras	2,5 ml

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH (4sólido, adicionou-se 15 g de ágar por litro.

3.2.3 Meio de Fermentação MAC (BONATELLI Jr. e col., 1984)

Farinha de raspa integral de mandioca	20,0 g
Nitrato de Sódio	2,0 g
Fosfato dihidrogenado de Potássio	1,0 g
Sulfato de Magnésio . 7 H ₂ O	0,5 g
Água Destilada	1,0 l

O pH foi ajustado para 5,5 com NaOH (4%) ou HCl (1N); o meio foi distribuído em frascos Erlenmeyer de 125 ml, contendo 25 ml de meio ou em tubos de ensaio ou frascos de 30 ml, contendo 5 ml de meio; esterilização feita a 1 atm (120° C) por 15 minutos. Quando necessário, adicionou-se o requerimento nutricional da linhagem em estudo na concentração de 5 µg/ml.

3.2.4 Meio Mínimo (MM) líquido mais 4% de Meio Completo (MC)

Foi adicionado ao MM (item 3.2.1.) líquido, 4% de MC líquido e, 2,5 ml da solução final foi distribuída em tubos de ensaio, autoclavada e conservada à temperatura ambiente.

3.3 Soluções

3.3.1 Solução de Tween 80 (0,1%)

Foi adicionado Tween 80 à água destilada numa concentração de 0,1% (v/v). Foram colocados 2,5 ml em tubos de ensaio, autoclavados e conservados em refrigerador.

3.3.2 Solução Salina (0,85%)

Aicionou-se 8,5 g de Cloreto de Sódio em 1 litro de água destilada. Foi colocado 9 ml dessa solução em frascos com tampa de baquelite e, em seguida, autoclavados.

3.3.3 Solução de Vitaminas

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

A solução foi colocada em frasco escuro e esterilizada em banho-maria a 60° C por 30 minutos, durante 3 dias consecutivos. A conservação foi feita em refrigerador sobre clorofórmio.

3.3.4 Solução de Amido 1% em Tampão Citrato 0,05M - pH 4,0

Pesou-se 1 g de amido solúvel (marca ECIBRA) e dissolveu-se a quente em aproximadamente 40 ml de água destilada. Paralelamente, misturou-se 33 ml de uma solução 0,1M de ácido cítrico com 17 ml de solução 0,1M de citrato de sódio . 2 H₂O (pH 4,0), adicionou-se ao amido dissolvido e completou-se o volume para 100 ml com água destilada.

3.3.5 Solução Benlate

Em um frasco escuro, previamente esterilizado, foram colocados 60 mg de Benlate (fungicida: Metil-1 (butil-carbamoil)-2-Benzimidazole-carbamato) mais 1 ml

de acetona e, após homogeneizar, completou-se o volume para 100 ml com água destilada esterilizada. A solução foi então agitada e conservada à temperatura ambiente.

3.3.6 Solução do Inibidor (UEDA e KOBA, 1973)

O Inibidor² foi dissolvido em água destilada esterilizada, numa concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{ul}$.

3.3.7 Solução de lisol 10%

Foi adicionado 1 ml de lysoform em 9 ml de água destilada esterilizada. A solução foi estocada em geladeira.

3.3.8 Suplementos adicionados ao MM (item 3.2.1.)

Os requerimentos nutricionais das linhagens em estudo foram adicionados na concentração final de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3.4 Esterilização e Temperatura de Incubação

Todos os meios de cultura e soluções usadas no presente trabalho (a menos que seja especificado no item de maneira diversa) foram esterilizados em autoclave à temperatura de 120° C e 1 atmosfera de pressão durante 20 minutos.

Em todos os experimentos, a temperatura para incubação foi de 28° C.

3.5 Luz Ultravioleta (LUV)

Nos experimentos de irradiação foi usada lâmpada Mineralight - Mult Band - UV-SL.25 da Ultra violet Products INC, San Gabriel Califórnia, emitindo ondas curtas na intensidade de 300 $\text{uw}/\text{cm}^2/\text{s}$. O pico de comprimento de ondas é de 254 nm. A altura da lâmpada usada nos experimentos foi de 6,4 cm.

3.6 Método de Cultivo e Manutenção das Linhagens

As culturas foram inoculadas em placas de Petri contendo MC (item 3.2.2.) e incubadas por 7 dias para crescimento vegetativo. A manutenção das culturas foi feita em tubos de ensaio contendo MC inclinado a 4° C.

²Gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Seinosuke Ueda, Kyushu University, FUKUOKA, Japão.

3.7 Curva de Sobrevivência da Linhagem pab₁fwn₁

Após 7 dias crescimento em placas de Petri contendo MC (item 3.2.2.), transferiu-se os conídios produzidos para uma solução de Tween 80 (item 3.3.1.). Após contagem do número de conídios em hematímetro, fez-se as diluições necessárias para obter-se uma suspensão com 10^6 conídios/ml. Dessa suspensão em Tween 80 foi retirado, para controle, alíquotas de 1 ml e, após terem sido feitas as diluições necessárias para crescer, em média, 100 colônias por placa, semeou-se em 3 placas de Petri contendo MC. O restante da suspensão foi colocado numa placa de Petri vazia, esterilizada, e tratada com luz ultravioleta (item 3.5.) nos tempos 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 minutos. Após a irradiação a cada tempo citado acima, repetiu-se o processo de diluições e semeou-se 3 placas de MC por tratamento.

Após 3-4 dias de incubação, fez-se a contagem do número de colônias desenvolvidas nas placas semeadas.

A porcentagem de sobrevivência foi determinada tomando-se como 100% o número de conídios viáveis estimados na amostra sem irradiação (controle).

3.8 Obtenção de Mutantes para Produção da Enzima

Após 7 dias de crescimento em MC (item 3.2.2) da linhagem pab₁fwn₁, foi feita uma suspensão de conídios em Tween 80 (item 3.3.1.) e, após contagem no hematímetro, foi feito ajuste da concentração com salina (item 3.3.2.) para 10^6 conídios/ml. Essa suspensão foi tratada com luz ultravioleta, pelo tempo correspondente a 1 a 5% de sobrevivência, determinado de acordo com o item 3.7.

Após irradiação, semeou-se a suspensão em 15-20 placas de Petri contendo MC. Como controle da sobrevivência foram semeadas 3 placas sem tratamento com luz Ultravioleta.

Após 4 dias de crescimento em estufa, isolou-se para controle, colônias que não receberam tratamento e as colônias tratadas com luz ultravioleta. Estas foram testadas para produção da enzima pela metodologia descrita no item 3.9.2.

Nos casos de obtenção de mutantes, estes foram retestados em frascos Erlenmeyer no mínimo duas vezes.

3.9 Avaliação da Atividade Enzimática

3.9.1 Produção da Enzima Amiloglicosidase (AG)

A fermentação foi feita em tubos de ensaio, frascos de 30 ml ou Erlenmeyer de 125 ml em meio MAC (item 3.2.3.)

3.9.1.1 Tubos de ensaio ou Frascos de 30 ml Conídios obtidos conforme o item 3.8. foram coletados com uma alça de níquel-cromo e diretamente inoculados nos tubos de ensaio ou frascos de 30 ml contendo meio de fermentação MAC. Inoculou-se uma “alçada” por tubo ou frasco.

3.9.1.2 Frascos Erlenmeyer Conídios com 7 dias de crescimento em MC (item 3.2.2.) ou MM (item 3.2.1.) para as colônias diplóides, foram suspensos em Tween 80 (item 3.3.1.) e contados num hematímetro. O ajuste da concentração foi feito com salina (item 3.3.2.) para 10^6 conídios/ml e, 1 ml dessa suspensão foi inoculada nos frascos Erlenmeyer contendo MAC, sendo feitas 3 a 5 repetições por colônia.

Os tubos ou frascos foram incubados por 96 horas, sem agitação.

Após o tempo de fermentação, a quantidade de enzima produzida foi estimada segundo metodologia descrita nos itens 3.9.2. e 3.9.3.

3.9.2 Metodologia para Medida da Atividade Enzimática³

3.9.2.1 Em tubos de Ensaio Após a fermentação, 0,1 ml de cada amostra foi incubada com 2 ml de solução contendo 1% de amido (item 3.3.4.) mais 1,9 ml de água destilada, durante 60 minutos em banho-maria regulado a 60° C.

Após a incubação as amostras foram retiradas do banho-maria e levadas ao banho de água fervente por 5 minutos para inativação da enzima.

Procedeu-se então, com descrito no item 3.9.3., a medida da quantidade de açúcares redutores liberada após a hidrólise do amido pela Amiloglicosidase.

3.9.2.2 Em frascos de 30 ml ou Erlenmeyer Após a fermentação as amostras foram filtradas e, 0,5 ml de cada amostra diluídas convenientemente foram incubadas com 0,5 ml de solução contendo 1% amido (item 3.3.4.), durante 60 minutos em banho-maria a 60° C.

Após a incubação o procedimento segue igual ao descrito no item 3.9.2.1.

³Condições adaptadas dos trabalhos de PARK e PAPINI, 1970 e BANKS e col., 1976.

3.9.3 Medida da Quantidade de Açúcares Redutores

A quantidade de açúcares redutores liberada após hidrólise do amido pela Amiloglicosidase, foi estimada pelo método da ortotoluidina, utilizando-se kits para determinação de glicose marca LABTEST, DOLLES ou BIOBRÁS. O espectrofotômetro utilizado foi da marca COLEMAN, modelo 295, e as medidas feitas em comprimento de onda de 625 nm ou 630 nm, conforme especificado pelo kit.

Foi feita medida da quantidade de açúcares redutores presente no filtrado pelo mesmo método. Esta medida corresponde a glicose residual (GR) presente no meio de fermentação.

A quantidade de açúcares redutores foi expressa em mg de glicose / 100 ml ou em unidades (U) da enzima/ml, sendo que cada 1000 mg de glicose/ml corresponde a 1 Unidade de Amiloglicosidase.

Considerou-se a quantidade de açúcares redutores medida após hidrólise do amido menos a glicose residual correspondente, para o cálculo da unidade de enzima.

3.10 Determinação do Peso Seco do Micélio

Após fermentação, o micélio formado em cada amostra foi transferido para papel alumínio, previamente pesado, e colocado por 48 horas a 80° C. Após as 48 horas, pesou-se o papel alumínio mais micélio e calculou-se o peso do micélio pela diferença entre o peso do papel alumínio e o papel alumínio mais micélio após secagem.

3.11 Curva de Acúmulo da Enzima em Função do Tempo de Incubação

Para curva, foi utilizada a linhagem parental pab₁fwn₁.

As medidas da atividade enzimática e da glicose residual (item 3.9.), pH e peso seco do micélio (item 3.10.), foram feitas do 1º ao 7º ou 8º dia de fermentação, com 5 repetições por dia em Erlenmeyer de 125 ml, tubos de ensaio e outros tipos de frascos (item 3.9.1.).

3.12 Teste para Verificar a Auxotrofia dos Mutantes hap

Com o auxílio de uma alça de níquel-cromo previamente esterilizada, conídios das colônias que diferiam quanto à produção da enzima da linhagem parental pab₁fwn₁, foram transferidos para placas de Petri contendo MC (item 3.2.2.), MM + ácido *p.aminobenzóico* (paba) (item 3.3.8.) e MM (item 3.2.1.). Em cada placa foi

inoculado 1 ponto da colônia em estudo e 1 ponto da colônia parental, como controle.

As placas foram incubadas por 3-4 dias, dando oportunidade para verificar se as linhagens em estudo mantinham a mesma marca auxotrófica presente na linhagem parental.

3.13 Atividade Enzimática na Presença de um Inibidor Específico

Após fermentação das linhagens pab₁fwn₁, hap112, hap147, e hap169 em frascos Erlenmeyer (item 3.9.1.2.), 1 ml do filtrado foi incubado por 10 minutos a 60° C com 1 ml da solução do inibidor (item 3.3.6.). Foram feitas 3 repetições de cada linhagem.

De cada tubo contendo o inibidor, retirou-se 0,5 ml e incubou-se com 0,5 ml de solução amido (item 3.3.4.). Paralelamente, como controle, incubou-se 0,5 ml do filtrado (sem inibidor) mais 0,5 ml da solução de amido.

As medidas da atividade enzimática foram feitas conforme o item 3.9.3.

3.14 Obtenção e Caracterização dos Diplóides

3.14.1 Obtenção dos Diplóides

Os diplóides foram obtidos através do método de ROPER (1952), via ciclo parassexual.

Suspensão de conídios de cada uma das linhagens selecionadas para cruzamento foram feitas em tubos de ensaio contendo MM líquido + 4% de MC (item 3.2.4.). Após misturar as duas suspensões estas foram incubadas por 5-6 dias. As películas desenvolvidas foram cortadas em 4 pedaços com o auxílio de uma alça de níquel-cromo e transferidas para placas de Petri contendo MM (item 3.2.1.) sendo então, incubadas por 7-8 dias.

Havendo evidências que o heterocário havia sido formado, coletou-se conídios em solução de Tween 80 (item 3.3.1.), dilui-se em salina (1:10) (item 3.3.2), sendo em seguida semeados em placas contendo MM para isolamento de possíveis diplóides. As placas foram incubadas por 7 dias.

As colônias crescendo isoladas que apresentavam coloração e morfologia uniformes foram selecionadas e seus conídios transferidos para MM sólido por inoculação em estrias. Após purificação, foi feita a caracterização dos possíveis diplóides.

3.14.2 Caracterização dos Diplóides

Os critérios utilizados para caracterização dos diplóides foram os seguintes:

1. Prototrofia – cruzando-se linhagens com diferentes marcas genéticas, os diplóides devem ser prototróficos (as marcas se complementam), crescendo portanto, em Meio Mínimo.
2. Coloração de Conídios – quando os haplóides envolvidos no cruzamento são de coloração diferentes, espera-se uma colônia com coloração da linhagem selvagem.
3. Diâmetro de Conídios – espera-se que o diâmetro dos conídios dos diplóides seja ao redor de 1,2 vezes maior que das linhagens parentais haplóides (BONATELLI Jr. e col. 1983). O diâmetro de conídios das linhagens parentais (haplóides) e dos possíveis diplóides foram medidos com uma objetiva micrométrica em montagem em lâmina com lisol 10% (item 3.3.7.), após 7 dias de crescimento da linhagem em MM (item 3.2.1.) ou, quando necessário, MM + requerimentos nutricionais (item 3.3.8.). Foram medidos 30 conídios por linhagem em estudo.
4. Teste com Benlate (HASTIE, 1970 e UPSHALL e col., 1976) – os possíveis diplóides foram inoculados em placas com MC (item 3.2.2.) contendo 1,0 a 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Benlate (item 3.3.5.). O controle foi feito em MC sem Benlate. Verifica-se a formação de setores e crescimento reduzido em relação as parentais haplóides, quando linhagens diplóides são inoculadas em meio de cultura com Benlate.

3.15 Manutenção dos Diplóides

Os diplóides foram inoculados em tubos de ensaio contendo MM (item 3.2.1.) inclinado e, após 7 dias de crescimento, estocados no refrigerador.

3.16 Obtenção e Caracterização dos Segregantes

3.16.1 Obtenção

O isolamento dos segregantes foram feitos inoculando-se os diplóides por 4 pontos em placas de Petri com MC (item 3.2.2.) ou MM + requerimentos nutricionais necessários (item 3.3.8.) + 1,0 ou 1,5 μg de Benlate/ml (item 3.3.5.). As placas foram incubadas durante 5-6 dias. Os setores formados nas colônias diplóides foram purificados por estrias em MC e, a seguir, estocados em tubos de ensaio contendo MC inclinado.

3.16.2 Caracterização

Os segregantes foram caracterizados quanto a coloração dos conídios, auxotrofia e produção da enzima Amiloglicosidase.

3.17 Mapeamento dos genes que alteram a produção

O método a seguir foi descrito por MACDONALD e col. (1972) e utilizado para mapeamento, via ciclo parassexual, de mutações que afetavam a produção de penicilina em *Aspergillus nidulans*, tendo sido já utilizado por MACDONALD (1972) e, para mutações que afetavam produção de Amiloglicosidase em *Aspergillus niger* por VALENT (1985).

Se um alelo mutante específico de uma linhagem testadora segrega independentemente da marca de alta produção hap, então a média da produção de Amiloglicosidase (AG) dos segregantes haplóides com o alelo mutante da linhagem testadora devem ser similar a média da produção de AG dos segregantes haplóides com o alelo selvagem, a não ser que o alelo mutante da linhagem testadora afete a produção de AG. Isso acontece porque metade dos haplóides com o alelo mutante da linhagem testadora deve carregar o gene de alta produção hap e metade o alelo do tipo selvagem. Similarmente, metade dos segregantes haplóides com o alelo selvagem da linhagem testadora devem carregar o gene de alta produção hap e metade do alelo selvagem, não.

Por outro lado, quando um alelo mutante da linhagem testadora está localizado no homólogo do cromossomo que carrega o gene de alta produção hap, a média da produção de AG do segregante haplóide com o alelo mutante da linhagem testadora deve diferir da média da produção de AG daqueles com o alelo selvagem.

Para comparação das médias de produção de AG, utilizou-se um teste não paramétrico denominado Teste de U (Mann-Whitney), (item 3.18).

3.18 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, através de Análise de Variância, Testes de Médias: Tukey e Teste *t* de Student (PIMENTEL GOMES, 1970), Prova de Kolmogorov & Smirnov e Teste de U (Mann-Whitney) (SIEGEL, 1975).

4 Resultados

4.1 Curva de Sobrevivência da Linhagem pab₁fwn₁ Após Tratamento com Luz Ultravioleta

Foram realizadas 4 curvas de sobrevivência conforme metodologia descrita no item 3.7. Os resultados obtidos se encontram na TABELA 1.

A LD₉₅ para a linhagem em estudo foi de 6,35 minutos, calculado segundo BARACHO e ROSIM (1977).

TABELA 1 Número e Porcentagem relativa de Colônias Sobreviventes da Linhagem pab₁fw₁, ao Tratamento com Luz Ultravioleta.

TEMPO (MINUTOS)	MÉDIA DAS COLÔNIAS SOBREVIVENTES								MÉDIA DO Nº DE COLÔNIAS NAS 4 CURVAS	MÉDIA % SOBREVI- VÊNCIA
	1ª curva	%	2ª curva	%	3ª curva	%	4ª curva	%		
0,0	35,00	100,00	61,60	100,00	55,30	100,00	77,00	100,00	57,20	100,00
2,5	22,60	64,50	46,00	74,60	38,30	69,20	44,00	57,10	37,70	65,90
5,0	6,00	17,10	-*	-*	8,50	15,40	12,50	16,20	9,00	15,70
7,5	1,10	3,10	1,80	2,90	0,60	1,10	1,20	1,60	1,20	2,10
10,0	0,03	0,08	0,06	0,10	0,10	0,20	0,10	0,10	0,07	0,12
12,5	0,03	0,08	0,03	0,05	0,06	0,10	0,03	0,04	0,04	0,07
15,0	-**	-**	0,01	0,01	0,02	0,04	-**	-**	0,01	0,02

* - placas perdidas

** - ausência de crescimento

4.2 Curva de Acúmulo de Amiloglicosidase em Função do Tempo de Incubação

Foi traçada uma curva de acúmulo da enzima em frascos Erlenmeyer, medindo-se a quantidade de Amiloglicosidase (U/ml), glicose residual (mg/100 ml) e pH, diariamente, do 1º ao 7º dia (item 3.11). Os resultados obtidos estão resumidos na TABELA 2 e FIGURA 1.

A glicose residual mostrou um pico no 2º dia (970,7 mg/100 ml) e, no 3º dia caiu para 278,1 mg/100 ml até chegar praticamente a zero no 5º dia de incubação. O declínio da glicose residual coincide com o aumento no acúmulo da amiloglicosidase que teve seu pico máximo no 5º dia.

Quanto ao pH que no 1º dia foi de 5,23, teve seu declínio máximo no 4º dia e, após esse tempo, começa a subir lentamente, chegando a 3,32 no 7º dia.

TABELA 2 - Acúmulo de AG, Quantidade de GR e pH em Função do Tempo de Incubação da linhagem pab₁fwn₁.

DIAS DE FERMENTAÇÃO	MÉDIA AG (U/ml)	MÉDIA GR (mg/100ml)	pH
1º	0,06	65,5	5,23
2º	2,4	970,7	2,97
3º	19,5	278,1	1,95
4º	22,7	27,0	1,93
5º	27,3	13,5	2,27
6º	21,7	9,6	2,92
7º	16,9	11,4	3,32

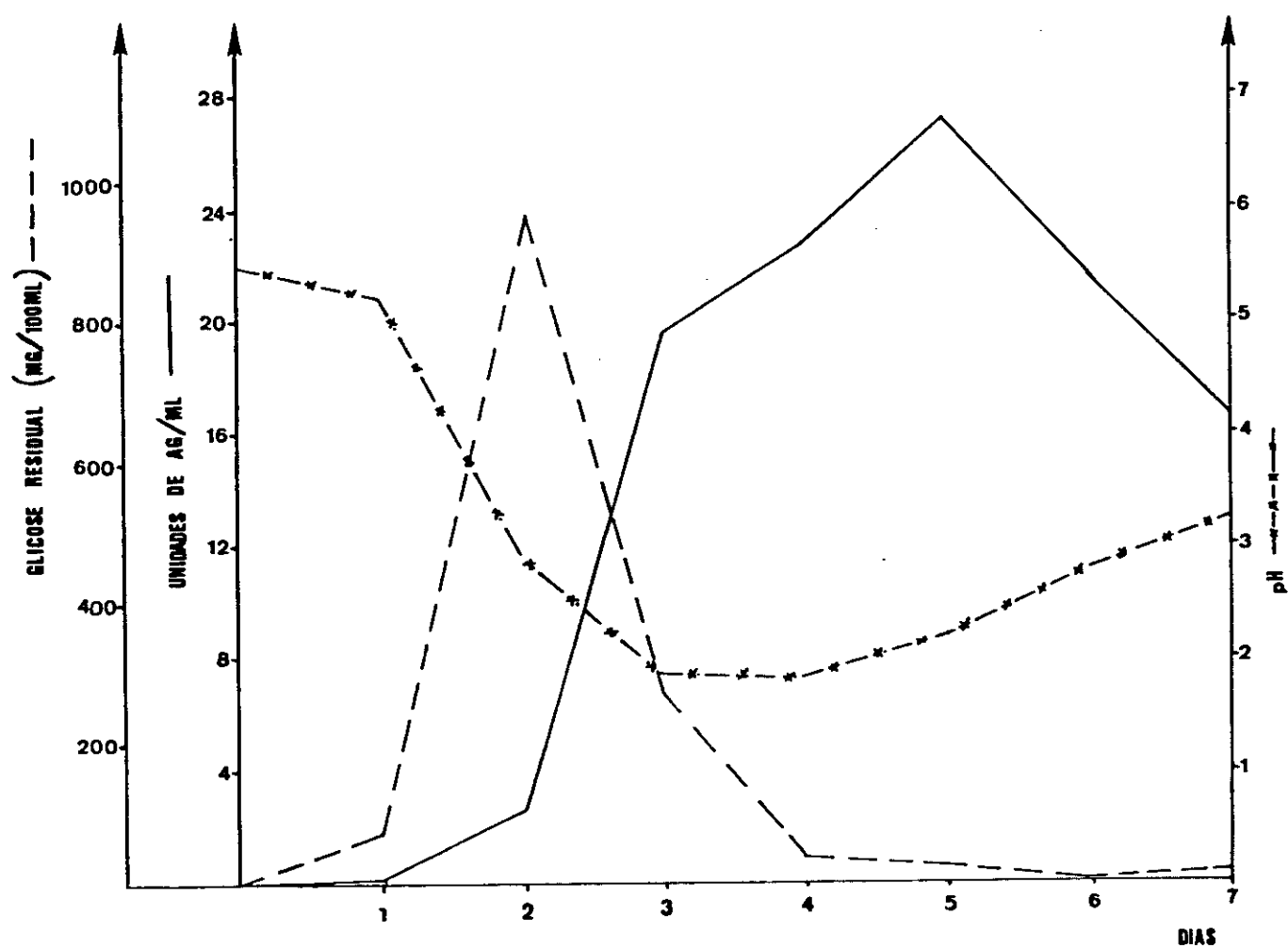


FIGURA 1 - Curva de acúmulo de amiloglicosidase, quantidade de GR e pH em função do tempo de incubação da linhagem pab₁fwn₁.

4.3 Indução de Mutantes para Produção de AG e Teste em Tubos de Ensaio

Após o tratamento da linhagem parental com o mutagênico conforme item 3.8., foram isoladas 95 colônias escolhidas ao acaso.

O teste da produção enzimática foi feito em tubos de ensaio, como descrito no item 3.9.2.1. utilizando-se as colônias selecionadas após tratamento e 10 repetições da linhagem parental, como controle. Os resultados obtidos estão na FIGURA 2.

A linhagem controle pab_1fwn_1 teve uma média de produção de Amiloglicosidase de 3,06 U/ml com variação de 1,2 a 6,0 U/ml. A média obtida para as colônias que receberam tratamento com mutagênico foi de 3,83 U/ml com variação de 0,47 a 8,6 U/ml.

As 33 colônias que apresentaram no mínimo 2 unidades de diferença da média de produção de AG do controle, foram testadas com 5 repetições em frascos Erlenmeyer (dados não mostrados). Entre as 95 colônias selecionadas, 2,1% mostraram produção significativamente inferior à parental pab_1fwn_1 . Estas, que são denominadas **lap** (*low amyloglucosidase production* - VALENT, 1985), foram cedidas para utilização em trabalhos no mesmo laboratório.

Tendo em vista não terem sido detectadas colônias com aumento significativo na produção de enzima, foram feitos ensaios com diferentes tipos de frascos, na tentativa de encontrar um tipo de frasco que refletisse melhor o acúmulo de enzima na fase de pré-seleção (item 4.4).

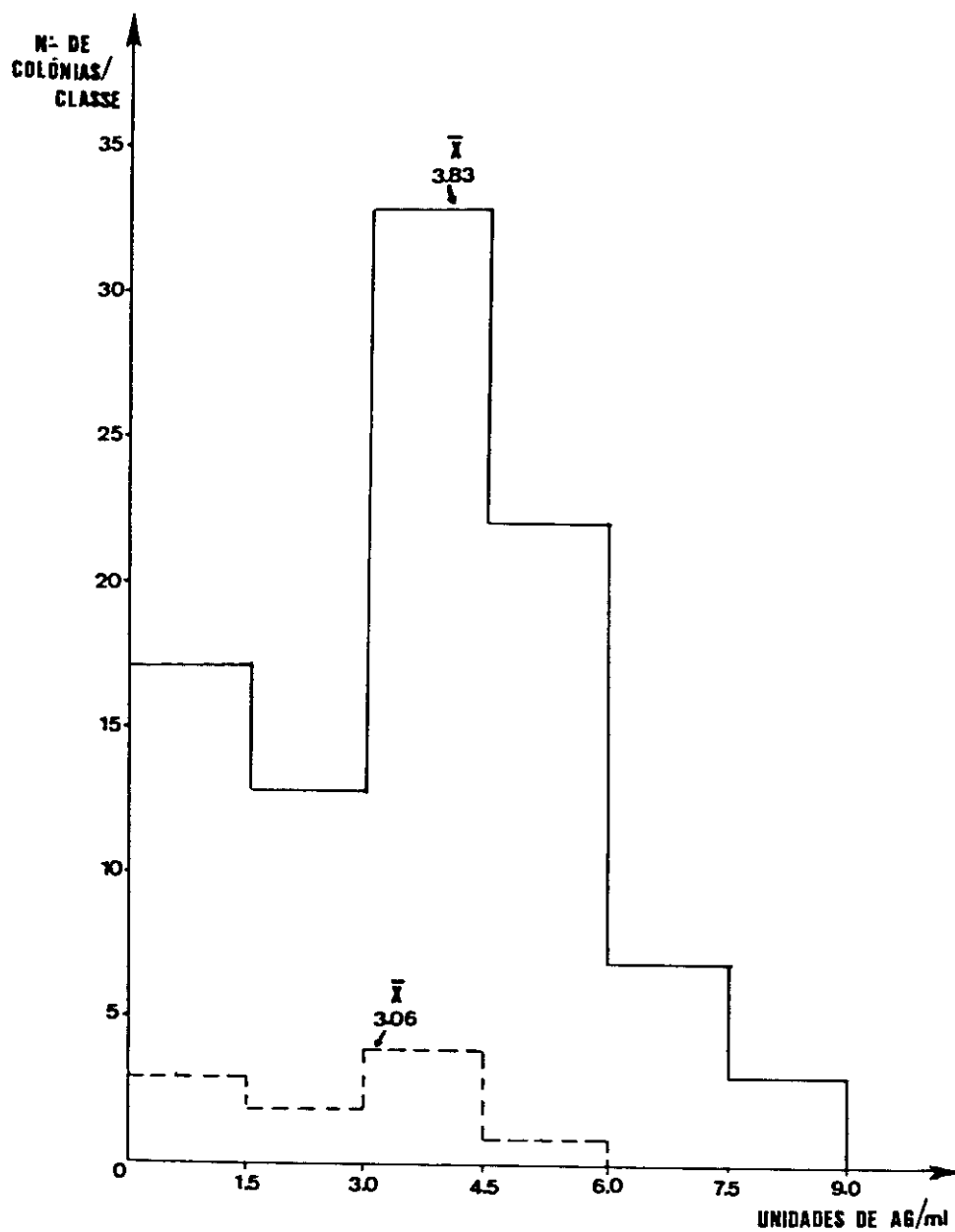


FIGURA 2 - Distribuição da Produção de Amiloglicosidase das Colônias Seleccionadas em Tubos de Ensaio Comparadas com a Parental pab_1fwn_1 .

— Colônias sobreviventes à irradiação com LUV.

- - - Repetições da parental pab_1fwn_1 .

4.4 Curva de Acúmulo de AG em Diferentes Tipos de Frascos

Visando isolar colônias com produção de Amiloglicosidase significativamente superior à parental, fez-se um ensaio com diferentes tipos de frascos, medindo-se a produção da enzima (U/ml), glicose residual (mg/100 ml) e peso seco do micélio (mg), diariamente do 1^o ao 7^o ou 8^o dia de fermentação. Os resultados obtidos estão na TABELA 3 e FIGURAS 3, 4, 5 e 6.

A glicose residual em tubos de ensaio (Fa) atingiu seu pico máximo no 5^o dia o que não aconteceu com os outros três tipos de frascos (Fb, Fc e Fd) que atingiram o pico máximo no 2^o dia. Enquanto a quantidade de GR permaneceu constante em Fa, podemos observar uma queda significativa nos demais o que, coincide com um aumento na quantidade de amiloglicosidase.

Devido aos resultados obtidos na TABELA 3, foi escolhido o frasco Fb para os ensaios preliminares de seleção, por serem os que estavam disponíveis em maior quantidade no laboratório.

TABELA 3 - Acúmulo de AG, quantidade de GR e peso seco da linhagem pab₁fwn₁, em função do tempo de incubação, com diferentes tipos de frascos.

DIAS	TIPOS DE FRASCOS											
	Fa			Fb			Fc			Fd		
	AG U/ml	[GR] mg/100ml	PS mg	AG U/ml	[GR] mg/100ml	PS mg	AG U/ml	[GR] mg/100ml	PS mg	AG U/ml	[GR] mg/100ml	PS mg
1 ^o	0,1	87,2	3,3	0,2	56,0	5,5	-	-	-	0,2	49,8	51,4
2 ^o	1,4	301,1	5,6	3,4	484,6	22,6	3,6	447,7	25,6	1,4	510,8	126,9
3 ^o	4,2	339,4	7,0	13,4	166,9	34,5	14,5	72,6	35,2	8,7	242,8	160,9
4 ^o	1,6	424,0	6,7	15,3	21,6	34,2	15,8	6,3	28,7	9,0	29,0	165,5
5 ^o	1,6	513,5	11,9	16,8	24,7	30,7	16,2	10,1	31,6	11,7	6,4	159,4
6 ^o	4,4	460,0	10,1	22,6	10,9	27,8	22,2	7,9	27,2	15,6	10,4	170,0
7 ^o	6,3	442,5	10,8	16,2	6,8	23,8	-	-	-	21,2	6,8	118,0
8 ^o	3,4	396,1	12,1	24,8	36,1	23,9	-	-	-	20,4	8,5	112,7

Fa = tubos de ensaio

Fb = frascos de 30 ml (fundo redondo)

Fc = frascos de 30 ml (fundo quadrado)

Fd = frascos Erlenmeyer de 125 ml

AG = Amiloglicosidase

GR = Glicose Residual

PS = Peso Seco do micélio

- = Não determinado

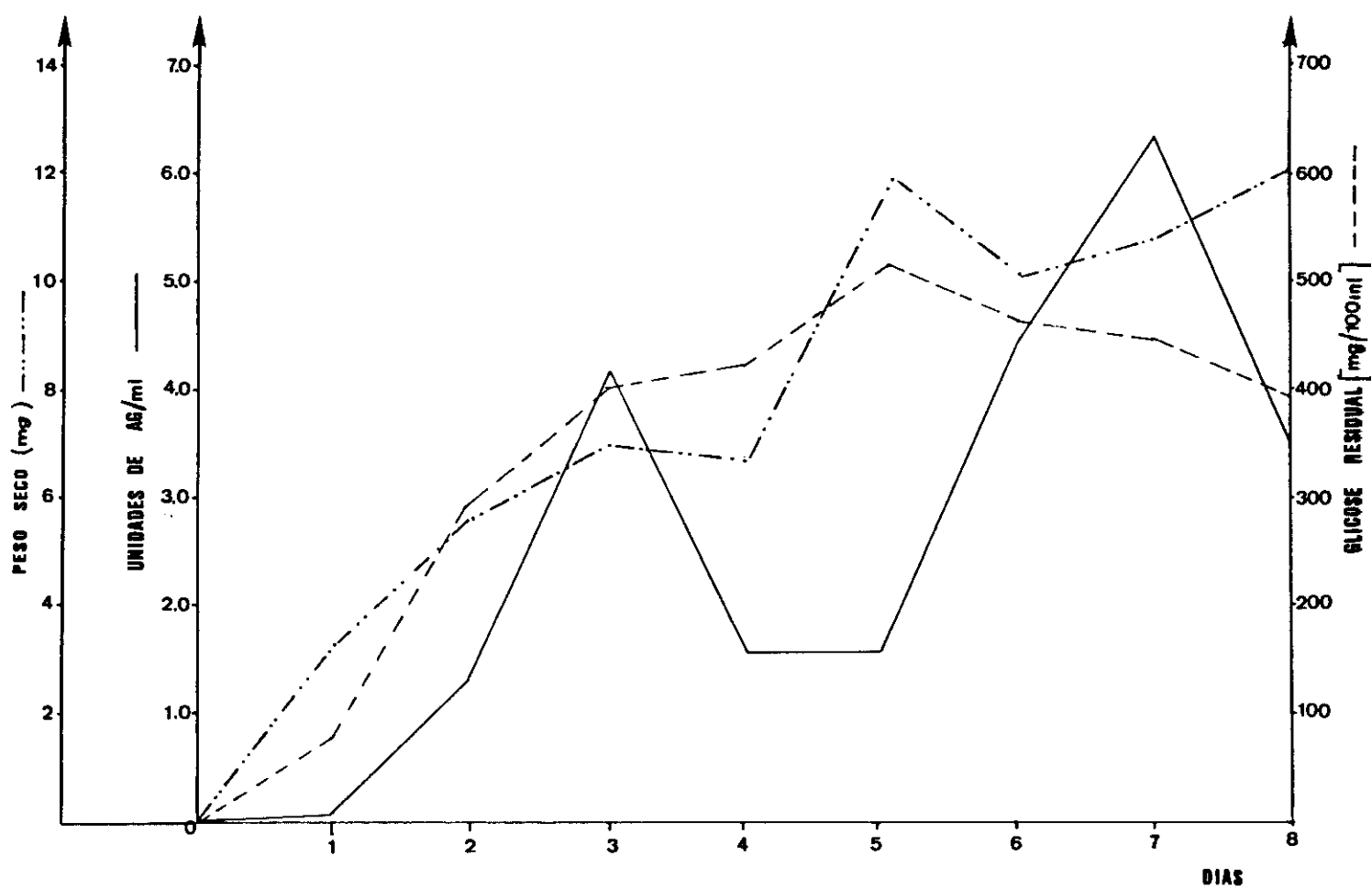


FIGURA 3 - Curva de acúmulo de AG, quantidade de GR e peso seco, em função do tempo de incubação da linhagem pab₁fwn₁, observada em ensaio realizado com tubos de ensaio (Fa).

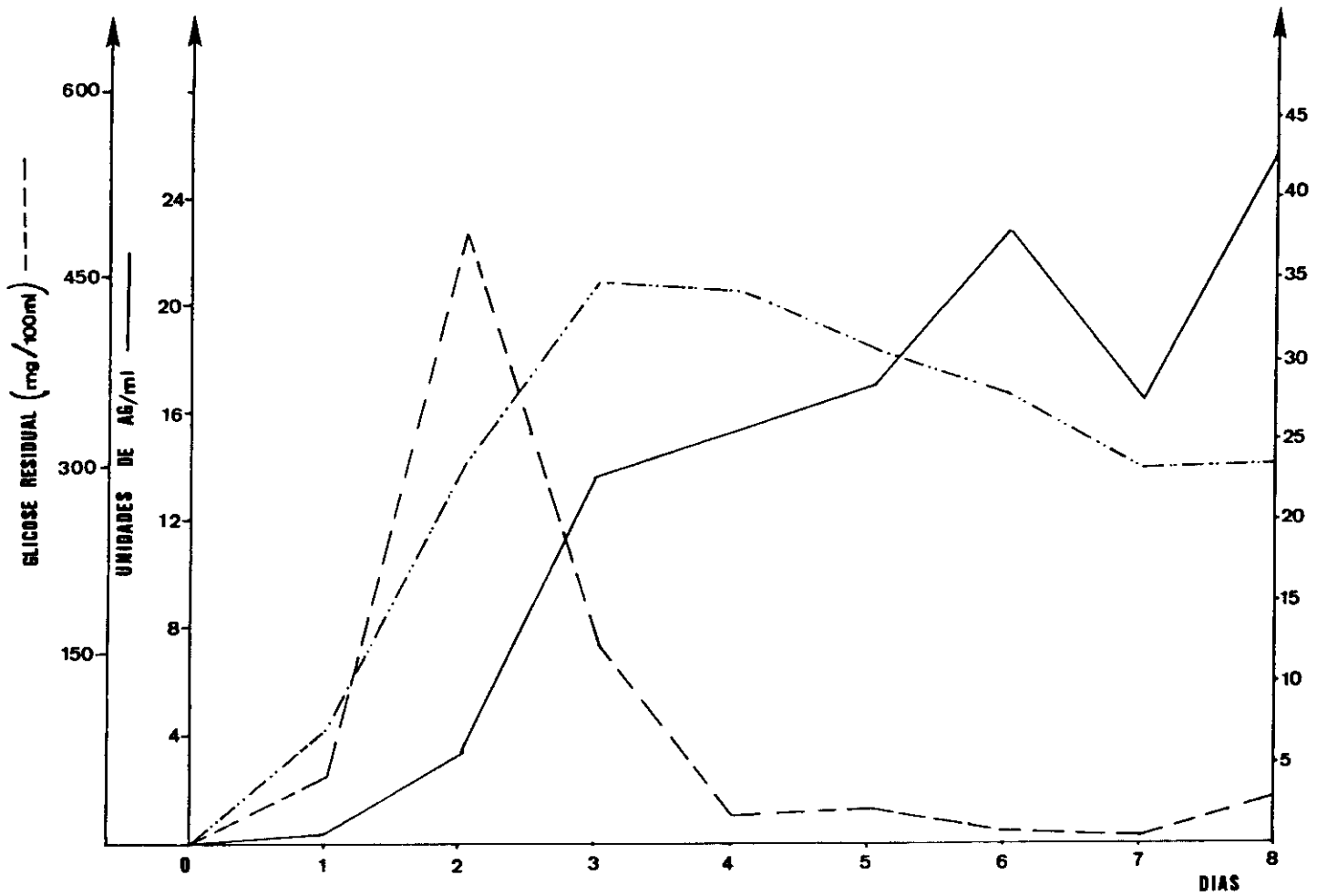


FIGURA 4 - Curva de acúmulo de AG, quantidade de GR e peso seco, em função do tempo de incubação da linhagem pab₁fwn₁, observada em ensaio realizado com frasco de 30 ml (Fb).

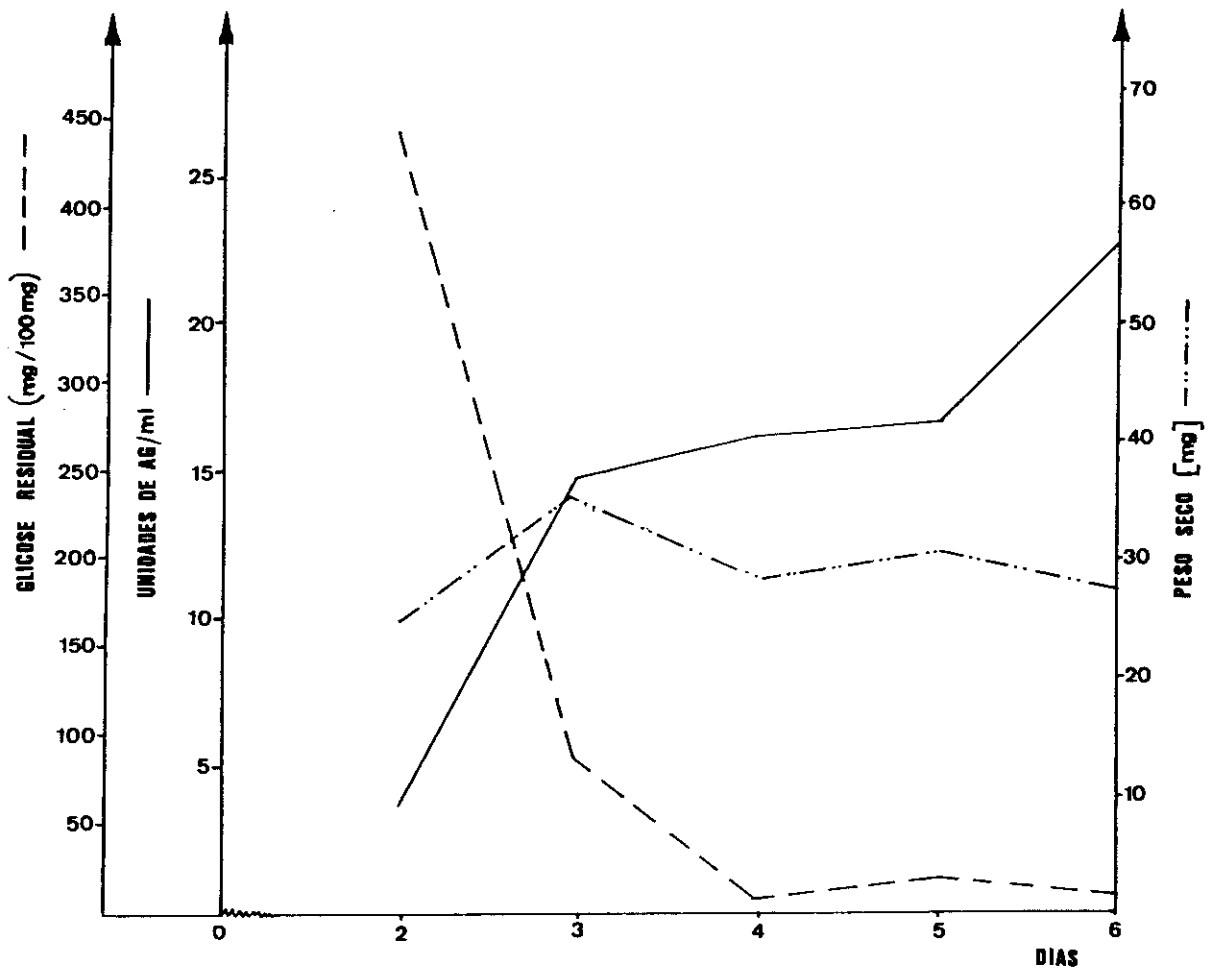


FIGURA 5 Curva de acúmulo de AG, quantidade de GR e peso seco, em função do tempo de incubação da linhagem pab₁fw₁, observada em ensaio realizado em frasco de 30ml (Fc).

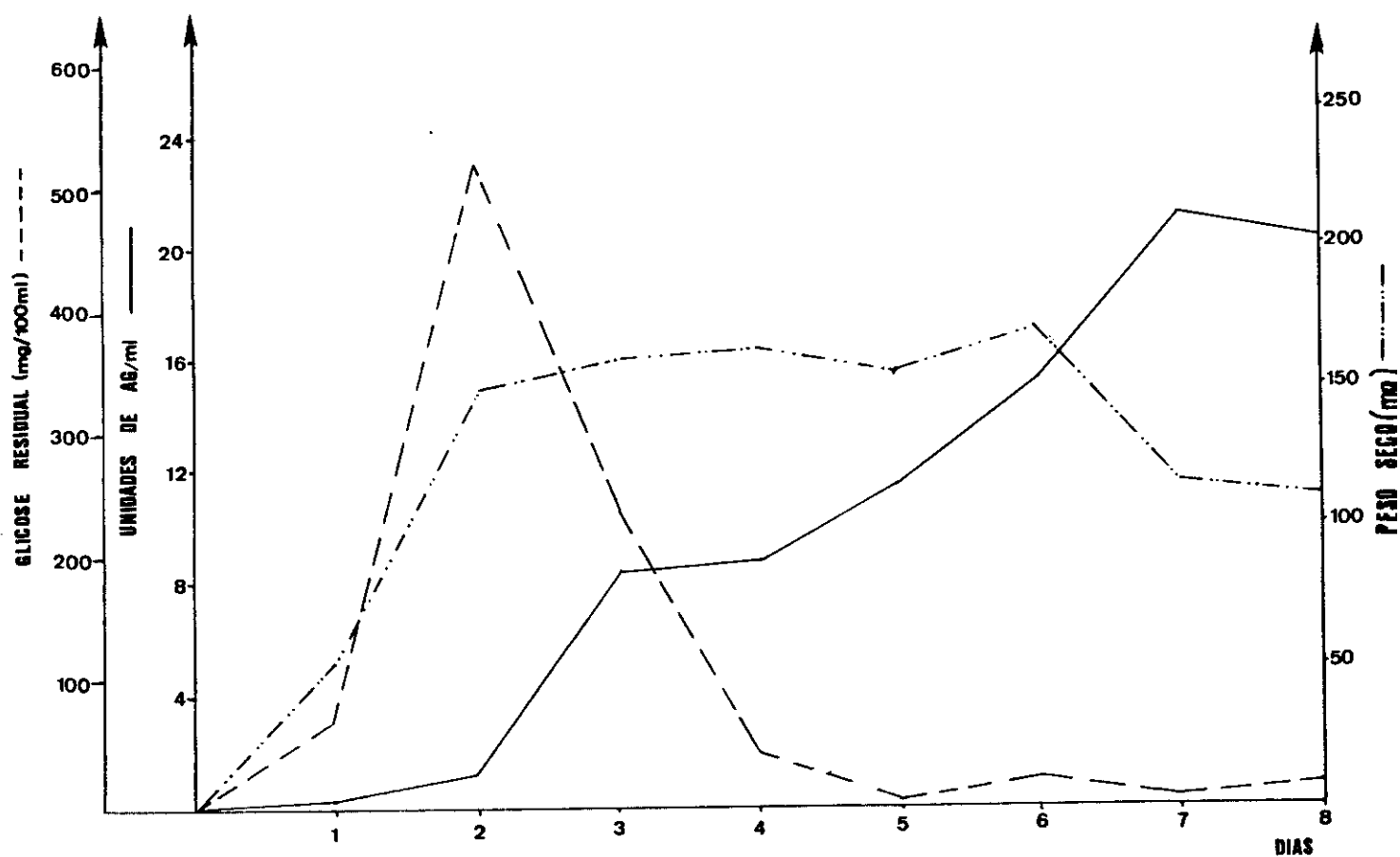


FIGURA 6 Curva de acúmulo de AG, quantidade de GR e peso seco, em função do tempo de incubação da linhagem pab₁fwn₁, observada em ensaio realizado com frasco Erlenmeyer (Fd).

4.5 Produção de AG em Frascos de 30 ml (Fb) Após Tratamento com Luz Ultravioleta

Como descrito no item 4.4., foi feito uma modificação no ensaio preliminar de seleção, utilizando-se para tanto, frascos de 30 ml (Frascos Fb - TABELA 3).

Após tratamento da linhagem parental *pab fwn* com mutagênico (item 3.8.), foram isoladas 156 colônias escolhidas ao acaso. O teste de produção enzimática foi feito conforme o item 3.9.1.1., utilizando-se as colônias selecionadas após tratamento e 24 repetições da linhagem *pab₁fwn₁*, como controle.

A linhagem controle teve uma média de produção em unidades de Amiloglicosidase de 14,5 U/ml apresentando uma variação de 3,5 U/ml a 20,2 U/ml. A média obtida entre as colônias irradiadas foi de 14,7 U/ml com variação de 0,3 U/ml a 23,0 U/ml (FIGURA 7).

Para a seleção de possíveis colônias com alta produção de AG, foram escolhidas, entre as sobreviventes ao tratamento com luz ultravioleta, aquelas que apresentaram um acúmulo de AG no mínimo de 4 Unidades maior que a média da parental *pab₁fwn₁*.

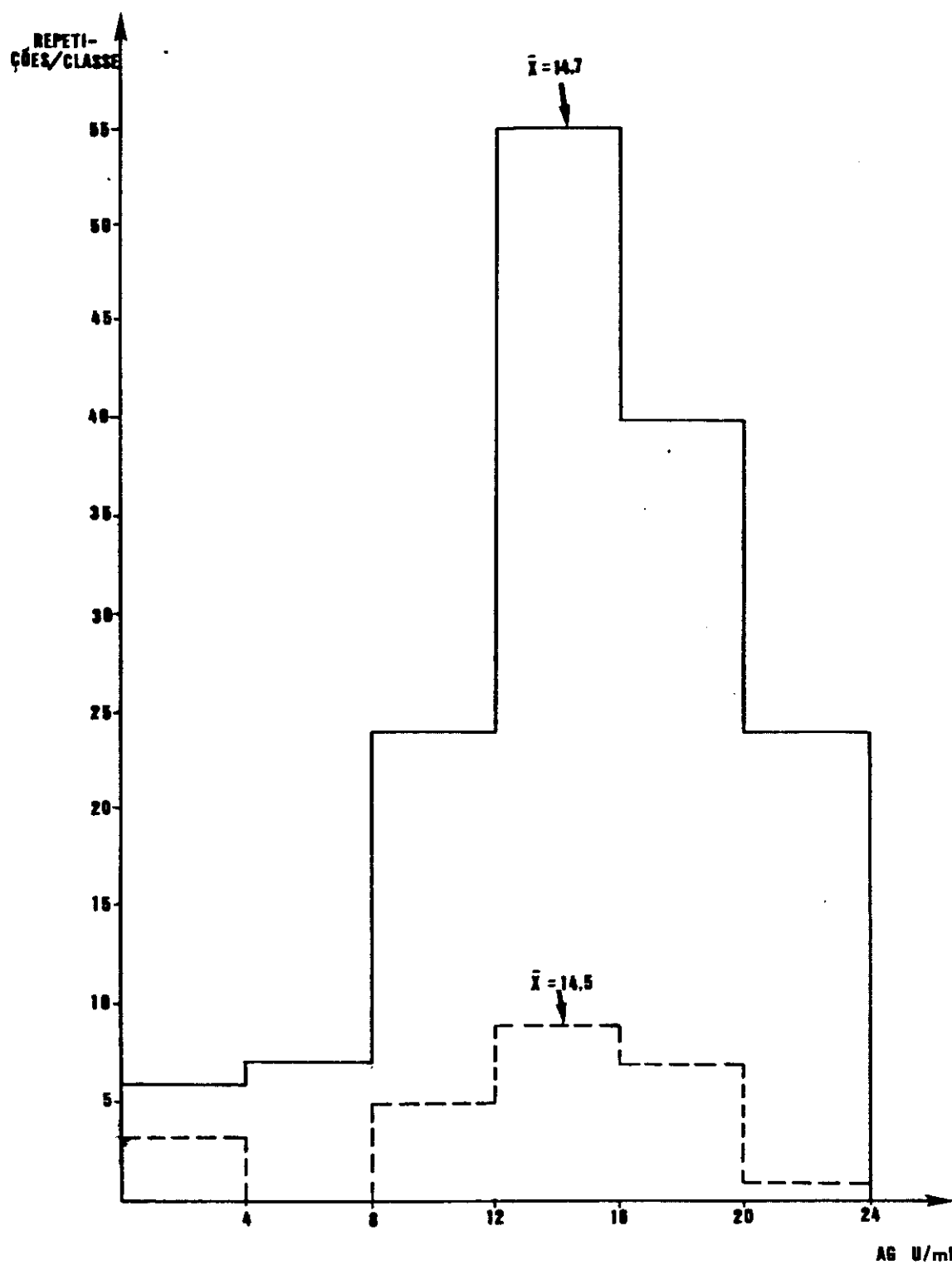


FIGURA 7 - Distribuição da Produção de Amiloglicosidase das Colônias selecionadas em Frascos de 30 ml (F2) Comparadas com a Parental pab₁fwn₁.
 — Colônias Sobreviventes à irradiação com LUV.
 - - - Repetições da parental pab₁fwn₁.

4.6 Teste em Erlenmeyer das Colônias Seleccionadas em Frascos Fb

Pelo teste descrito no item 4.5., foram seleccionadas 46 colônias que apresentaram um acúmulo de AG no mínimo de 4 U/ml maior que a média da parental, as quais foram ensaiadas com 5 repetições em frascos Erlenmeyer (item 3.9.1.2.).

Os resultados obtidos com 23 colônias relativos ao acúmulo de AG, as análises de variância e o teste de médias realizados se encontram no APÊNDICE DE TABELAS (TABELAS A1 a A27).

Foram isolados 4 mutantes cuja produção de AG mostrou-se significativamente superior à parental pab₁fwn₁, os quais foram denominados hap (*high amyloglucosidase production*) seguidos do número da colônia.

A TABELA 4 mostra um resumo dos mutantes seleccionados com a média de produção de cada um deles e a distribuição das repetições realizadas.

4.7 Teste para Verificar a Auxotrofia dos Mutantes hap

Os mutantes hap seleccionados conforme descrito no item 4.6. foram testados conforme descrito no item 3.12. Os resultados obtidos se encontram na TABELA 5 onde podemos verificar que nenhum mutante analisado, apresentou outra marca auxotrófica além da apresentada pela parental pab₁fwn₁.

TABELA 4 - Produção média de AG em U/ml dos mutantes selecionados e da parental pab₁fwn₁, e a distribuição das repetições em classes de 2 Unidades.

LINHAGENS	MÉDIA U/ml	UNIDADES DE AMILOGLICOSIDASE/ml										
		6,1	8,1	10,1	12,1	14,1	16,1	18,1	20,1	22,1	24,1	26,1
		a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
		8,0	10,0	12,0	14,0	16,0	18,0	20,0	22,0	24,0	26,0	28,0
<u>hap252</u>	20,4					1*	7	1	5	1		
<u>hap169</u>	17,5			1	3	2	5	4	4	1		
<u>hap112</u>	17,4					5	11	6				
<u>hap147</u>	14,4			3	3	4	5					
<u>pab₁fwn₁</u>	13,1	2	8	8	15	11	13	1				

* = n^o de repetições/classe

TABELA 5 - Análise do Crescimento dos Mutantes e da Linhagem pab₁fwn₁ em Diferentes Tipos de Meios de Cultura.

LINHAGENS	MEIOS DE CULTURA		
	MC	MM + <u>paba</u>	MM
<u>pab₁fwn₁</u>	+	+	-
<u>hap112</u>	+	+	-
<u>hap147</u>	+	+	-
<u>hap169</u>	+	+	-
<u>hap252</u>	+	+	-

Os sinais + e - significam crescimento e ausência de crescimento da colônia, respectivamente.

4.8 Quantificação da AG na Presença de um Inibidor

As medidas de AG utilizando-se um inibidor específico (item 3.3.6) foram feitas conforme descrito no item 3.13. Os resultados obtidos se encontram na TABELA 6.

A porcentagem de inibição observada nesse experimento variou de 80,4% na parental até 87,2% no mutante hap147.

4.9 Obtenção de Diplóides e sua Produção de AG

4.9.1 Obtenção e Caracterização de Diplóides

Os mutantes selecionados, que apresentaram maior acúmulo de enzima, foram cruzados com a linhagem mutante nic₁olv₃ (item 3.1.) de produção normal, para obtenção de diplóides (item 3.14.1.)

Os diplóides sintetizados foram caracterizados segundo os critérios propostos no item 3.15.2. e os resultados estão resumidos na TABELA 7.

TABELA 6 – Comparação da Atividade Enzimática dos Mutantes Selecionados e da Linhagem pab₁fwn₁ na Presença ou Ausência de Inibidor Específico para AG.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO (U/ml)		% DE INIBIÇÃO
	SEM INIBIDOR	COM INIBIDOR	
<u>pab₁fwn₁</u>	5,6	1,1	80,4
<u>hap112</u>	12,5	2,2	82,4
<u>hap147</u>	9,4	1,2	87,2
<u>hap169</u>	13,1	2,0	84,7

TABELA 7 – Características dos Diplóides e Respectivos Parentais.

LINHAGENS HAPLÓIDES	COLORAÇÃO COLÔNIAS	SEGREGAÇÃO EM BENLATE	MÉDIA DIÂMETRO CONÍDIOS* (μm)	RELACÃO $2n$ /PARENTAL
<u>nic₁olv₃</u>	verde oliva	-	4,81	
<u>hap112</u>	marron claro	-	5,05	
<u>hap147</u>	marron claro	-	4,84	
<u>hap169</u>	marron claro	-	5,07	
<u>hap252</u>	marron claro	-	4,69	
LINHAGENS DIPLÓIDES				
<u>hap112//nic₁olv₃</u>	preta	+	6,12	1,21 - 1,27
<u>hap147//nic₁olv₃</u>	preta	+	6,19	1,28 - 1,29
<u>hap169//nic₁olv₃</u>	preta	+	6,36	1,25 - 1,32
<u>hap252//nic₁olv₃</u>	preta	+	6,56	1,40 - 1,36

* para condições ver item 3.14.2.

4.9.2 Produção de AG dos Diplóides

Foi feito teste com 5 repetições em frascos Erlenmeyer (item 3.9.2.2.) com os diplóides obtidos, as linhagens parentais respectivas e o diplóide controle. Os resultados referentes a produção de AG, as análises de variância e os testes de médias se encontram nas TABELAS 8 a 16.

Pelo fato do mutante hap112 estar presente em dois testes realizados (TABELAS 10 e 13) assim como a linhagem parental pab fwn, a linhagem nic₁olv₃ e os diplóides hap112//nic₁olv₃ e pab₁fwn₁//nic₁olv₃, foi feita uma análise de variância tipo blocos casualizados, onde podemos verificar na TABELA 15 que a produção de AG do mutante hap112 difere significativamente da parental pab fwn, da linhagem nic₁olv₃, e do seu respectivo diplóide. Resultados similares foram observados com todos os mutantes (TABELAS 10, 13 e 18).

Quanto à produção dos diplóides, somente o hap252 // nic₁olv₃ e o pab₁fwn₁ // nic₁olv₃, diferem da linhagem pab₁fwn₁. Por outro lado, todos diferem da linhagem nic₁olv₃.

TABELA 8 – Produção de AG em U/ml dos diplóides hap112//nic₁olv₃, hap169//nic₁olv₃ e pab₁fwn₁//nic₁olv₃ e respectivos parentais.

LINHAGENS	REPETIÇÕES				
	I	II	III	IV	V
<u>pab₁fwn₁</u>	16,6	16,2	14,1	14,9	14,9
<u>nic₁olv₃</u>	13,3	12,9	11,8	13,0	9,9
<u>hap112</u>	16,2	19,1	19,1	18,1	16,2
<u>hap169</u>	21,9	19,6	20,7	19,6	21,3
<u>pab₁fwn₁//nic₁olv₃</u>	21,3	19,6	14,9	21,3	19,1
<u>hap112//nic₁olv₃</u>	19,1	15,3	13,7	14,9	14,9
<u>hap169//nic₁olv₃</u>	16,6	16,6	19,6	17,1	13,3

TABELA 9 - Análise de Variância dos Dados da TABELA 8.

CAUSA DA VARIACÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Tratamento	6	235,084	39,180	11,9**
Resíduo	28	92,092	3,289	
Total	34	327,176		

** - significativo à nível de 1%.

TABELA 10 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA 9.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ml)
<u>hap169</u>	20,6 a*
<u>pab₁fwn₁//nic₁olv₃</u>	19,3 a b
<u>hap112</u>	17,7 a b c
<u>hap169//nic₁olv₃</u>	16,6 b c
<u>hap112//nic₁olv₃</u>	15,6 c d
<u>pab₁fwn₁</u>	15,3 c d
<u>nic₁olv₃</u>	12,2 d

DMS 5% = 3,6

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

TABELA 11 - Produção de AG em U/ml dos diplóides hap112//nic₁olv₃, hap147//nic₁olv₃ e pab₁fwn₁//nic₁olv₃ e respectivos parentais.

LINHAGENS	REPETIÇÕES				
	I	II	III	IV	V
<u>pab₁fwn₁</u>	13,2	12,1	12,5	14,0	13,6
<u>nic₁olv₃</u>	9,9	10,2	9,9	9,6	11,1
<u>hap112</u>	14,8	17,4	16,1	18,4	18,0
<u>hap147</u>	14,8	16,1	14,4	17,4	17,9
<u>pab₁fwn₁//nic₁olv₃</u>	20,0	19,0	20,6	20,0	17,5
<u>hap112//nic₁olv₃</u>	14,0	14,4	16,5	14,4	14,8
<u>hap147//nic₁olv₃</u>	12,5	13,3	14,8	13,2	14,8

TABELA 12 - Análise de Variância dos Dados da TABELA 11.

CAUSA DA VARIACÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Tratamento	6	267,243	44,540	34,6**
Resíduo	28	36,064	1,288	
Total	34	303,307		

** - significativo à nível de 1%.

TABELA 13 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA 12.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ml)			
<u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃	19,1	a*		
<u>hap</u> ₁₁₂	16,9	a	b	
<u>hap</u> ₁₄₇	16,1		b	
<u>hap</u> ₁₁₂ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃	14,8		b	c
<u>hap</u> ₁₄₇ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃	13,7			c
<u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁	13,1			c
<u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃	10,1			d

DMS 5% = 2,3

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

TABELA 14 - Análise de Variância dos resultados obtidos do mutante hap112, linhagem pab₁fwn₁ e nic₁olv₃ e respectivos diplóides em dois ensaios (TABELAS 8 e 11).

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Ensaio	1	16,1314	16,1314	7,4 *
Linhagens	4	386,3068	96,5767	44,2 **
Ensaio x Linhagens	4	10,1668	2,5417	1,1 NS
Resíduo	40	87,3000	2,1825	
Total	49	499,9050		

* - significativo à nível de 5%

** - significativo à nível de 1%

NS - Não Significativo

TABELA 15 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey, dos dados da TABELA 14.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ml)	
<u>pab₁fwn₁</u> // <u>nic₁olv₃</u>	19,3	a*
<u>hap112</u>	17,3	b
<u>hap112</u> // <u>nic₁olv₃</u>	15,2	c
<u>pab₁fwn₁</u>	14,2	c
<u>nic₁olv₃</u>	11,6	d

DMS 5% = 1,9

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

TABELA 16 – Produção de AG em U/ml dos diplóides hap252//nic₁olv₃ e pab₁fwn₁//nic₁olv₃ e seus respectivos parentais.

LINHAGENS	REPETIÇÕES				
	I	II	III	IV	V
<u>pab₁fwn₁</u>	16,2	14,1	16,6	17,1	16,6
<u>nic₁olv₃</u>	12,2	13,7	12,6	11,9	14,1
<u>hap252</u>	23,9	23,2	24,6	21,9	23,9
<u>pab₁fwn₁//nic₁olv₃</u>	20,7	22,2	24,6	24,6	24,6
<u>hap252//nic₁olv₃</u>	21,3	19,1	22,5	17,1	19,6

TABELA 17 - Análise de Variância dos Dados da TABELA 16.

CAUSA DA VARIACÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Tratamento	4	426,573	106,643	48,8**
Resíduo	20	43,668	2,183	
Total	24	470,241		

** - significativo à nível de 1%.

TABELA 18 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA 17.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ml)
<u>hap252</u>	23,5 a*
<u>pab₁fwn₁</u> // <u>nic₁olv₃</u>	23,3 a
<u>hap252</u> // <u>nic₁olv₃</u>	19,9 b
<u>pab₁fwn₁</u>	16,1 c
<u>nic₁olv₃</u>	12,9 d

DMS 5% = 2,8

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

4.10 Obtenção de Segregantes e sua Produção de AG

4.10.1 Diplóide hap112//nic₁olv₃.

Os segregantes obtidos conforme metodologia descrita no item 3.16. foram testados quanto a produção da enzima, pelo método descrito no item 3.9., juntamente com 15 repetições de cada linhagem parental (hap112 e nic₁olv₃).

As marcas auxotróficas, morfológicas e produção de AG dos segregantes se encontram na TABELA 19. A TABELA 20 apresenta a produção de AG dos parentais hap112 e nic₁olv₃.

Como observa-se na TABELA 21, pelo teste estatístico de Kolmogorov - Smirnov, a produção de AG do mutante hap112 e da linhagem nic₁olv₃ é significativamente diferente. Outro dado evidente é que os segregantes obtidos desse diplóide são todos de alta produção pois, a comparação entre hap112 e segregantes é não significativa e a soma dos parentais é significativa (FIGURA 8).

Através dos dados da TABELA 19 foi feita análise mitótica (TABELA 22), mostrando que os genes nic, fwn, olv parecem estar no mesmo grupo de ligação.

Para verificação de possíveis ligações da marca hap112 com os genes marcadores, foi feito Teste de U (item 3.18.; TABELA 23), pelo qual podemos observar que não há diferença significativa entre a média dos segregantes com o alelo mutante e a média dos segregantes com o alelo selvagem em nenhum gene marcador, o que sugere que a marca hap112 esteja em outro grupo de ligação, que as marcas auxotróficas e morfológicas presentes nos parentais.

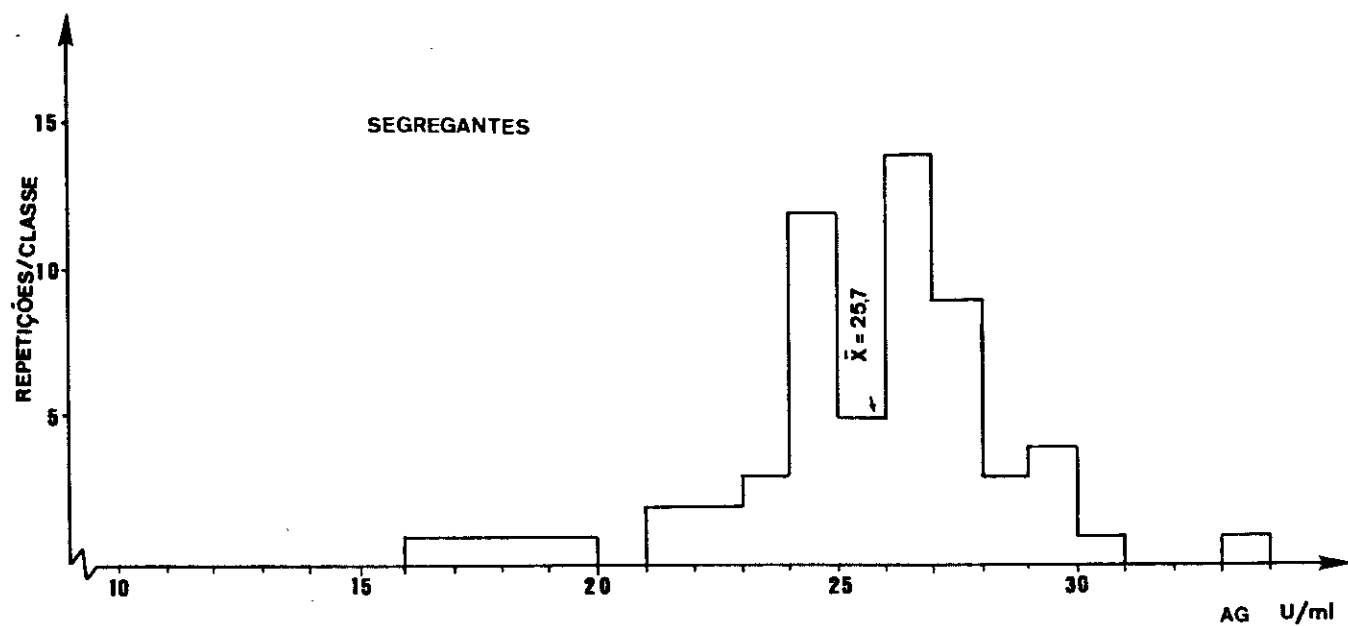
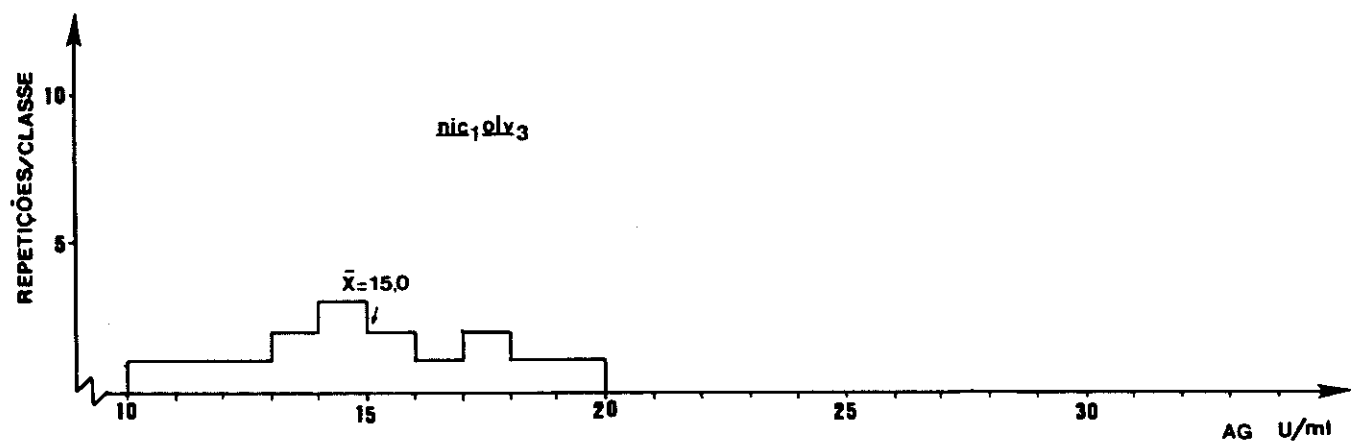
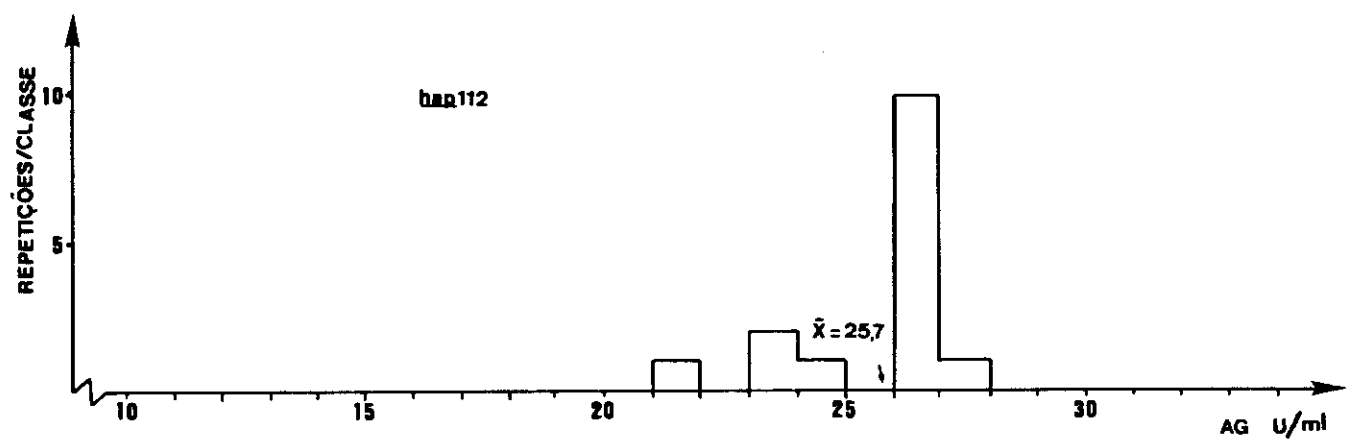


FIGURA 8 - Distribuição da Produção de AG dos Segregantes e Parentais do Diplóide hap112//nic1olv3.

TABELA 19 - Marcas Auxotróficas, Morfológicas e Produção de AG (U/ml) dos Segregantes do Diplóide hap112//nic1olv3.

SEGREGANTES	pab	nic	cor	U/ml	SEGREGANTES	pab	nic	cor	U/ml
01	+	+	<u>fwn</u>	24,6	31	+	-	<u>olv</u>	29,6
02	-	+	<u>fwn</u>	25,4	32	-	-	<u>olv</u>	21,7
03	+	+	<u>fwn</u>	23,9	33	-	-	<u>olv</u>	24,8
04	+	+	<u>fwn</u>	24,6	34	+	+	<u>olv</u>	30,5
05	+	+	<u>fwn</u>	26,9	35	+	-	<u>olv</u>	17,9
06	+	+	<u>fwn</u>	24,6	36	+	-	<u>olv</u>	22,9
07	+	+	<u>fwn</u>	33,7	37	+	-	<u>olv</u>	24,2
08	-	+	<u>fwn</u>	23,9	38	-	-	<u>olv</u>	27,1
09	-	+	<u>fwn</u>	26,1	39	+	+	<u>olv</u>	21,1
10	+	+	<u>fwn</u>	24,6	40	+	-	<u>olv</u>	25,6
11	+	+	<u>fwn</u>	26,9	41	-	-	<u>olv</u>	29,6
12	+	+	<u>fwn</u>	28,6	42	-	-	<u>olv</u>	24,8
13	-	+	<u>fwn</u>	26,9	43	-	-	<u>olv</u>	24,8
14	+	+	<u>fwn</u>	26,1	44	-	-	<u>olv</u>	18,9
15	+	+	<u>fwn</u>	27,8	45	-	-	<u>olv</u>	25,6
16	+	+	<u>fwn</u>	29,5	46	+	-	<u>olv</u>	26,3
17	+	+	<u>fwn</u>	26,1	47	+	-	<u>olv</u>	24,2
18	+	+	<u>fwn</u>	28,6	48	-	-	<u>olv</u>	22,9
19	+	+	<u>fwn</u>	26,9	49	+	-	<u>olv</u>	26,3
20	+	+	<u>fwn</u>	26,1	50	-	-	<u>olv</u>	27,9
21	+	+	<u>fwn</u>	27,8	51	+	-	<u>olv</u>	17,0
22	-	+	<u>fwn</u>	27,8	52	+	-	<u>olv</u>	27,9
23	+	+	<u>fwn</u>	26,1	53	+	-	<u>olv</u>	20,0
24	+	+	<u>fwn</u>	27,8	54	-	-	<u>olv</u>	24,8
25	-	+	<u>fwn</u>	23,3	55	-	-	<u>olv</u>	24,8
26	-	+	<u>fwn</u>	27,8	56	+	-	<u>olv</u>	24,2
27	-	+	<u>fwn</u>	28,6	57	-	-	<u>olv</u>	26,3
28	-	+	<u>fwn</u>	26,9	58	-	-	<u>olv</u>	25,6
29	+	+	<u>fwn</u>	26,9	59	-	-	<u>olv</u>	27,9
30	+	+	<u>fwn</u>	25,4	60	-	-	<u>olv</u>	29,6

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

TABELA 20 - Produção de AG (U/ml) dos Parentais do Diplóide hap112 // nic1olv3.

REPETIÇÕES	<u>hap112</u>	<u>nic1olv3</u>
1	21,3	12,6
2	26,1	19,6
3	26,9	14,5
4	26,9	16,2
5	26,1	15,3
6	26,9	15,3
7	26,9	10,9
8	23,9	13,7
9	24,6	18,6
10	26,1	14,9
11	27,7	11,9
12	23,9	13,3
13	26,1	14,1
14	26,9	17,1
15	26,9	17,1

TABELA 21 – Teste de KOLMOGOROV & SMIRNOV para os Segregantes do Diploide hap112//nic₁olv₃.

LINHAGENS	<u>hap112</u>	SEGREGANTES
<u>hap112</u>	-	0,3926 > 0,233 NS
<u>nic₁olv₃</u>	0,181 < 1,000 *	0,3926 < 0,934 *
<u>hap112</u> + <u>nic₁olv₃</u>	-	0,304 < 0,434 *

* significativo à nível de 5%.

NS - não significativo.

TABELA 22 - Análise Mitótica do Diploide hap112//nic₁olv₃.

PARENTAIS:

hap112 = pab- nic+ fwn- olv+

nic₁olv₃ = pab+ nic- fwn+ olv-

	<u>pab+</u>	<u>pab-</u>
<u>nic+</u>	23	9
<u>nic-</u>	13	15

	<u>olv+</u>	<u>olv-</u>
<u>nic+</u>	30	2
<u>nic-</u>	0	28

	<u>pab+</u>	<u>pab-</u>
<u>fwn+</u>	15	15
<u>fwn-</u>	21	9

TABELA 23 - Teste de U para verificação de possíveis ligações da marca hap 112 com os genes marcadores utilizados.

	Nº DE SEGREGANTE COM ALELO MUTANTE	MÉDIA UAG/ml	Nº DE SEGREGANTE COM ALELO SELVAGEM	MÉDIA UAG/ml	SIGNIFICÂNCIA
<u>pab</u>	25	25,8	35	25,7	0,060 NS
<u>nic</u>	28	24,7	32	26,6	1,618 NS
<u>fwn</u>	30	26,6	30	24,8	1,866 NS
<u>olv</u>	30	24,2	30	26,6	1,866 NS

NS - Não Significativo.

4.10.2 Diplóide hap147//nic₁olv₃.

Foram isolados 70 segregantes do diplóide hap147//nic₁olv₃ conforme metodologia descrita no item 3.16. que foram ensaiados quanto a produção de enzima em frascos de 30 ml de acordo com o método descrito no item 3.9., juntamente com 25 repetições de cada parental hap147 e nic₁olv₃.

As marcas auxotróficas, morfológicas e produção de AG dos segregantes se encontram na TABELA 24. A produção de AG dos parentais respectivos estão na TABELA 25.

A FIGURA 9 mostra a distribuição da produção de AG dos segregantes e as repetições de cada parental e o Teste de Kolmogorov-Smirnov apresentado na TABELA 26 confirma a diferença significativa existente entre hap147 e nic₁olv₃ assim como entre cada parental e os segregantes, porém, quando as repetições do mutante hap147 são somadas com às da nic₁olv₃, não difere dos segregantes.

Pela análise mitótica (TABELA 27) podemos verificar que os genes nic, fwn e olv se encontram no mesmo grupo de ligação.

Através do Teste de U (item 3.18.) apresentado na TABELA 28 pode-se sugerir que a marca hap147, esteja localizada no grupo de ligação que contém os genes nic, fwn, olv.

TABELA 24 - Marcas auxotróficas, morfológicas e produção de AG dos segregantes do diplóide hap147//nic₁olv₃.

SEGREGANTES	pab	nic	cor	U/ml	SEGREGANTES	pab	nic	cor	U/ml
1	+	+	<u>fwn</u>	19,6	36	+	+	<u>fwn</u>	19,0
2	+	+	<u>fwn</u>	17,5	37	+	+	<u>fwn</u>	18,5
3	+	+	<u>fwn</u>	17,5	38	+	+	<u>fwn</u>	17,5
4	+	+	<u>fwn</u>	17,5	39	+	-	<u>olv</u>	14,3
5	+	+	<u>fwn</u>	16,1	40	+	-	<u>olv</u>	15,1
6	+	+	<u>fwn</u>	18,5	41	-	-	<u>olv</u>	15,1
7	+	+	<u>fwn</u>	12,6	42	+	-	<u>olv</u>	17,8
8	+	+	<u>fwn</u>	15,3	43	-	-	<u>olv</u>	17,8
9	+	+	<u>fwn</u>	20,1	44	-	-	<u>olv</u>	14,6
10	+	+	<u>fwn</u>	21,8	45	-	-	<u>olv</u>	12,8
11	+	+	<u>fwn</u>	19,0	46	+	-	<u>olv</u>	12,8
12	+	+	<u>fwn</u>	19,5	47	+	-	<u>olv</u>	13,9
13	+	+	<u>fwn</u>	18,5	48	+	-	<u>olv</u>	14,3
14	+	+	<u>fwn</u>	17,0	49	+	-	<u>olv</u>	15,1
15	+	+	<u>fwn</u>	16,6	50	+	-	<u>olv</u>	14,7
16	+	+	<u>fwn</u>	16,6	51	+	-	<u>olv</u>	12,2
17	+	+	<u>fwn</u>	16,6	52	+	-	<u>olv</u>	8,5
18	+	+	<u>fwn</u>	15,7	53	+	-	<u>olv</u>	15,5
19	+	+	<u>fwn</u>	16,1	54	+	-	<u>olv</u>	15,5
20	+	+	<u>fwn</u>	13,7	55	+	-	<u>olv</u>	13,5
21	+	+	<u>fwn</u>	20,1	56	+	-	<u>olv</u>	13,6
22	+	+	<u>fwn</u>	16,6	57	+	-	<u>olv</u>	15,5
23	+	+	<u>fwn</u>	10,3	58	+	-	<u>olv</u>	15,9
24	+	+	<u>fwn</u>	16,1	59	+	-	<u>olv</u>	8,8
25	+	+	<u>fwn</u>	15,3	60	+	-	<u>olv</u>	15,5
26	+	+	<u>fwn</u>	21,2	61	+	-	<u>olv</u>	15,1
27	+	+	<u>fwn</u>	21,8	62	+	-	<u>olv</u>	15,1
28	+	-	<u>olv</u>	13,1	63	+	-	<u>olv</u>	15,9
29	+	-	<u>olv</u>	13,1	64	+	-	<u>olv</u>	18,8
30	+	-	<u>olv</u>	12,1	65	-	-	<u>olv</u>	16,8
31	+	-	<u>olv</u>	11,7	66	+	-	<u>olv</u>	15,5
32	+	-	<u>olv</u>	14,6	67	+	-	<u>olv</u>	15,9
33	+	-	<u>olv</u>	12,1	68	+	-	<u>olv</u>	16,3
34	+	-	<u>olv</u>	13,9	69	-	-	<u>olv</u>	13,9
35	+	-	<u>olv</u>	15,5	70	-	-	<u>olv</u>	8,2

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

TABELA 25 - Produção de AG (U/ml) dos Parentais do Diplóide hap147 // nic₁olv₃.

REPETIÇÕES	<u>hap147</u>	<u>nic₁olv₃</u>
1	17,8	13,1
2	15,1	13,9
3	16,4	11,4
4	16,4	14,6
5	19,9	13,5
6	16,4	12,1
7	20,5	11,8
8	18,3	13,1
9	23,5	12,8
10	19,4	12,8
11	21,0	11,1
12	16,9	14,3
13	17,3	12,8
14	17,8	14,3
15	17,3	11,7
16	15,5	10,5
17	17,3	10,5
18	16,9	13,2
19	16,0	9,3
20	16,9	12,1
21	16,0	12,1
22	16,9	8,8
23	19,4	9,3
24	15,1	12,8
25	19,9	12,9

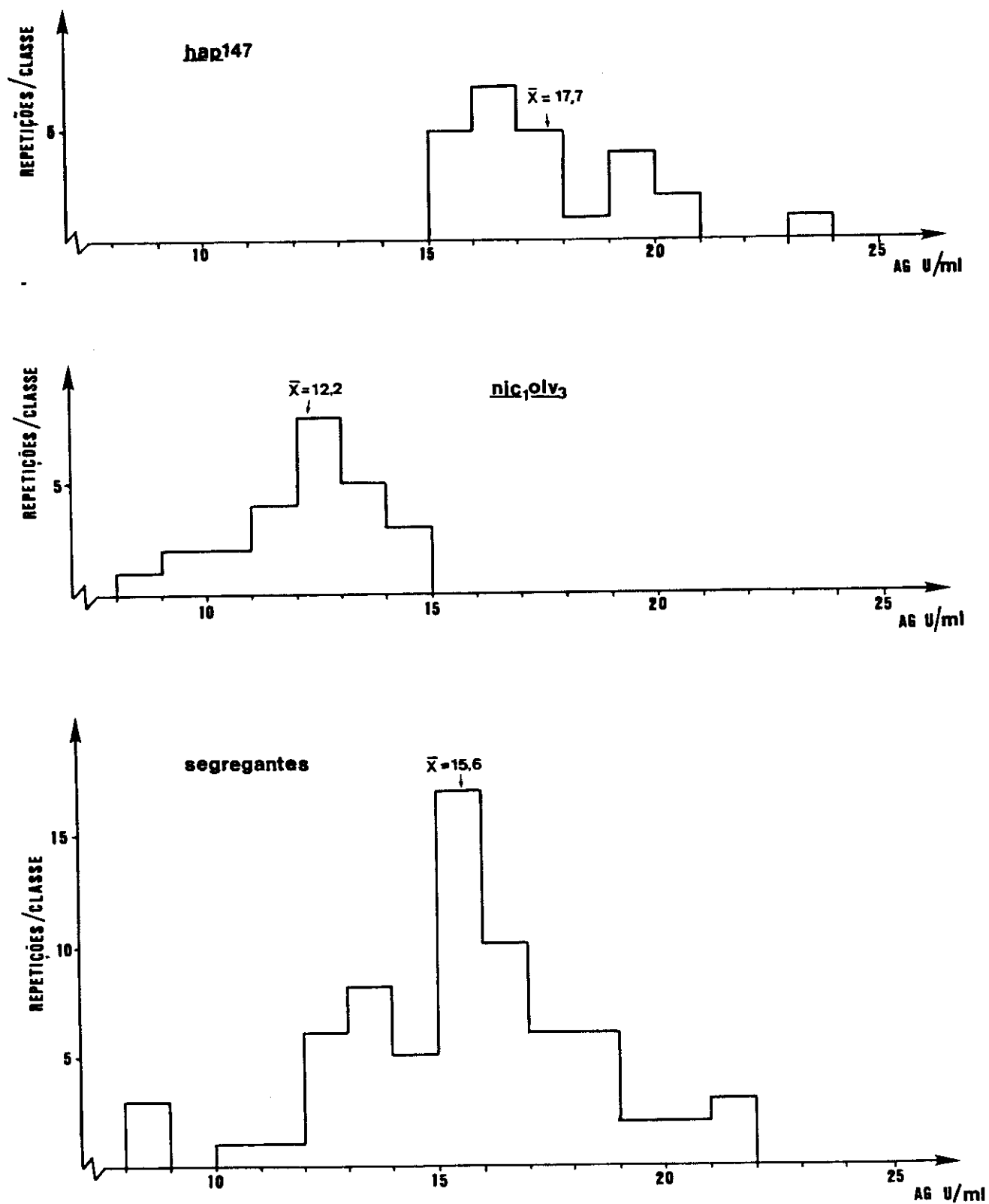


FIGURA 9 - Distribuição da Produção de AG dos Segregantes e Parentais do Diplóide hap147//nic₁olv₃.

TABELA 26 – Teste de KOLMOGOROV & SMIRNOV para os Segregantes do Diploide hap147//nic₁olv₃.

LINHAGENS	<u>hap147</u>	SEGREGANTES
<u>hap147</u>	-	0,317 > 0,386 *
<u>nic₁olv₃</u>	0,3844 < 1,000 *	0,317 < 0,609 *
<u>hap147 + nic₁olv₃</u>	-	0,252 > 0,183 NS

* - significativo à nível de 5%

NS - Não Significativo.

TABELA 27 – Análise Mitótica do Diploide hap147//nic₁olv₃.

PARENTAIS:

hap147 = pab- nic+ fwn- olv+

nic₁olv₃ = pab+ nic- fwn+ olv-

	<u>pab+</u>	<u>pab-</u>
<u>nic+</u>	30	0
<u>nic-</u>	40	1

	<u>fwn+</u>	<u>fwn-</u>
<u>pab+</u>	40	30
<u>pab-</u>	0	0

	<u>olv+</u>	<u>olv-</u>
<u>nic+</u>	30	0
<u>nic-</u>	0	40

TABELA 28 - Teste de U para verificação de possíveis ligações da marca hap 147 com os genes marcadores utilizados.

	Nº DE SEGREGANTE COM ALELO MUTANTE	MÉDIA UAG/ml	Nº DE SEGREGANTE COM ALELO SELVAGEM	MÉDIA UAG/ml	SIGNIFICÂNCIA
<u>nic</u>	40	14,3	30	17,4	4,94 *
<u>fwn</u>	30	17,4	40	14,3	4,49 *
<u>olv</u>	40	14,3	30	17,4	4,49 *

* - Significativo à nível de 5%.

4.10.3 Diplóide hap169//nic₁olv₃.

Os segregantes isolados conforme descrito no item 3.16. e 11 repetições de cada linhagem parental (hap169 e nic₁olv₃), foram testados quanto a produção de enzima em frascos de 30 ml pela metodologia descrita no item 3.9.

As marcas auxotróficas, morfológicas e produção de AG dos segregantes se encontram na TABELA 29 e a TABELA 30 apresenta a produção de AG dos parentais hap169 e nic₁olv₃.

A FIGURA 10 mostra um histograma da produção de AG dos segregantes e 11 repetições de cada linhagem parental. A TABELA 31 apresenta o Teste de Kolmogorov-Smirnov onde vemos confirmado que o mutante hap169 difere significativamente da nic₁olv₃ e, os segregantes desse diplóide tem uma distribuição de AG que difere significativamente de cada uma das parentais porém, quando as repetições do mutante hap169 são somadas com as repetições da nic₁olv₃, não difere da produção dos segregantes.

A TABELA 32 apresenta a análise mitótica feita com os dados da TABELA 29 na qual evidenciamos novamente a ligação dos genes nic, fwn, olv.

Na TABELA 33 observamos que a média de produção de AG dos segregantes com alelos selvagem difere significativamente da média de produção dos segregantes com alelo mutante indicando que a marca hap169 pode estar localizada no mesmo grupo de ligação que contém os genes nic, fwn e olv.

TABELA 29 -- Marcas Auxotróficas, Morfológicas e Produção de AG (U/ml) dos Segregantes do Diplóide hap169//nic₁olv₃.

SEGREGANTES	pab	nic	cor	U/ml	SEGREGANTES	pab	nic	cor	U/ml
01	-	+	<u>fwn</u>	17,2	31	-	-	<u>olv</u>	11,9
02	+	+	<u>fwn</u>	18,7	32	+	-	<u>olv</u>	15,4
03	+	+	<u>fwn</u>	13,8	33	+	-	<u>olv</u>	11,9
04	-	+	<u>fwn</u>	22,0	34	+	-	<u>olv</u>	15,8
05	+	+	<u>fwn</u>	15,8	35	+	-	<u>olv</u>	15,4
06	-	+	<u>fwn</u>	20,3	36	+	-	<u>olv</u>	19,2
07	-	+	<u>fwn</u>	20,8	37	+	-	<u>olv</u>	12,7
08	-	+	<u>fwn</u>	19,2	38	+	-	<u>olv</u>	12,7
09	+	+	<u>fwn</u>	12,7	39	-	-	<u>olv</u>	17,7
10	+	+	<u>fwn</u>	20,2	40	-	-	<u>olv</u>	10,6
11	+	+	<u>fwn</u>	19,2	41	-	-	<u>olv</u>	12,7
12	+	+	<u>fwn</u>	16,3	42	-	-	<u>olv</u>	15,4
13	+	+	<u>fwn</u>	17,2	43	+	-	<u>olv</u>	14,6
14	-	+	<u>fwn</u>	23,3	44	+	-	<u>olv</u>	N.D.
15	-	+	<u>fwn</u>	23,3	45	+	-	<u>olv</u>	15,8
16	-	+	<u>fwn</u>	20,7	46	-	-	<u>olv</u>	15,8
17	-	+	<u>fwn</u>	17,1	47	+	-	<u>olv</u>	16,3
18	+	+	<u>fwn</u>	19,1	48	+	-	<u>olv</u>	15,0
19	+	+	<u>fwn</u>	18,1	49	-	-	<u>olv</u>	16,3
20	+	+	<u>fwn</u>	21,9	50	-	-	<u>olv</u>	15,8
21	-	+	<u>fwn</u>	19,1	51	-	-	<u>olv</u>	15,4
22	-	+	<u>fwn</u>	20,7	52	+	-	<u>olv</u>	15,0
23	-	+	<u>fwn</u>	21,3	53	+	-	<u>olv</u>	16,7
24	-	+	<u>fwn</u>	23,9	54	+	-	<u>olv</u>	17,2
25	-	+	<u>fwn</u>	15,8	55	-	-	<u>olv</u>	14,2
26	+	+	<u>fwn</u>	18,1	56	+	-	<u>olv</u>	13,0
27	-	+	<u>fwn</u>	20,7	57	-	-	<u>olv</u>	13,1
28	-	+	<u>fwn</u>	20,7	58	+	-	<u>olv</u>	15,4
29	+	+	<u>fwn</u>	20,7	59	-	-	<u>olv</u>	13,4
30	-	+	<u>fwn</u>	19,1	60	+	-	<u>olv</u>	13,4

N.D. = Não Determinado.

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

TABELA 30 - Produção de AG (U/ml) dos Parentais do Diplóide hap169 // nic₁olv₃.

REPETIÇÕES	<u>hap169</u>	<u>nic₁olv₃</u>
1	16,3	13,4
2	23,3	16,7
3	20,8	16,3
4	24,6	14,6
5	18,6	13,4
6	22,0	11,9
7	22,0	11,6
8	22,0	15,8
9	23,9	13,4
10	16,3	15,4
11	19,2	12,7

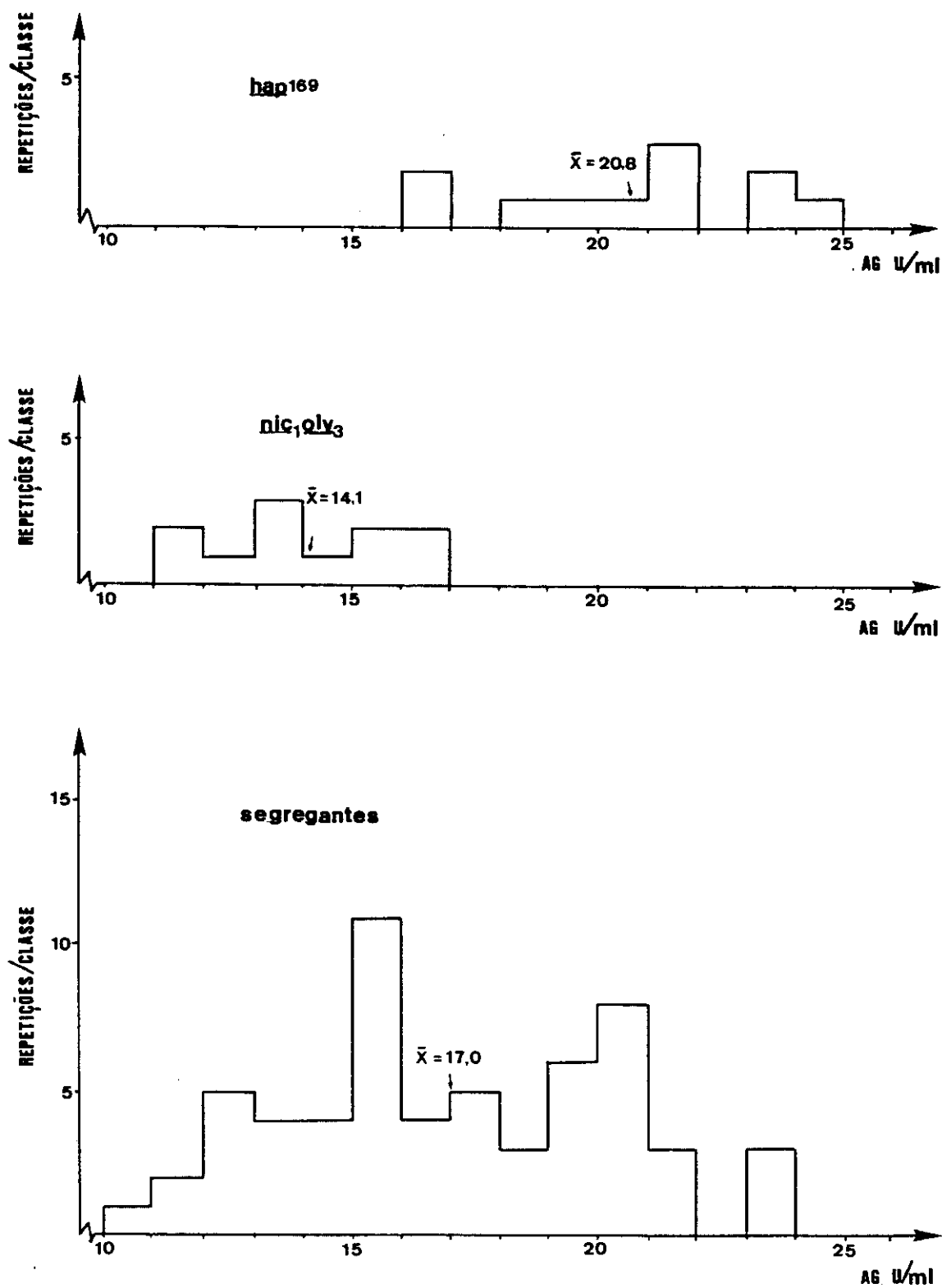


FIGURA 10 - Distribuição da Produção de AG dos Segregantes e Parentais do Diplóide hap169//nic1olv3.

TABELA 31 - Teste de KOLMOGOROV & SMIRNOV para os Segregantes do Diplóide hap169//nic₁olv₃.

LINHAGENS	<u>hap169</u>	SEGREGANTES
<u>hap169</u>	-	0,4466 < 0,4576 *
<u>nic₁olv₃</u>	0,5799 < 0,8182 *	0,4466 < 0,4746 *
<u>hap169</u> + <u>nic₁olv₃</u>	-	0,3397 > 0,1711 NS

* - significativo à nível de 5%.

NS - Não Significativo

TABELA 32 - Análise Mitótica do Diplóide hap169//nic₁olv₃.

PARENTAIS:

hap169 = pab- nic+ fwn- olv+

nic₁olv₃ = pab+ nic- fwn+ olv-

	<u>pab+</u>	<u>pab-</u>
<u>nic+</u>	13	17
<u>nic-</u>	18	12

	<u>olv+</u>	<u>olv-</u>
<u>nic+</u>	30	0
<u>nic-</u>	0	30

	<u>fwn+</u>	<u>fwn-</u>
<u>pab+</u>	18	13
<u>pab-</u>	12	17

TABELA 33 - Teste de U para verificação de possíveis ligações da marca hap 169 com os genes marcadores utilizados.

	Nº DE SEGREGANTE COM ALELO MUTANTE	MÉDIA UAG/ml	Nº DE SEGREGANTE COM ALELO SELVAGEM	MÉDIA UAG/ml	SIGNIFICÂNCIA
<u>pab</u>	29	17,8	30	16,3	1,896 NS
<u>nic</u>	29	14,7	30	19,2	5,390 †
<u>fwn</u>	30	19,2	29	14,7	5,390 †
<u>olv</u>	29	14,7	30	19,2	5,390 †

† - Significativo à nível de 5%.

NS - Não Significativo.

4.10.4 Diplóide hap252//nic₁olv₃.

Conforme descrito no item 3.16., foram isolados segregantes do diplóide hap252//nic₁olv₃ que juntamente com 15 repetições de cada linhagem parental foram testados quanto a produção de enzima, pelo método descrito no item 3.9.

Na TABELA 34 estão as marcas auxotróficas, morfológicas e produção de AG dos segregantes desse diplóide e, na TABELA 35 a produção de AG dos parentais respectivos.

A FIGURA 11 mostra a distribuição da produção de AG dos segregantes e as repetições de cada parental e o Teste de Kolmogorov-Smirnov (TABELA 36) confirma a diferença entre a linhagem hap252 e nic₁olv₃, e a diferença de cada parental com os segregantes.

A análise mitótica (TABELA 37) foi feita através dos dados da TABELA 34, sendo possível novamente evidenciar que os genes nic, fwn e olv se encontram no mesmo grupo de ligação.

A TABELA 38 que mostra o Teste de U (item 3.18.) feito para verificar possíveis ligações da marca hap252 com os genes marcadores, sugere ligação entre a marca hap252 e os genes nic, fwn, olv, devido a diferença significativa existente entre a média de produção dos segregantes fwn- e olv- (marrons e verdes, respectivamente) e também ligação com o gene pab, devido a diferença significativa entre a média de produção dos segregantes pab+ e pab-.

Em consequência desses resultados, foi feita Análise de Variância e Teste *t* de Student (item 3.18.) com os segregantes de fenótipos parentais e fenótipos recombinantes. Os resultados obtidos sugerem alteração em dois genes diferentes, um em cada grupo de ligação (TABELAS 39 e 40; FIGURA 12).

TABELA 34 - Marcas Auxotróficas, Morfológicas e Produção de AG (U/ml) dos Segregantes do Diplóide hap252//nic₁olv₃.

SEGREGANTES	pab	nic	cor	U/ml	SEGREGANTES	pab	nic	cor	U/ml
01	+	+	<u>fwn</u>	19,1	31	+	-	<u>olv</u>	11,9
02	+	+	<u>fwn</u>	19,1	32	-	-	<u>olv</u>	15,6
03	-	+	<u>fwn</u>	21,3	33	-	-	<u>olv</u>	11,9
04	+	+	<u>fwn</u>	20,2	34	+	-	<u>olv</u>	11,9
05	-	+	<u>fwn</u>	19,6	35	+	-	<u>olv</u>	11,2
06	+	+	<u>fwn</u>	20,0	36	+	-	<u>olv</u>	11,2
07	+	+	<u>fwn</u>	17,9	37	+	-	<u>olv</u>	11,5
08	+	+	<u>fwn</u>	19,5	38	+	-	<u>olv</u>	16,1
09	-	+	<u>fwn</u>	21,8	39	-	-	<u>olv</u>	18,4
10	-	+	<u>fwn</u>	19,5	40	-	-	<u>olv</u>	19,5
11	-	+	<u>fwn</u>	20,0	41	+	-	<u>olv</u>	17,9
12	-	+	<u>fwn</u>	21,8	42	+	-	<u>olv</u>	19,4
13	+	+	<u>fwn</u>	18,4	43	-	-	<u>olv</u>	20,5
14	-	+	<u>fwn</u>	21,2	44	+	-	<u>olv</u>	16,5
15	-	+	<u>fwn</u>	17,5	45	-	-	<u>olv</u>	18,4
16	-	+	<u>fwn</u>	21,8	46	+	-	<u>olv</u>	24,2
17	+	+	<u>fwn</u>	18,4	47	+	-	<u>olv</u>	21,7
18	+	+	<u>fwn</u>	16,1	48	+	-	<u>olv</u>	20,0
19	+	+	<u>fwn</u>	19,0	49	+	-	<u>olv</u>	19,4
20	+	+	<u>fwn</u>	22,4	50	-	-	<u>olv</u>	20,0
21	+	+	<u>fwn</u>	17,9	51	+	-	<u>olv</u>	22,9
22	+	+	<u>fwn</u>	18,4	52	+	-	<u>olv</u>	17,4
23	+	+	<u>fwn</u>	15,2	53	+	-	<u>olv</u>	21,7
24	-	+	<u>fwn</u>	20,0	54	+	-	<u>olv</u>	24,2
25	-	+	<u>fwn</u>	23,8	55	+	-	<u>olv</u>	17,4
26	+	+	<u>fwn</u>	18,4	56	+	-	<u>olv</u>	16,9
27	+	+	<u>fwn</u>	19,5	57	-	-	<u>olv</u>	19,9
28	-	+	<u>fwn</u>	21,2	58	+	-	<u>olv</u>	16,9
29	+	+	<u>fwn</u>	17,5	59	+	-	<u>olv</u>	14,7
30	+	+	<u>fwn</u>	17,5	60	-	-	<u>olv</u>	20,0

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

TABELA 35 - Produção de AG (U/ml) dos Parentais do Diplóide hap252//nic₁olv₃.

REPETIÇÕES	<u>hap252</u>	<u>nic₁olv₃</u>
1	23,2	14,9
2	23,2	8,8
3	21,3	10,6
4	21,3	15,8
5	23,9	8,5
6	19,1	15,3
7	24,6	13,7
8	26,1	12,3
9	20,7	14,1
10	21,9	11,2
11	21,9	11,9
12	22,5	11,6
13	23,9	11,0
14	21,3	11,5
15	23,2	12,3

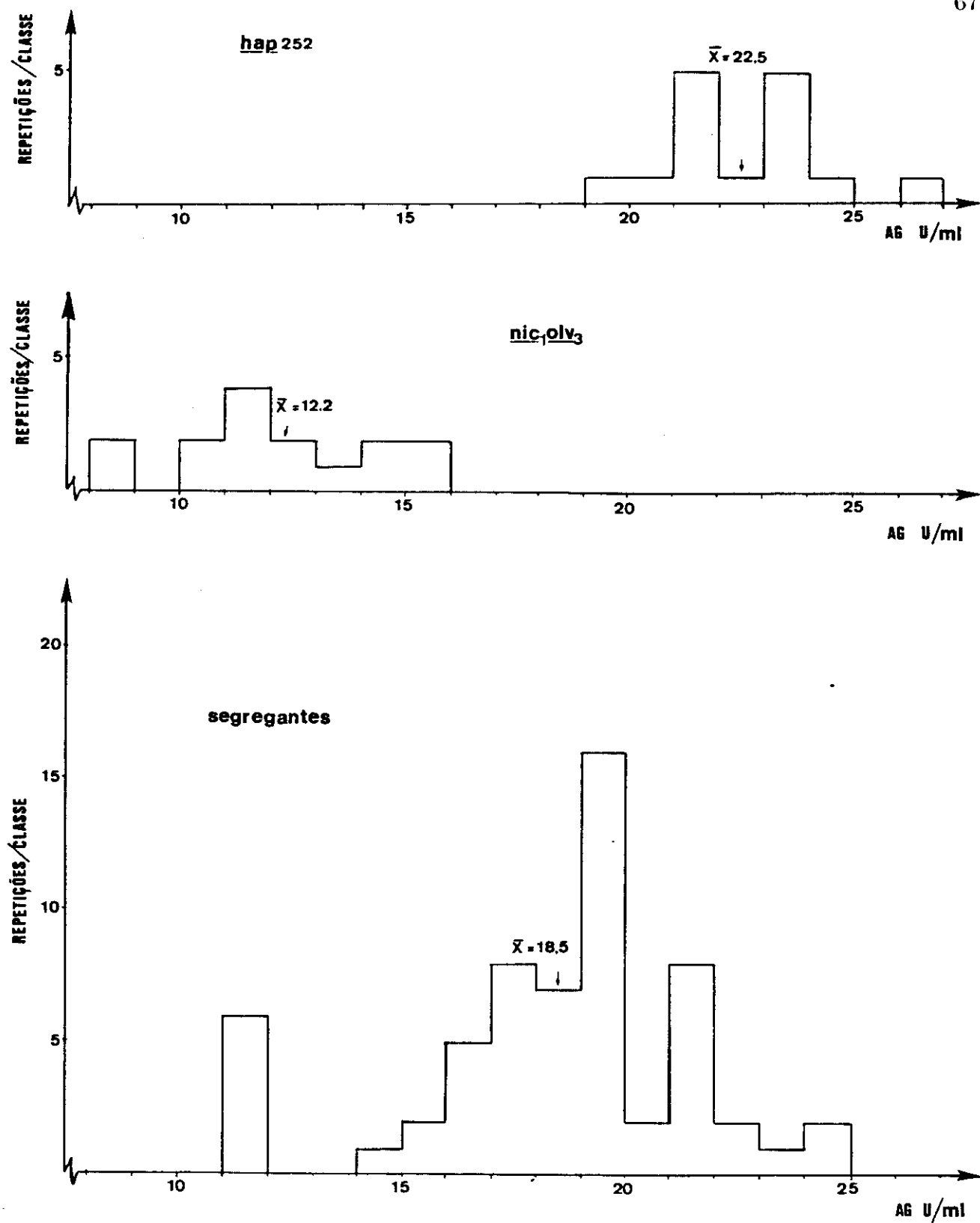


FIGURA 11 - Distribuição da Produção de AG dos Segregantes e Parentais do Diplóide hap252/nic₁olv₃.

TABELA 36 – Teste de KOLMOGOROV & SMIRNOV para os Segregantes do Diplóide hap252//nic₁olv₃.

LINHAGENS	<u>hap252</u>	SEGREGANTES
<u>hap252</u>	-	0,3926 < 0,6840 *
<u>nic₁olv₃</u>	0,4966 < 1,000*	0,3926 < 0,8500 *
<u>hap252</u> + <u>nic₁olv₃</u>	-	0,3041 < 0,3500 *

* - significativo à nível de 5%.

TABELA 37 – Análise Mitótica do Diplóide hap252//nic₁olv₃.

PARENTAIS:

hap252 = pab- nic+ fwn- olv+

nic₁olv₃ = pab+ nic- fwn+ olv-

	<u>pab+</u>	<u>pab-</u>
<u>nic+</u>	18	12
<u>nic-</u>	21	9

	<u>olv+</u>	<u>olv-</u>
<u>nic+</u>	30	0
<u>nic-</u>	0	30

	<u>fwn+</u>	<u>fwn-</u>
<u>pab+</u>	21	18
<u>pab-</u>	9	12

TABELA 38 - Teste de U para verificação de possíveis ligações da marca hap 252 com os genes marcadores utilizados.

	N ^o DE SEGREGANTE COM ALELO MUTANTE	MÉDIA UAG/ml	N ^o DE SEGREGANTE COM ALELO SELVAGEM	MÉDIA UAG/ml	SIGNIFICÂNCIA
<u>pab</u>	21	19,7	39	17,9	2,708 *
<u>nic</u>	30	17,6	30	19,4	1,962 *
<u>fwn</u>	30	19,4	30	17,6	1,962 *
<u>olv</u>	30	17,6	30	19,4	1,962 *

* - Significativo à nível de 5%.

TABELA 39 - Análise de Variância com os Dados da TABELA 34.

CAUSA DA VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Tratamento	3	89,860	29,953	3,42*
Resíduo	56	490,529	8,759	
Total	59	580,389		

* - significativo à nível de 5%.

TABELA 40 - Comparação das Médias pelo teste t de Student dos Dados da TABELA 39.

SEGREGANTES	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ml)	
<u>pab-</u> <u>fwn-</u>	20,8	a*
<u>pab+</u> <u>fwn-</u>	18,6	a b
<u>pab-</u> <u>fwn+</u>	18,2	a b
<u>pab+</u> <u>fwn+</u>	17,4	b

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

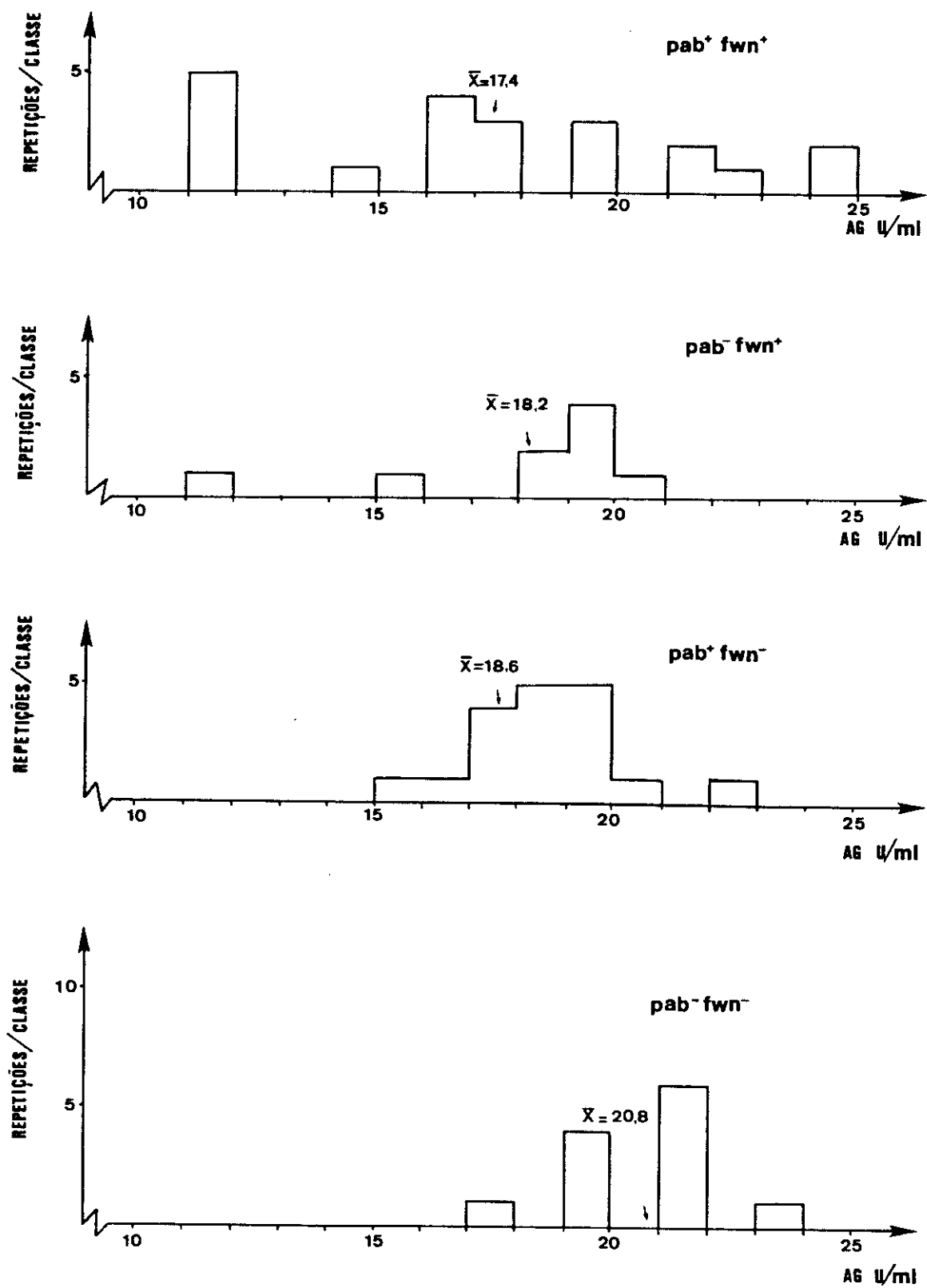


FIGURA 12 - Distribuição da Produção de AG dos Segregantes com fenótipos parentais e fenótipos recombinantes do Diplóide hap252/nic₁olv₃.

5 Discussão

5.1 Curvas de Acúmulo de Amiloglicosidase da linhagem pab₁fwn₁ de *Aspergillus niger*

Através das FIGURAS 1, 4, 5 e 6 observa-se que o pico máximo da glicose residual ocorreu no 2^o dia de fermentação, porém, quando o ensaio foi feito em tubos de ensaio (FIGURA 3), a glicose residual teve seu pico máximo no 5^o dia. Essa diferença poderia ser atribuída a uma melhor relação superfície/altura de meio, que deve existir nos demais tipos de frascos. Pode-se notar que o acúmulo da enzima começa a aumentar, quando a glicose residual diminui, e atinge um platô entre o 6^o e 7^o dia de fermentação, dependendo do tipo de frasco utilizado.

Pelos dados obtidos em relação ao acúmulo da enzima apresentados na TABELA 3, podemos observar que a produção de amiloglicosidase nos tubos de ensaio (Fa) é menor que nos ensaios feitos nos frascos Fb, Fc e Fd, devido provavelmente, ao fato da glicose residual permanecer alta durante todo o período de fermentação. Esses dados sugerem haver uma correlação negativa entre a glicose residual e a quantidade de enzima estimada em unidades. SINKAR e LEWIS (1982) relataram resultados similares quanto a esta possível correlação negativa entre a glicose residual e a quantidade de enzima.

Em *Aspergillus awamori* NRRL3112, PARK e DE LIMA (1972) e VIALTA (1987) observaram que o acúmulo da enzima atinge seu pico máximo em 72 horas de fermentação, permanecendo nessa faixa até 192 horas. CADMUS e col. (1966) observaram em *Aspergillus niger* NRRL337 que a fase exponencial de produção de amiloglicosidase ocorre em 96 horas e o platô ao redor de 168 horas. VALENT (1985) obteve resultados similares estudando a linhagem nic₁olv₃ de *Aspergillus niger*, derivada da mesma parental que a pab₁fwn₁. Devido os resultados obtidos nesse trabalho, foi escolhido para os ensaios de produção da enzima, o 4^o dia de fermentação, por representar aproximadamente a metade da fase exponencial.

Quanto ao peso seco do micélio, observa-se nas FIGURAS 4, 5 e 6 uma diminuição entre o 4^o e 5^o dia, dependendo do tipo de frasco, ocorrendo, provavelmente, uma autólise que parece estar relacionada com um novo aumento na quantidade de enzima presente no meio de cultura. Essa diminuição do peso seco do micélio foi também observada por SINKAR e LEWIS (1982) ao final da fermentação.

Quanto ao pH, que inicialmente é 5,5 (TABELA 2, FIGURA 1), o declínio máximo ocorreu no 4^o dia de fermentação e, em seguida, houve um ligeiro aumento. O pH ácido, observado nas fermentações realizadas, pode ser devido ao acúmulo de ácidos orgânicos, pois, a linhagem em estudo é um mutante obtido de uma linhagem utilizada industrialmente para produção de ácido cítrico (BONATELLI Jr. e col. 1982).

5.2 Obtenção de mutantes para produção de amiloglicosidase

Os ensaios realizados preliminarmente em tubos de ensaio (Fa) para obtenção de mutantes, permitiram isolar apenas colônias com produção de amiloglicosidase diminuída ou similar à parental pab₁fw_n₁, numa porcentagem de 2,1% para as linhagens de baixa produção. O fato da glicose residual apresentar-se alta durante todo o período de fermentação, poderia explicar a falta de relação entre os resultados obtidos em tubos de ensaio e os obtidos em frascos Erlenmeyer, onde o teste definitivo foi realizado. VALENT (1985) utilizando o mesmo método e a linhagem mutante nic₁olv₃ de *Aspergillus niger*, derivada da mesma parental, testou 268 colônias e selecionou apenas mutantes de baixa e média produção, numa porcentagem de 1,2% e 1,9%, respectivamente.

O fato de não ter sido possível isolar, através da metodologia com tubos de ensaio, mutantes com produção aumentada de amiloglicosidase, levou a uma modificação no método de pré-seleção, usando frascos de 30 ml (Fb), onde existe maior acúmulo da enzima (FIGURA 7). As colônias que mostraram no mínimo 4 Unidades de AG a mais que a parental pab₁fw_n₁, foram selecionadas para o teste em frascos Erlenmeyer. Dessa maneira, foi possível isolar mutantes que produziam significativamente mais enzima que a linhagem parental, além de mutantes com produção significativamente menor, numa porcentagem de 4,9% (TABELAS A1 a A27 do APÊNDICE DE TABELAS). As colônias com produção aumentada acumularam, de 10 a 60% mais enzima que a parental (TABELA 4), apesar da variação observada nas diferentes fermentações. A variação parece ser característica de todas as linhagens derivadas de 10V10 de *A. niger*, tendo em vista que outros mutantes obtidos por VALENT (1985), apresentaram o mesmo comportamento. LEWIS e SINKAR (1981), trabalhando com outra linhagem de *Aspergillus niger*, boa produtora de AG, sugerem que a influência do pH inicial, temperatura de incubação, presença de elementos traços no meio, podem estar relacionados com a causa de possível variação.

Nesse trabalho, a luz ultravioleta mostrou-se eficaz na indução de mutantes com produção alterada de amiloglicosidase. KVESITADZE e col. (1981b) trabalhando com *Aspergillus niger*, estudaram outros tipos de mutagênicos além da luz Ultravioleta, concluindo que a mesma é mais eficiente na indução de mutantes com produção diminuída de alfa-amilase estável em ácido.

Em *Aspergillus awamori* NRRL3122, PARK e DE SANTI (1977) utilizando nitrosoguanidina (NTG) como mutagênico, isolaram um mutante com o dobro de produção de AG em relação à parental. NEVALAINEN e PALVA (1979), trabalharam com a mesma linhagem e outros mutagênicos e isolaram após vários ciclos de mutação e seleção, um mutante que acumulava 2,5 vezes mais enzima que a parental NRRL3112.

5.3 Quantificação de AG na presença de um inibidor específico

A utilização do inibidor teve por objetivo avaliar se a metodologia utilizada para a medida da atividade enzimática refletia, pelo menos em parte substancial, a atividade da amiloglicosidase. O inibidor obtido de *Streptomyces* sp. n^o 280 por UEDA e KOBA (1973), inibe acentuadamente a amiloglicosidase obtida tanto de *Aspergillus* (MEDDA e col., 1981) como *Rhizopus*, entretanto, inibe apenas 8,3% da atividade de alfa-amilase de *Aspergillus* (UEDA e KOBA, 1973).

No presente trabalho usou-se amido como substrato e uma concentração de 20 µg/ml do inibidor. A porcentagem de inibição observada variou entre 80,4% na linhagem pab₁fwn₁ e 87,2% no mutante hap147 (TABELA 6), sugerindo que as medidas nas condições usadas, referem-se principalmente à amiloglicosidase e não a outras enzimas amilolíticas. Resultados similares foram encontrados por VALENT (1985) na linhagem nic₁olv₃ de *Aspergillus niger* usando 22,8 µg/ml do inibidor e VIALTA (1987) na linhagem NRRL3112 de *Aspergillus awamori* com 10 µg/ml do inibidor. Esses autores usaram ainda, além do amido, a dextrina limite como substrato, não encontrando diferenças significativas na porcentagem de inibição entre ambos.

5.4 Obtenção e caracterização dos diplóides

Os diplóides obtidos no presente trabalho se assemelham quanto à coloração de conídios à linhagem selvagem, apresentando, entretanto, diâmetro de conídios 1,2 a 1,4 vezes maior que o apresentado pelas linhagens parentais (TABELA 7), portanto, pode-se inferir que os conídios dos diplóides possuem o dobro do volume. Resultados similares quanto ao diâmetro de conídios maior nos diplóides foram obtidos por PONTECORVO e ROPER (1952) em *Aspergillus nidulans*, VIALTA (1987) em *Aspergillus awamori* e, em *Aspergillus niger* por PONTECORVO e col. (1953a), LHOAS (1967, 1968), CHANG e col. (1974), DAS e ROY (1978), BONATELLI Jr. e col. (1983).

Os diplóides, quando inoculados em meio completo mais Benlate, apresentam colônias reduzidas com formação de setores com conídios de coloração igual às respectivas parentais (UPSHALL e col., 1976; BRADSHAW e col., 1983; BONATELLI Jr., 1981, 1983; VALENT, 1985; VIALTA, 1987; MASIERO, 1988), comportamento este, também encontrado nos diplóides sintetizados neste trabalho.

Os diplóides hap169//nic₁olv₃ e hap252 // nic₁olv₃ segregaram todas as marcas auxotróficas e morfológicas presentes nas parentais, podendo portanto, serem classificados com sendo do tipo CS I. Os diplóides hap112//nic₁olv₃ e hap147//nic₁olv₃ podem ser classificados como do tipo CS II (BONATELLI Jr. e col., 1983) pois, do hap112//nic₁olv₃ não foram isolados setores com produção normal e, do hap147//nic₁olv₃ não foi recuperado nenhum segregante pab-, podendo ter ocorrido crossing-over ou não disjunção mitótica com perda de um dos alelos, ficando assim, o diplóide em homozigose para o outro.

5.5 Teste de interação alélica

Quando os mutantes com produção aumentada de AG, foram cruzados com a linhagem nic₁olv₃ de produção normal, os diplóides hap112//nic₁olv₃, hap147//nic₁olv₃ e hap169//nic₁olv₃ apresentaram produção que não diferiu significativamente da parental pab₁fwn₁ (TABELAS 10, 13 e 15) o que sugere que estes genes sejam recessivos. BALL e col. (1978) cruzando linhagem de *Aspergillus niger* que apresentava alta produção de AG com outra de baixa produção, obtiveram diplóide com produção intermediária às linhagens parentais. YAMASHITA e FUKUI (1984) e VALENT (1985) obtiveram mutantes de baixa produção de AG em *Saccharomyces diastaticus* e *Aspergillus niger*, respectivamente, e constataram, através de testes de interações alélicas, que as mutações induzidas eram recessivas. A marca de produção hap252 parece ser semi-dominante pois, o diplóide hap252//nic₁olv₃ apresentou produção intermediária entre o mutante hap252 e a linhagem pab₁fwn₁ (TABELA 18).

Em estudos realizados quanto à produção de penicilina, os diplóides heterozigotos estudados por SERMONTI (1969) e BALL (1973) em *Penicillium chrysogenum*, apresentaram produção menor, igual ou maior em relação à parental. Em *Aspergillus nidulans*, DITCHBURN e col. (1976) estudaram três mutações: pen-A1, pen-B2 e pen-C3. Essas mutações quando combinadas com seu alelo selvagem em um diplóide heterozigoto, mostraram recessividade (pen-A1), dominância (pen-B2) e semi-dominância (pen-C3).

5.6 Análise dos segregantes e mapeamento das marcas hap

Através da análise mitótica dos segregantes (TABELAS 22, 27, 32 e 37) foi confirmada a ligação dos genes nic, fwn e olv, anteriormente detectada por VALENT (1985) e MASIERO (1988)

Observa-se através das TABELAS 28, 31, 36 e FIGURAS 9, 10 e 11 que houve segregação da marca hap, pois a população dos segregantes tem uma distribuição de AG que difere significativamente de cada uma das respectivas parentais, porém quando as parentais são somadas, não há diferença com a produção dos segregantes, com exceção dos segregantes do diplóide hap252//nic₁olv₃. No caso do diplóide hap112//nic₁olv₃, observa-se através da TABELA 21 e FIGURA 8 que todos os segregantes obtidos apresentam alta produção, pois, não há diferença significativa quando se compara hap112 e segregantes. Esses resultados sugerem que a marca hap112 tenha sido favorecida durante o processo de haploidização induzida ou que o diplóide seja homozigoto para a marca. O resultado do teste de interação alélica (item 5.5) favorece a primeira hipótese pois, o diplóide heterozigoto teve produção normal. Porém, como o ensaio de produção e o isolamento dos segregantes não foi realizado com o mesmo repique do diplóide, não pode ser inteiramente descartada a hipótese da homozigose da marca hap112, que ter-se-ia estabelecido durante o processo de repicagens que as linhagens normalmente estão sujeitas. No caso acima relatado, envolvendo o diplóide hap252//nic₁olv₃, pode ter ocorrido também uma segregação preferencial da(s) marca(s) hap252 durante a indução de segregantes pelo Benlate.

Considerando que a característica de produção de AG é quantitativa, a classificação dos segregantes em hap+ e hap- fica difícil, o que diminui a confiabilidade da tentativa de mapeamento dos genes responsáveis pela característica de maneira como é usual na análise parassexual. A mesma observação foi relatada por VALENT (1985) quando estudou a segregação de genes que diminuem a produção de AG e, conseguiu mapear a marca lap61 com a utilização do teste proposto por MACDONALD e col. (1972) para estudar genes envolvidos na produção de penicilina em *Aspergillus nidulans* (item 3.17). Com este teste, pode-se sugerir que a marca hap112 esteja localizada em outro grupo de ligação que as marcas auxotróficas e morfológicas presentes nas parentais (TABELA 23). As marcas hap147 e hap169 parecem estar no grupo de ligação I que contém os genes nic, fwn e olv, devido a diferença significativa existente entre os segregantes verdes e marrons e os nic+ e nic-. Quanto à marca hap252 (TABELAS 39 e 40; FIGURA 12) houve alteração em dois grupos de ligação os quais, devem interagir, ocasionando produção significativamente superior às das linhagens parentais. Quando apenas um dos grupos alterados está presente no segregante, não existe diferença significativa com relação às parentais. Consequentemente, a linhagem hap252 deve apresentar duas alterações a nível gênico e, podemos designar as mutações como sendo hapA252 no grupo de ligação I que contém os genes nic, fwn, olv, e, hapB252 no grupo de ligação II que contém o gene pab (MASIERO, 1988).

Em relação às demais marcas, pode ser sugerido que a marca hap112 seja denominada hapC112 e, hap147 e hap169, devem aguardar testes de alelismo para que seja discriminado se são alterações no mesmo gene ou em genes diferentes. Tentativas para se obter segregantes adequados para o teste de alelismo foram feitas mas, resultaram na constatação de que há forte ligação entre as marcas de produção e os demais marcadores presentes no grupo de ligação I. Esta constatação deriva de testes feitos com 55 segregantes do diplóide hap147//nic₁olv₃ e 83 segregantes do hap169//nic₁olv₃ (CALIL, dados não publicados). Uma sugestão para trabalhos posteriores seria o uso de agentes que aumentem a frequência de recombinação mitótica por exemplo, 5-fluorouracil ou, isolamento de segregantes marrons (fwn-) que sejam pab+ e, portadores de genes localizados nos grupos de ligação III e/ou IV que recentemente foram identificados por MASIERO (1988). Isto possibilitaria o teste de alelismo entre hap147 e hap169.

Quanto à localização da marca hapC112, a sugestão seria utilizar as linhagens testadoras obtidas também por MASIERO (1988) o que permitiria estabelecer a ligação desta marca ou, a determinação da existência de mais um grupo de ligação pois, trabalhos com outras linhagens de *A. niger* indicam a existência de 6 grupos de ligação nesta espécie (LHOAS, 1967; TUYLL, 1977 e BOS, 1987). Outra sugestão seria combinar em linhagens haplóides as diferentes mutações visando estudar a interação gênica que possa ocorrer pois, existem relatos como o de BALL (1972) em *Penicillium chrysogenum* que observou aumento no acúmulo de penicilina em recombinantes portadores de duas mutações que aumentavam a produção isoladamente, e estavam localizadas em dois grupos de ligação diferentes.

De qualquer maneira, pode ser verificado que existem 4 a 5 genes diferentes envolvidos no aumento de produção de AG em *A. niger*, o que confirma observações de outros autores, que indicam ser necessários vários passos de tratamento com mutagênico para obtenção de linhagens com alta produção de metabólitos (NEVALAINEN e PALVA, 1979).

Tendo em vista que foi detectado apenas um gene estrutural responsável pelo acúmulo de AG (BOEL e col., 1984a,b), as mutações que alteram a produção, não devem estar localizadas apenas no gene estrutural. Consequentemente, a alta produção observada em linhagens industriais deve refletir a atuação em concerto de vários genes que atuam em passos diferentes do processo de produção. Isto está provavelmente relacionado com o fato da AG ser um produto extracelular o que envolveria maior eficiência, desde o processo de transcrição até o de exportação da enzima, para que se observe grande quantidade da mesma no meio de fermentação.

Estas sugestões poderiam ser avaliadas com os mutantes aqui descritos, o que implicaria em estudos da quantidade de RNA mensageiro, enzima extra e intracelular, entre outros aspectos.

6 Conclusões

- A luz ultravioleta como mutagênico, bem como o método de pré-seleção utilizados, mostraram-se eficazes na indução e seleção de mutantes com aumento na produção de amiloglicosidase na linhagem pab₁fw_n₁ de *Aspergillus niger*.
- A metodologia empregada para quantificação da enzima sugere que o aumento observado pode ser atribuído principalmente ao maior acúmulo de amiloglicosidase.
- Três dos quatro mutantes induzidos parecem ser recessivos (hap112, hap147 e hap169), e o outro, semi-dominante (hap252) em relação ao alelo selvagem de produção normal de amiloglicosidase.
- Através da análise dos segregantes pode ser evidenciada a ligação dos genes hap147 e hap169 com o grupo de ligação I, e que o gene hapC112 não está localizado nos grupos de ligação I ou II. No caso do mutante hap252, os resultados sugerem o envolvimento de 2 genes — hapA252, localizado no grupo de ligação I, e, hapB252, localizado no grupo de ligação II.
- As evidências disponíveis sugerem que existam, no mínimo, 4 a 5 genes que condicionam aumento na produção de amiloglicosidase na linhagem de *Aspergillus niger* utilizada neste trabalho.

7 Resumo

Este trabalho teve por objetivo o isolamento e análise genética de mutantes com aumento na produção da enzima amiloglicosidase (AG) na linhagem pab₁fwn₁ de *Aspergillus niger*.

O agente mutagênico utilizado foi a luz ultravioleta, que se mostrou eficaz na indução destes tipos de mutantes, os quais puderam ser isolados após modificação na metodologia utilizada por VALENT (1985). Os quatro mutantes selecionados exibiram cerca de 30% de aumento na produção, sendo esta diferença significativa nos vários testes realizados.

Testes usando inibidor específico para AG, revelaram que o aumento observado na produção, pode ser atribuído principalmente à amiloglicosidase. A denominação escolhida para os mutantes foi hap, a qual significa *high amyloglucosidase production*.

Os mutantes hap isolados — hap112, hap147, hap169 e hap252 — foram cruzados com a linhagem nic₁olv₃, que apresenta produção normal e marcas compatíveis, para obtenção de diplóides.

Os diplóides foram ensaiados quanto a produção da enzima, visando estabelecer o tipo de interação alélica dos genes hap. Os resultados mostraram que a marca de produção de AG presente em tres mutantes parece ser recessiva (hap112, hap147 e hap169) e em um mutante parece ser semi-dominante (hap252).

Visando o mapeamento dos genes hap, foram isolados segregantes destes diplóides e, após ensaios para verificar a produção de enzima e a caracterização das marcas auxotróficas, pode ser sugerido que os genes hap147 e hap169 estão no grupo de ligação I; o gene hap112 não pode ser mapeado e, no mutante hap252 foi observado que a característica de maior produção pode ser atribuída a duas mutações não alélicas e localizadas em dois grupos de ligação como se segue: hapA252 no grupo de ligação I e hapB252 no grupo de ligação II.

8 Summary

The aim of this work was the isolation and genetical analysis of mutants with increased amyloglucosidase production using the pab₁fwn₁ strain of *Aspergillus niger*.

The mutagenic used was ultraviolet light that showed efficiency in the induction of this type of mutant, which could be isolated after some modifications in the methodology used by VALENT (1985). Four mutants were selected with an increase of about 30% in production, being this difference significant in several tests realized.

Tests using AG specific inhibitor revealed that the observed increase in production can be attributed mainly to amyloglucosidase. The chosen denomination for the mutants was hap, which stands for high amyloglucosidase production.

The hap mutants isolated — hap112, hap147, hap169 and hap252 — were crossed with nic₁olv₃ strain that shows normal production and compatible markers for diploids isolation.

These diploids were assayed for enzyme production, aiming to establish the type of allelic interaction. The results showed that the AG production markers present in three mutants could be recessive (hap112, hap147 and hap169) and in a other mutant could be semi-dominant (hap252).

In order to map the hap genes, segregants of these diploids were isolated and, after assays to examine enzyme production and auxotrophic markers it can be suggested that the genes hap147 and hap169 are in the linkage group I; the gene hapC112 could not be mapped and the hap252 characteristic can be attributed to two non allelic genes located in two linkage groups as follows: hapA252 in the linkage group I and hapB252 in the linkage group II.

9 Referências Bibliográficas

- AZEVEDO, J. L., 1972. O ciclo parassexual em fungos. *Revista de Microbiologia*, 3: 157-68.
- AZEVEDO, J. L., 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopatologica*, 2: 3-15.
- AZEVEDO, J. L. e S. O. P. COSTA, 1973. *Exercícios práticos de Genética*. Editora Universidade de São Paulo (USP) - São Paulo, 288p.
- BAGALHI, E., 1987. Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP. 124p.(Tese de Mestrado).
- BALL, C., 1972. Genetics of penicillin in *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans*. In VANEK, Z.; Z. HOSTALEK e J. CUDLIN, ed. *Genetics of Industrial Microorganisms*, Amsterdam, Elsevier v.1.
- BALL, C.; A. J. LAURENCE; J. M. BUTLER e K. B. MORRISON, 1978. Improvement in amyloglucosidase production following genetic recombination of *Aspergillus niger* strains. *European Journal of Microbiology and Biotechnology*, 5: 95-102.
- BALL, C. e P. F. HAMLYN, 1982. Genetic recombination studies with *Cephalosporium acremonium* related to the production of the industrially important antibiotic cephalosporin C. *Revista Brasileira de Genética*, 5: 1-14.
- BANKS, G. T.; F. BINNS e R. L. CUTCLIFFE, 1976. Recent developments in the production and industrial applications of amylolytic enzymes derived from filamentous fungi. *Progress Industrial Microbiology*, 6: 95-139.
- BARACHO, I. R. e R. T. ROSIM, 1977. Tabela por la kalkulado de MD95, en Fungoj. *Scienca Revuo*, 28: 223-6.
- BARMAN, T. E., 1969. Enzyme Handbook. *Berlin Springer Verlag*. 2: 564-5.
- BENNET, J. W., 1979. Aflatoxins and anthraquinones from diploids of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of General Microbiology*, 113: 127-36.

- BOEL, E.; I. HJORT; B. SVENSSON; F. NORRIS; K. E. NORRIS e N. P. FIIL, 1984a. Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *The EMBO Journal*, 3: 1097-102.
- BOEL, E.; M. T. HANSEN; I. HJORT; I. HOEGH e N. P. FIIL, 1984b. Two different types of intervening sequences in the glucoamylase gene from *Aspergillus niger*. *The EMBO Journal*, 3: 1581-5.
- BONATELLI Jr., R., 1977. Estabilidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, ESALQ/USP. 126p. (Tese de Mestrado).
- BONATELLI Jr., R., 1981. Parassexualidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, ESALQ/USP. 91p. (Tese de Doutorado).
- BONATELLI Jr., R.; J. L. AZEVEDO e G. U. VALENT, 1982. Citric acid production by *Aspergillus niger* mutants. *Revista Brasileira de Genética*, 3: 483-92.
- BONATELLI Jr., R.; J. L. AZEVEDO e G. U. VALENT, 1983. Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. *Revista Brasileira de Genética*, 4: 399-405.
- BONATELLI Jr., R.; G. U. VALENT; A. VIALTA; M. MASIERO e M. R. CALIL, 1984. Genetics of amyloglucosidase production in *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori*. *Japan - Brazil Symposium on Science and Technology*, IV, Rio de Janeiro, 2: 34-40.
- BOS, C. J., 1985. Induced mutation and somatic recombination as tools for genetic analysis and breeding of imperfect fungi. Wageningen, Agricultural University Wageningen. 156p. (Tese de Doutorado).
- BOS, C. J., 1987. Mutant collection and master strains of *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics Newsletter*, 34: 27.
- BRADSHAW, R. E.; J. W. BENNET e J. F. PEBERDY, 1983. Parasexual analysis of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of General Microbiology* 129: 2117-23.
- CADMUS, M. C.; L. G. JAYKO; D. E. HENSLEY; H. GASDORF e K. L. SMILEY, 1966. Enzymatic production of glucose syrup from grains and its use in fermentation. *Cereal Chemistry*, 43: 658-69.
- CATEN, C. E. e J. L. JINKS, 1966. Heterokaryosis: its significance in wild homothalic ascomycetes and fungi imperfect. *Transactions of the British Mycological Society*, 49: 81-93.
- CATEN, C. E., 1981. Parasexual processes in fungi. In: GULL, K e S. G. OLIVER ed. *The fungal nucleus*. Cambridge University Press, 291p.
- CHANG, L. T. e C. A. TERRY, 1973. Intergenic complementation of gluco-amylase and citric acid production in two species of *Aspergillus*. *Applied Microbiology*, 25: 890-5.

- CHANG, L. T.; C. TERRY e R. W. TUVENSON, 1974. The influence of heterokaryotic conidia on the selective recovery of somatic diploids in *Aspergillus niger*. *Mycologia*, 66: 67-72.
- DAS, A., 1980. Parasexual hybridisation and citric acid production by *Aspergillus niger*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 9: 117-9.
- DAS, A. e P. ROY, 1978. Improved production of citric acid by a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 24: 622-5.
- DAVIS, R. H., 1966. Mechanisms of inheritance. 2 - Heterokaryosis. In: AINSWORTH, G. C. e A. S. SUSSMAN, ed. *The fungi*, N. Y. Academic. v.2 805p.
- DITCHBURN, P., G. HOLT e K. D. MACDONALD. 1976. The genetic location of mutation increasing penicillin yield in *Aspergillus nidulans*. In: MACDONALD, K. D. ed. *Proceedings of the International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms*, 2. New York, Academic. p. 213-27.
- DIXON, M. e E. C. WEBB, 1962. *Enzymes*. London, Longmans. 193p.
- EDWARDS, G. F. StL.; G. HOLT e K. D. MACDONALD, 1974. Mutants of *Aspergillus niger* impaired in penicillin biosynthesis. *Journal of General Microbiology*, 84: 420-2.
- FAITH, W. T.; C. E. NEUBECK e E. T. REESE, 1971. Production and applications of enzymes. *Advances Biochemical England*, 1: 77-111.
- FINCH, P. e P. A. LEONARD, 1978. Comparative studies on glucoamylases isolated from a strain of *Aspergillus*. *Starch*, 30: 341-5.
- FLEMING, I. D. e B. A. STONE, 1965. Fractionation of *Aspergillus niger* amyloglucosidase. *The Biochemical Journal*, 97: 13.
- FORBES, E., 1959. Use of mitotic segregation for assigning genes to linkage groups in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 13: 67-80.
- FUNGARO, M. H. P., 1984. Caracterização genética e dados citológicos em *Aspergillus niger* van Tieghem e *Aspergillus awamori* Nakazawa. Piracicaba, ESALQ/USP. 134p. (Tese de Mestrado).
- GOLUBTSOVA, V. M.; E. Ya. SHCHERBAKOVA; L. Ya. RUNNKOUSKAYA e V. P. ERMAKOVA, 1980. Change in the ratio of citric and oxalic acids in *Aspergillus niger* under the influence of mutagenic factors. *Microbiology*, 48: 867-71.
- GRATZNER, H. e N. SHEEMAN, 1969. *Neurospora* mutant exhibiting hyperproduction of amylase and invertase. *Journal of Bacteriology*, 97: 544-9.
- GRIGOROV, V. S. ; N. A. ZHEREBTSOV e V. V. SHCHEGOLEV, 1986. Ploidy determination in *Rhizopus pygmaeus* mutants and their glucoamylase biosynthesis at different temperatures. *Mikrobiologiya*, 55: 431-4.

- HASTIE, A. C., 1970. Benlate induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, 226: 771.
- HAYASHIDA, S. e P. Q. FLOR, 1981. Raw starch-digestive glucoamylase productivity of protease-less mutant from *Aspergillus awamori* var. Kawachi. *Agricultural Biological and Chemistry*, 45: 2675-81.
- HAYASHIDA, S. ; S. KUNISAKI; M. NAKAO e P. Q. FLOR, 1982. Evidence for raw-starch-affinity site on *Aspergillus awamori* glucoamylase I. *Agricultural Biological and Chemistry*, 46: 83-9.
- HEAGY, F. C. e J. A. ROPER, 1952. Deoxyribonucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus conidia*. *Nature*, 170: 713.
- HOLLIDAY, R., 1961. Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genetical Research*, 2: 231-48.
- HOLT, G. F.; StL. EDWARDS e K. D. MACDONALD, 1976. The genetics of mutants impaired in the biosynthesis of penicillin. *Proceeding of the International Microorganisms*. New York, Academic 2: 199-211.
- ILCZUK, Z., 1970. Genetics of citric acid producing strains of *Aspergillus niger*. II Citric acid synthesis by auxotrophic mutants of *A. niger* induced with UV. *Nahrung*, 14: 97-105.
- ILCZUK, Z. e J. FIEDUREK, 1986. Effect of the reversion of *Aspergillus niger* auxotrophic mutants to prototrophic forms on their glucoamylolytic activity. *Starch*, 38: 281-4.
- ISHITANI, G. e K. SAKAGUCHI, 1956. Hereditary variation and genetic recombination in Koji-moulds (*Aspergillus oryzae* and *A. sojae*). V. Heterokaryosis. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2: 345-400.
- ISHITANI, C.; Y. IKEDA e K. SAKAGUCHI, 1956. Hereditary variation and genetic recombination in Koji-moulds (*Aspergillus oryzae* and *A. sojae*). VI. Genetic recombination in heterozygous diploids. *Journal of Applied Microbiology*, 2: 401-30.
- IVANOVA, V. V. e L. I. IROKHINA, 1983. Use of catabolite repression in the selection of the glucoamylase producer *Aspergillus niger*. *Prikladnaya Biokhimiya i Mickrobiologiya*, 19: 844-50.
- KÄFER, E., 1960. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 186: 619-20.
- KÄFER, E., 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46: 1581-609.
- KERR, R. W.; F. C. CLEVELAND e W. J. KATZBECK, 1951. The action of amyloglucosidase on amylose e amylopectin. *Journal of the American Chemical Society*, 73: 3916-21.

- KVESITADZE, G. I.; N. N. VORONTSOVA; O. N. GONCHAROVA, V. V. KORIDZE E. A. DVADTSATOVA e L. L. KVACHADZE, 1981a. Exogenous glucoamylases of molds of the genus *Aspergillus*. *Prinkladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 17: 569-74.
- KVESITADZE, G. I.; L. L. KAVACHADZE; M. D. PAVLENISHVILI e V. V. KORIDZE, 1981b. Selection of microscopic fungi producing acid-stable alfa-amylase and glucoamylase. *Microbiology*, 50: 598-602.
- LE MENSE, E. H.; J. CORMAN; J. M. VAN LANEN; A. F. LANGLYKKE, 1947. Production of mold amylases in submerged culture. *Journal of Bacteriology*, 54: 149-59.
- LEWIS, N. F. e V. P. SINKAR, 1981. Optimization of nutrients and cultivation conditions in glucoamylase production. *Journal of Food Biochemistry*, 5: 69-77.
- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with para-fluorophenylalanine. *Nature*, 20: 744.
- LHOAS, P., 1967. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in *Aspergillus niger*. *Genetical Reserch*, 10: 45-61.
- LHOAS, P., 1968. Growth rate and haploidization of *Aspergillus niger* on medium containing p.fluorophenylalanine. *Genetical Research*, 12: 305-15.
- LINEBACK, D. R., 1968. The carbohydrate-polypeptide linkages in a fungal glucoamylase. *Carbohydrate Research*, 7: 106-8.
- MACDONALD, K. D., 1972. Genetics of penicillin production in *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans*. In: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN, ed. *Genetics of Industrial Microorganisms*, Amsterdam, Elsevier v.1, p. 255-64.
- MACDONALD, K. D.; G. HOLT e P. DITCHBURN, 1972. The genetics of penicillin production. *Proc. IV IFS: Fermentation Technology Today*. p. 251-7.
- MAKINS, J. F.; G. HOLT e K. D. MACDONALD, 1983. The genetic location of three mutations impairing production in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 129: 3027-33.
- MANJUNATH, P. e M. R. R. RAO, 1980. Immunochemical relationship between glucoamylases I e II of *Aspergillus niger*. *Journal of Bioscience*, 2: 163-9.
- MASIERO, M., 1988. Parassexualidade e produção de amiloglicosidase em *Aspergillus niger*. Campinas, UNICAMP, 110p. (Tese de Mestrado).
- MEDDA, S.; B. C. SAHA e S. UEDA, 1981. Raw starch adsorption and elution behavior of glucoamylase I of black *Aspergillus* and its modification by alkaline protease. In: *Annual Reports of International Center of Cooperative Research and Development in Microbial Engennering*, 4. Japan. p. 211-9.
- MESSIAS, C. L., 1977. Parassexualidade e produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus*, Link. Piracicaba, ESALQ/USP. 75p. (Tese de Mestrado).

- MESSIAS, C. L., 1979. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP. 73p. (Tese de Doutorado).
- MESSIAS, C. L. e J. L. AZEVEDO, 1980. Parasexuality of the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 75: 473-7.
- MIAH, M. N. N. e S. UEDA, 1977a. Multiplicity of glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. Part I. *Starch*, 29: 191-6.
- MIAH, M. N. N. e S. UEDA, 1977b. Multiplicity of glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. Part II. *Starch*, 29: 235-9.
- MOHSIN, S. M.; E. T. EL-ASHWAH; M. S. RAOUF; M. KHAIRY e S. MORSI, 1979a. Glucoamylase. Part I. Production of glucoamylase by *Aspergillus* species. *Egyptian Journal of Microbiology*, 12: 79-88.
- MOHSIN, S. M.; E. T. EL-ASHWAH; M. S. RAOUF; M. KHAIRY e S. MORSI, 1979b. Glucoamylase. Part II. Purification of the enzyme. *Egyptian Journal of Microbiology*, 12: 89-99.
- MOHSIN, S. M.; E. T. EL-ASHWAH; M. S. RAOUF; M. KHAIRY e S. MORSY, 1979c. Glucoamylase. Part III. Fractionation and kinetics of purified glucoamylase. *Egyptian Journal of Microbiology*, 12: 100-14
- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregation induced by *p*.fluorophenil-alanine. *Aspergillus News Letter*, 2: 10.
- NAKANO, H.; T. TAJIRI; Y. KOKA; S. UEDA, 1981. Some properties of amylase inhibitor A produced by *Streptomyces* sp. n^o 280. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45: 1053-60.
- NEVALAINEN, K. M. H. e E. T. PALVA, 1979. Improvement of amyloglicosidase production of *Aspergillus awamori* by mutagenic treatments. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 29: 390-5.
- NEVALAINEN, K. M. H., 1981. Induction, isolation and characterization of *Aspergillus niger* mutants strains producing elevated levels of Beta-glucosidase. *Applied Environmental Microbiology*, 41: 593-6.
- NGA, B. H.; S. P. TEO e G. LIM, 1975. The occurrence in nature of a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, 88: 364-6.
- PAPA, K. E., 1973. The parasexual cycle in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 68: 1201-5.
- PAPA, K. E., 1976. Linkage groups in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 68: 159-65.
- PAPA, K. E., 1978. The parasexual cycle in *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, 70: 766-73.
- PAPA, K. E., 1984. Genetics of *Aspergillus flavus*: linkage of aflatoxin mutants. *Canadian Journal of Microbiology*, 30: 68-73.

- PARK, Y. K. e R. S. PAPINI, 1970. Produção de xarope de glicose do amilo de mandioca pelo método enzima-enzima. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 1: 13-16.
- PARK, Y. K.; R. S. PAPINI; W. H. BAR e P. VITTI, 1971. Produção de amilase fúngica por fermentação submersa por cultura em meio semi-sólido e seu uso na panificação. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 2: 181-5.
- PARK, Y. K. e D. C. LIMA, 1972. Produção de amiloglicosidase fúngica por fermentação submersa e sua purificação. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 3: 67-74.
- PARK, Y. K. e M. S. S. DE SANTI, 1977. Induction of high amyloglicosidase producing mutant from *Aspergillus awamori*. *Journal of Fermentation Technology*, 55: 193-5.
- PAZUR, J. H. e K. KLEPPLE, 1962. The hydrolysis of L-D-glucosides by amyloglicosidase from *Aspergillus niger*. *The Journal Biological Chemistry*, 237: 1002-5.
- PIMENTEL GOMES, F., 1970. *Curso de Estatística Experimental*. Gráfica Benetti, 4ª Ed., São Paulo. 430p.
- PONTECORVO, G. e J. A. ROPER, 1952. Genetic analysis without sexual reproduction by means of poliploidy in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 6: 7.
- PONTECORVO, G.; J. A. ROPER e E. FORBES, 1953a. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, 8: 198-210.
- PONTECORVO, G.; J. A. ROPER; L. M. HEMMONS; K. D. MACDONALD e W. J. BUFTON, 1953b. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5: 141-238.
- PONTECORVO, G., 1956. The parasexual cycle in fungi. *Annual review of Microbiology*, 10: 393-400.
- PONTECORVO, G. e E. KÄFER, 1958. Genetic analysis based on mitotic recombination. *Advances in Genetics*, 9: 71-104.
- RAMANESH, N.; K. R. SREEKANTIAH e V. S. MURTHY, 1982. Studies on the two forms of amyloglicosidase of *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Starch*, 34: 341-51.
- RAPER, K. B. e D. I. FENNELL, 1965. *The genus Aspergillus*. Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 686p.
- RAZZAQUE, A. e S. UEDA, 1978. Glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation Technology*, 56: 296-302.
- RIBA, G. e A. M. RAVELOJOANA, 1984. The parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumoso roseus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 30: 922-6.
- ROPER, J. A., 1952. Production of heterozigous diploids in filamentous fungi. *Experientia (Basel)*, 8: 14-5.
- ROPER, J. A. e R. H. PRITCHARD, 1955. Recovery of complementary products of mitotic

- crossing-over. *Nature*, 175: 639.
- ROPER, J. A., 1966. The parasexual cycle. In: AINSWORTH, G. C. e A. S. SUSSMMAN. *The fungi*. New York, Academic Press. v.2, p.589-617.
- ROSIM, R. T., O. GARCIA Jr. e I. R. BARACHO, 1978. Tamanho dos conídios e núcleos em linhagens haplóides e diplóides de *Aspergillus niger*. *Ciência e Cultura*, 30: 487-92.
- RUDD, B. A. M. e D. A. HOPWOOD, 1979. Genetic of actinorhodin biosynthesis by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology*, 114: 35-43.
- SAHA, B. C.; T. MITSUE e S. UEDA, 1979. Glucoamylase produced by submerged culture of *Aspergillus oryzae*. *Starch*, 31: 307-14.
- SERMONTI, G., 1969. *Genetics of antibiotic producing microorganisms*. London, John Wiley. 398p.
- SHCHERBAKOVA, E. Ya. e M. N. RESVAYA, 1978. Formation of diploids in *Aspergillus niger* and their biosynthesis of citric acid. *Mikrobiologiya*, 46: 1064-9.
- SIEGEL, S., 1975. *Estatística não paramétrica para as Ciências do Comportamento*. São Paulo, Mc Graw Hill do Brasil. 350p.
- SINKAR, V. P. e N. F. LEWIS, 1980. Increased glucoamylase production using agricultural by products. *Journal Food Biochemistry*, 4: 159-68.
- SINKAR, V. P. e N. F. LEWIS, 1982. Glucoamylase production by a newly isolated strain of *Aspergillus niger*. *Journal Food of Protection*, 45: 586-9.
- SMILEY, K. L.; M. C. CADMUS; D. E. HENSLEY e A. A. LAGODA, 1964. High potency amyloglucosidase-producing mold of the *Aspergillus niger* group. *Applied Microbiology*, 12: 455.
- SVENSSON, B.; T. G. PEDERSEN, I. SVENDSEN; T. SAKAI e M. OTTESEN, 1982. Characterization of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Research Communications*, 47: 55-69.
- SVENSSON, B.; K. LARSEN; I. SVENDSEN e E. BOEL, 1983. *Carlsberg Research Communications*, 48: 529-44.
- TAKAHASHI, T.; Y. TSUCHIDA e M. IRIE, 1978. Purification and some properties of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* species. *Journal of Biochemistry*, 84: 1183-94.
- TINLINE, R. D., 1962. *Cochiobolus sativus*. V. Heterocaryosis and parasexuality. *Canadian Journal of Botany*, 40: 425-37.
- TINLINE, R. D. e E. B. H. McNEILL, 1969. Parasexuality in plant pathogenic fungi. *Annual review of Phytopathology*, 7: 147-70.
- TUYLL, J. M. VAN, 1977. *Genetics of fungal resistance to systemic fungicides*. Netherland.

Mededelingen Landbouwhogesholl Wageningen. 136p.

- UEDA, S. e Y. Koba, 1973. Some properties of amylase inhibitor produced by *Streptomyces* sp. n^o 280. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37: 2025-30.
- UPSHALL, A.; B. GIDDINGS e I. D. MORTIMORE, 1976. The use of Benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*. *Journal of General Microbiology*, 100: 413-8.
- UPSHALL, A., 1981. Naturally occurring diploid isolates of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 122: 7-10.
- 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).
- VIALTA, A., 1987. Genética e produção de amiloglicosidase em *Aspergillus awamori* e no híbrido interespecífico com *Aspergillus niger*. Campinas, UNICAMP. 173p. (Tese de Mestrado).
- WHELAN, W. L. e P. T. MAGEE, 1981. Natural heterozygosity in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 145: 893-903.
- YAMASHITA, I. e S. FUKUI, 1984. Genetic background of glucoamylase production in the yeast *Saccharomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48: 137-141.
- YONEDA, Y e B. MARUO, 1975. Mutation of *Bacillus subtilis* causing hyperproduction of alfa-amylase and protease and its synergistic effect. *Journal of Bacteriology*, 124: 48-54.

Apêndice de Tabelas

TABELA A1 – Produção de Amilglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem pab₁fwn₁.

LINHAGENS (colônias)	REPETIÇÕES				V
	I	II	III	IV	
<u>pab₁fwn₁</u>	10,8	8,9	9,4	10,8	8,6
158	12,8	12,8	14,6	11,4	11,4
169	16,9	13,5	14,3	12,8	11,1
192	7,0	11,1	9,1	5,0	6,2

TABELA A2 - Análise de Variância dos Dados da TABELA A1.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	3	113,241	37,747	11,4 **
Resíduo	16	53,076	3,317	
Total	19	166,317		

** — significativo à nível de 1%

TABELA A3 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A2.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ml)		
169	13,7	a*	
158	12,6	a	b
<u>pab₁fwn₁</u>	9,7	b	c
192	7,7		c

DMS 5% = 3,3

* — Os valores seguidos da mesma letra, não são diferentes significativamente à nível de 5%.

TABELA A4 - Produção de Amilglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem pab₁fwn₁.

LINHAGENS (colônias)	REPETIÇÕES		
	I	II	III
<u>pab₁fwn₁</u>	13,2	16,6	14,7
103	12,0	16,1	15,1
110	5,5	4,3	7,8
112	19,4	26,4	17,1
113	10,9	9,2	9,7
115	25,3	22,4	19,4

TABELA A5 - Análise de Variância dos Dados da TABELA A4.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	5	625,836	125,167	25,9 **
Resíduo	12	58,000	4,833	
Total	17	683,836		

** significativo à nível de 1%.

TABELA A6 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A5.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ml)		
115	23,3	a*	
112	20,9	a	
<u>pab₁fwn₁</u>	14,8	b	
103	14,4	b	
113	9,9	b	c
110	5,8		c

DMS 5% = 6,0

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

TABELA A7 - Produção de Amilglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem pab₁fwn₁.

LINHAGENS (colônias)	REPETIÇÕES				
	I	II	III	IV	V
<u>pab₁fwn₁</u>	9,0	8,8	7,2	8,7	10,7
147	12,0	11,9	12,3	11,6	12,6
155	10,4	9,0	9,3	10,7	9,4
191	10,1	10,6	12,9	11,2	11,5
198	9,3	7,4	9,5	8,8	9,5

TABELA A8 - Análise de Variância dos Dados da TABELA A7.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	4	47,507	11,877	25,8 **
Resíduo	20	9,190	0,459	
Total	24	56,697		

** - significativo a nível de 1%.

TABELA A9 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A8.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ml)	
147	12,1	a*
191	11,2	a
155	9,7	b
198	8,9	b
<u>pab₁fwn₁</u>	8,9	b

DMS 5% = 1,3

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

TABELA A10 – Produção de Amiloglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem pab₁fwn₁.

LINHAGENS (colônias)	REPETIÇÕES				
	I	II	III	IV	V
<u>pab₁fwn₁</u>	12,4	10,6	13,1	6,6	12,9
112	14,7	16,0	17,4	17,0	19,0
115	11,9	14,8	10,0	11,9	11,9
129	12,2	15,6	8,7	12,2	7,7
191	13,2	16,0	13,9	16,0	14,7

TABELA A11 - Análise de Variância dos Dados da TABELA A10.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	4	123,797	30,949	6,3 **
Resíduo	20	97,616	4,881	
Total	24	221,413		

** - significativo à nível de 1%.

TABELA A12 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A11.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ml)
112	16,8 a*
191	14,7 a b
115	12,1 b
129	11,3 b
pab_1fwn_1	11,1 b

DMS 5% = 4,2

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

TABELA A13 - Produção de Amiloglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem pab₁fwn₁.

LINHAGENS (colônias)	REPETIÇÕES				
	I	II	III	IV	V
<u>pab₁fwn₁</u>	9,6	12,7	15,4	12,7	13,1
158	19,9	19,9	19,2	19,9	20,7
169	20,6	18,0	22,4	16,9	19,2
192	23,3	21,5	22,4	22,4	17,4

TABELA A14 - Análise de Variância dos Dados da TABELA A13.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	3	224,174	74,724	20,4 **
Resíduo	16	58,494	3,656	
Total	19	282,668		

** - significativo à nível de 1%.

TABELA A15 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A14.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ml)
192	21,4 a*
158	19,9 a
169	19,4 a
<u>pab₁fwn₁</u>	12,7 b

DMS 5% = 3,6

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

TABELA A16 - Produção de Amiloglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem pab₁fwn₁.

LINHAGENS (colônias)	REPETIÇÕES				
	I	II	III	IV	V
<u>pab₁fwn₁</u>	12,2	11,5	12,9	9,2	11,2
153	0,8	0,8	0,4	0,5	0,4
158	12,6	15,2	14,8	14,3	14,1
169	16,5	19,1	17,5	13,3	15,6
183	0,9	1,4	1,0	1,0	1,2
192	15,6	7,2	9,8	12,9	14,7
61	0,5	0,2	0,2	0,2	0,5

TABELA A17 - Análise de Variância dos Dados da TABELA A16.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	6	1495,933	249,3221	91,2 **
Resíduo	28	76,566	2,7345	
Total	34	1572,499		

** - significativo à nível de 1%.

TABELA A18 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A17.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ml)		
169	16,4	a*	
158	14,2	a	b
192	12,0		b
<u>pab₁fwn₁</u>	11,4		b
183	1,1		c
153	0,6		c
61	0,3		c

DMS 5% = 3,3

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

TABELA A19 – Produção de Amiloglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV, linhagem pab₁fwn₁ e nic₁olv₃.

LINHAGENS (colônias)	REPETIÇÕES				
	I	II	III	IV	V
<u>pab₁fwn₁</u>	11,5	11,5	14,7	12,8	12,1
<u>nic₁olv₃</u>	10,5	10,8	11,5	11,1	11,5
112	14,7	16,4	16,4	16,4	15,1
147	14,3	16,4	16,4	15,1	13,6

TABELA A20 - Análise de Variância dos Dados da TABELA A19.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	3	73,92	24,64	23,3 **
Resíduo	16	18,89	1,05	
Total	19	92,81		

** - significativo à nível de 1%.

TABELA A21 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A20.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ml)	
112	15,8	a*
147	15,1	a
<u>pab₁fwn₁</u>	12,5	b
<u>nic₁olv₃</u>	11,1	b

DMS 5% = 1,8

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

TABELA A22 - Produção de Amiloglicosidase (U/ml) das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem pab₁fwn₁.

LINHAGENS (colônias)	REPETIÇÕES				
	I	II	III	IV	V
<u>pab₁fwn₁</u>	16,6	16,1	16,2	16,1	16,2
209	14,4	12,5	17,7	14,4	14,0
227	13,3	11,5	12,6	11,8	13,3
243	13,3	12,9	12,6	12,6	12,9
250	16,6	15,7	16,2	15,7	-
252	18,2	18,8	19,4	18,5	18,2
259	13,2	11,1	12,4	13,2	13,9
260	13,5	13,2	14,0	11,5	11,5

TABELA A23 - Análise de Variância dos Dados da TABELA A22.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	7	173,742	24,820	26,2 **
Resíduo	31	29,346	0,946	
Total	38	203,088		

** - significativo à nível de 1%.

TABELA A24 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A23.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ml)		
252	18,6	a*	
<u>pab₁</u> , <u>fw₁</u>	16,2	b	
250	16,0	b	
209	14,6	b c	
243	12,8	c	d
259	12,7	c	d
260	12,7	c	d
227	12,5		d

DMS 5% = 2,0

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

TABELA A25 - Produção de Amiloglicosidase em U/ml das colônias selecionadas após tratamento com LUV e da linhagem pab₁fwn₁.

LINHAGENS (colônias)	REPETIÇÕES				
	I	II	III	IV	V
<u>pab₁fwn₁</u>	16,7	15,3	15,3	19,4	15,3
209	14,9	18,2	17,7	14,5	14,5
250	18,2	18,2	18,8	14,9	16,2
252	22,1	22,1	20,0	20,0	17,2

TABELA A26 - Análise de Variância dos Dados da TABELA A25.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	3	56,825	18,942	5,7 **
Resíduo	16	53,252	3,328	
Total	19	110,077		

** - significativo à nível de 1%.

TABELA A27 - Comparação das Médias pelo Teste de Tukey dos Dados da TABELA A26.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ml)
252	20,3 a*
250	17,2 a b
<u>pab₁fwn₁</u>	16,4 b
209	15,9 b

DMS 5% = 3,3

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