

UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE  
CAMPINAS

**BC/8218**  
**IB/81149**

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

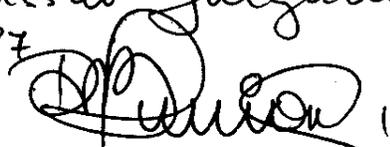
*1987*

GENÉTICA E PRODUÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE  
EM *Aspergillus awamori* E NO HÍBRIDO  
INTERESPECÍFICO COM *Aspergillus niger*

8. 1. 10

Este exemplar corresponde à redação final  
da Tese defendida pelo candidato AIRTON  
VIALTA e, aprovada pela Comissão julgadora  
27/07/87

AIRTON VIALTA

  
orientador:

81149

GENÉTICA E PRODUÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE  
EM *Aspergillus awamori* E NO HÍBRIDO  
INTERESPECÍFICO COM *Aspergillus niger*

Orientador: Dr. RENATO BONATELLI JUNIOR

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de Cam  
pinas para obtenção do título de Mestre  
em Genética

CAMPINAS  
Estado de São Paulo  
1987  
**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL

Classif.	7
Autor	V6539
V.	Ex.
Tombo BC/	8218
	10/733

18/81149  
34/8218

*A minha querida esposa,  
dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas e instituições que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial

Ao Professor Dr. Renato Bonatelli Junior, pela orientação, amizade, atenção e estímulo.

Ao Professor Dr. Ivanhoê R. Baracho e à Professora Dra. Hebe M. L. de Souza, pelas facilidades concedidas como Chefes do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Ao Professor Dr. Ivanhoê R. Baracho, pela valiosa ajuda na análise estatística.

À colega Gisela U. Valent, pelo estímulo e imprescindível auxílio na discussão, bem como no desenvolvimento do trabalho.

Às colegas Maria R. Calil, Márcia Masiero e ao colega Juverlandi Lugli, pelo estímulo, atenção e importante ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Genética e Evolução.

Ao colega Walter J. Siqueira, pelo estímulo e grande ajuda no trabalho fotográfico.

Ao CNPq, pelos auxílios financeiros, concedidos através do Programa Integrado de Genética.

À FAPESP e à CAPES, pelas bolsas de estudo concedidas.

À NUCLEBRÁS, pelo apoio e facilidades concedidas.

# I N D I C E

1. INTRODUÇÃO . . . . .	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA . . . . .	02
2.1. Os fungos <i>Aspergillus awamori</i> e <i>Aspergillus niger</i> . . . . .	02
2.2. Instabilidade genética . . . . .	02
2.3. Ciclo parassexual em fungos . . . . .	09
2.4. A enzima amiloglicosidase . . . . .	13
2.5. Protoplastos . . . . .	17
2.5.1. Isolamento . . . . .	18
2.5.2. Fusão . . . . .	19
3. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	23
3.1. Linhagens utilizadas . . . . .	23
3.2. Meios de cultura e de fermentação utilizados . . . . .	23
3.2.1. Meio Mínimo (PONTECORVO e <u>col.</u> , 1953b) . . . . .	23
3.2.2. Meio Mínimo 2 vezes forte . . . . .	23
3.2.3. Meio Completo (PONTECORVO e <u>col.</u> , 1953b) . . . . .	23
3.2.4. Meio Completo 2 vezes forte . . . . .	24
3.2.5. Meio Mínimo líquido com 4% de Meio Completo . . . . .	24
3.2.6. Meio para a produção de micélio - MCS . . . . .	24
3.2.7. Meio de regeneração de protoplastos . . . . .	24
3.2.8. Meio de fermentação MAC (BONATELLY Jr. e <u>col.</u> , 1984) . . . . .	24
3.2.9. Meio Mínimo com amido . . . . .	24
3.3. Soluções utilizadas . . . . .	25
3.3.1. Solução de vitaminas . . . . .	25
3.3.2. Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras . . . . .	25
3.3.3. Solução estoque de aminoácidos e vitaminas . . . . .	25
3.3.4. Solução de Tween . . . . .	25
3.3.5. Solução salina . . . . .	25
3.3.6. Tampão fosfato pH 7,0 . . . . .	26
3.3.7. Tampão fosfato pH 5,8 . . . . .	26
3.3.8. Solução de albumina . . . . .	26
3.3.9. Solução fixadora . . . . .	26

3.3.10.	Solução de Giemsa . . . . .	26
3.3.11.	Solução de Benlate em acetona . . . . .	26
3.3.12.	Solução de Benlate em água . . . . .	26
3.3.13.	Solução estoque de Brometo de Etídio . . . . .	27
3.3.14.	Solução lisol 10% . . . . .	27
3.3.15.	Solução de amido 1% em tampão citrato 0,1M - pH 4,0 . . . . .	27
3.3.16.	Solução de dextrina limite 1% em tampão citrato 0,1M - pH 4,0 . . . . .	27
3.3.17.	Solução estoque do inibidor de amilglicosidase ( <u>AG</u> ) . . . . .	27
3.3.18.	Solução de KCl 1,2M . . . . .	27
3.3.19.	Solução de KCl 0,6M . . . . .	27
3.3.20.	Soluções de ácido perclórico . . . . .	28
3.3.21.	Solução 0,3N de KOH . . . . .	28
3.3.22.	Solução de difenilamina . . . . .	28
3.3.23.	Solução de acetaldeído . . . . .	28
3.3.24.	Solução de PEG 30% . . . . .	28
3.3.25.	Solução estoque de DNA . . . . .	28
3.4.	Esterilização e temperatura de incubação . . . . .	28
3.5.	Estimativa da viabilidade dos conídios . . . . .	29
3.6.	Estimativa da taxa de segregação espontânea . . . . .	29
3.7.	Isolamento de linhagens auxotróficas puras e prototróficas puras. . . . .	29
3.7.1.	Auxotróficas . . . . .	29
3.7.2.	Prototróficas . . . . .	29
3.7.2.1.	Isolamento por colônias . . . . .	29
3.7.2.2.	Isolamento por microcolônias . . . . .	30
3.8.	Estimativa da frequência de segregação de colônias com morfologia alterada . . . . .	30
3.9.	Teste preliminar de sensibilidade ao Benlate diluído em acetona . . . . .	30
3.10.	Teste preliminar de sensibilidade ao Benlate diluído em água . . . . .	31
3.11.	Teste do efeito da acetona no crescimento das colônias . . . . .	31
3.12.	Obtenção e frequência de setores . . . . .	31
3.12.1.	Tratamento com Benlate diluído em acetona . . . . .	31
3.12.2.	Tratamento com Benlate diluído em água . . . . .	31
3.13.	Isolamento de setores . . . . .	32
3.14.	Caracterização das linhagens e setores . . . . .	32
3.14.1.	Teste de sensibilidade ao Benlate diluído em água . . . . .	32

3.14.2.	Auxotrofia . . . . .	32
3.14.3.	Número de núcleos por conídio (PAES DE BARROS, 1977) . .	32
3.14.4.	Diâmetro de conídios . . . . .	32
3.15.	Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos . . . . .	33
3.15.1.	Curvas de sobrevivência . . . . .	33
3.15.2.	Isolamento de mutantes . . . . .	33
3.15.2.1.	Auxotróficos . . . . .	33
3.15.2.1.1.	Isolamento total . . . . .	33
3.15.2.1.2.	Filtração . . . . .	34
3.15.2.2.	Mutantes morfológicos . . . . .	34
3.16.	Reversão das marcas auxotróficas . . . . .	34
3.17.	Teste para a verificação do bloqueio metabólico na via biossintética dos aminoácidos arginina e prolina . . . . .	35
3.18.	Resistência ao Brometo de Etídio . . . . .	35
3.18.1.	Curva de sobrevivência . . . . .	35
3.18.2.	Mutantes espontâneos . . . . .	35
3.18.3.	Mutantes induzidos . . . . .	36
3.18.4.	Curva de resistência . . . . .	36
3.19.	Técnicas genéticas . . . . .	36
3.19.1.	Utilizadas no ciclo parassexual . . . . .	36
3.19.1.1.	Obtenção de heterocários . . . . .	36
3.19.1.2.	Isolamento de colônias prototróficas . . . . .	36
3.19.1.3.	Haploidização de colônias prototróficas diplóides . . . . .	37
3.19.2.	Teste de complementação . . . . .	37
3.20.	Caracterização dos prováveis diplóides . . . . .	37
3.20.1.	Germinação em MM e MC . . . . .	37
3.20.2.	Estimativa do diâmetro de conídios, a fresco . . . . .	38
3.20.3.	Comparação da produção de setores entre as linhagens prováveis diplóides e as parentais . . . . .	38
3.20.4.	Crescimento e formação de setores . . . . .	38
3.20.5.	Extração e quantificação de DNA . . . . .	38
3.20.5.1.	Preparação dos conídios . . . . .	38
3.20.5.2.	Extração do DNA (VAN TUYLL, 1977) . . . . .	38
3.20.5.3.	Determinação da quantidade de DNA . . . . .	39
3.20.5.4.	Curva padrão . . . . .	39

3.21.	Caracterização dos segregantes . . . . .	39
3.21.1.	Auxotrofia . . . . .	40
3.21.2.	Morfologia . . . . .	40
3.21.2.1.	Coloração de conídios . . . . .	40
3.21.2.2.	Alteração morfológica ( <u>mor<sub>1</sub></u> ) . . . . .	40
3.21.2.3.	Alteração morfológica ( <u>mor<sub>2</sub></u> ) . . . . .	40
3.21.2.4.	Proliferação de conidióforos secundários . . . . .	40
3.21.3.	Setorização espontânea e induzida . . . . .	40
3.21.4.	Resistência ao Brometo de Etídio . . . . .	41
3.22.	Metodologia para produção de enzima e medida de sua atividade . . . . .	41
3.22.1.	Curva de acúmulo da enzima em função do tempo de incubação . . . . .	41
3.22.2.	Medida da atividade enzimática . . . . .	41
3.22.3.	Medida da quantidade de açúcares redutores . . . . .	41
3.22.4.	Teste com inibidor . . . . .	42
3.22.5.	Determinação da melhor concentração de aminoácido para a produção de amiloglicosidase . . . . .	42
3.22.6.	Produção de enzima . . . . .	42
3.22.7.	Teste da produção de enzimas amilolíticas em placas . . . . .	42
3.23.	Cruzamento interespecífico . . . . .	43
3.23.1.	Tentativa pelo método de crescimento em agitação . . . . .	43
3.23.2.	Tentativa via fusão de protoplastos . . . . .	43
3.23.2.1.	Obtenção de protoplastos (HAMLYN e col., (1981)) . . . . .	43
3.23.2.2.	Fusão de protoplastos . . . . .	44
3.23.2.2.1.	Espontânea . . . . .	44
3.23.2.2.2.	Induzida (PEBERDY, 1979) . . . . .	44
3.23.3.	Caracterização das colônias crescidas em MM KCl . . . . .	44
3.23.3.1.	Crescimento em MM e MC . . . . .	45
3.23.3.2.	Morfologia e auxotrofia . . . . .	45
3.23.3.3.	Segregação . . . . .	45
3.23.4.	Caracterização dos segregantes dos prováveis produtos de fusão . . . . .	45
3.24.	Análises estatísticas . . . . .	45
3.24.1.	Dos dados obtidos com formação de setores, de acordo com os itens 3.12.1. e 3.12.2. . . . .	45

3.24.2.	Dos dados obtidos com o número de núcleos por conídio, de acordo com o item 3.14.3. . . . .	46
3.24.3.	Dos dados obtidos com o diâmetro de conídios, de acordo com o item 3.14.4. . . . .	46
3.24.4.	Comparação do crescimento em MC e em MC contendo acetona, de acordo com o descrito nos itens 3.9. e 3.11. . .	46
3.24.5.	Correlação entre dados . . . . .	46
4.	RESULTADOS . . . . .	
4.1.	Segregação espontânea . . . . .	47
4.2.	Tentativa de isolamento de linhagens auxotróficas puras e prototróficas puras . . . . .	47
4.3.	Isolamento de setores a partir das linhagens NRRL 3112 e <u>Awm 3</u> .	50
4.4.	Frequência da formação de setores nas linhagens NRRL 3112 e <u>Awm 3</u>	52
4.4.1.	Em Benlate diluído em acetona . . . . .	52
4.4.2.	Em Benlate diluído em água . . . . .	54
4.5.	Efeito da acetona no crescimento das colônias . . . . .	55
4.6.	Caracterização das linhagens NRRL 3112, <u>Awm 3</u> , alguns de seus derivados e setores . . . . .	57
4.6.1.	Auxotrofia . . . . .	57
4.6.2.	Sensibilidade ao Benlate diluído em água . . . . .	57
4.6.3.	Número de núcleos por conídio . . . . .	60
4.6.4.	Diâmetro de conídios . . . . .	66
4.6.5.	Correlação entre número de núcleos e diâmetro de conídios . . . . .	72
4.7.	Comparação da frequência da formação de setores entre a linhagem NRRL 3112 e o setor T <sub>19</sub> . . . . .	72
4.8.	Número, porcentagem relativa, porcentagem de viabilidade e curva de sobrevivência de conídios das linhagens <u>Awm 3</u> e NRRL 3112, após tratamento com luz ultravioleta (UV) . . . . .	73
4.9.	Isolamento de mutantes auxotróficos e morfológicos . . . . .	76
4.9.1.	Método do isolamento total . . . . .	76
4.9.2.	Método da filtração . . . . .	76
4.10.	Frequência de reversão das mutações auxotróficas . . . . .	76
4.11.	Evidenciação do bloqueio metabólico na via biossintética dos aminoácidos arginina e prolina . . . . .	78

4.12.	Resistência ao Brometo de Etídio . . . . .	78
4.12.1.	Número, porcentagens relativas e curva de sobrevivência de conídios do mutante <u>arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> gre<sub>1</sub></u> , após tratamento com Brometo de Etídio . . . . .	78
4.12.2.	Isolamento de mutantes resistentes espontâneos . . . . .	78
4.12.3.	Isolamento de mutantes resistentes induzidos . . . . .	81
4.12.4.	Curva de resistência . . . . .	81
4.13.	Comparação da frequência de formação de setores entre as linhagens <u>arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sub>1</sub><sup>r</sup> gre<sub>1</sub></u> e <u>arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sub>1</sub><sup>s</sup> bwn<sub>1</sub></u> e a NRRL 3112 . . . . .	84
4.14.	Cruzamentos intra-específicos . . . . .	85
4.14.1.	Teste de complementação entre linhagens <u>arg/pro</u> . . . . .	85
4.14.2.	Obtenção de heterocários . . . . .	85
4.14.3.	Isolamento e frequência de colônias prototróficas . . . . .	87
4.15.	Caracterização das linhagens prováveis diplóides . . . . .	87
4.15.1.	Germinação em MM e MC . . . . .	87
4.15.2.	Número de núcleos por conídio . . . . .	90
4.15.3.	Diâmetro de conídios . . . . .	91
4.15.4.	Crescimento e formação de setores . . . . .	91
4.15.5.	Curva de resistência ao Brometo de Etídio . . . . .	93
4.15.6.	Extração e quantificação do DNA . . . . .	93
4.16.	Segregação das linhagens prováveis diplóides . . . . .	98
4.17.	Caracterização dos segregantes . . . . .	98
4.18.	Produção de amiloglicosidase ( <u>AG</u> ) . . . . .	103
4.18.1.	Curva de acúmulo da enzima em função de tempo de incubação . . . . .	103
4.18.2.	Teste utilizando inibidor de <u>AG</u> . . . . .	105
4.18.3.	Determinação da melhor concentração de aminoácidos para a produção de <u>AG</u> . . . . .	105
4.18.4.	Produção de <u>AG</u> das linhagens, setores e mutantes . . . . .	107
4.19.	Cruzamento interespecífico . . . . .	110
4.19.1.	Por métodos convencionais . . . . .	110
4.19.2.	Via fusão de protoplastos . . . . .	110
4.19.2.1.	Fusão espontânea . . . . .	110
4.19.2.2.	Fusão induzida . . . . .	111

4.19.3.	Caracterização das colônias crescidas em MM KCl	113
4.19.3.1.	Crescimento em MM e MC	113
4.19.3.2.	Morfologia e auxotrofia	115
4.19.3.3	Tratamento com Benlate	115
4.19.4.	Setorização dos prováveis produtos de fusão	116
4.19.5.	Caracterização do provável produto de fusão, linhagens parentais e segregantes	116
4.19.5.1.	Diâmetro de conídios	116
4.19.5.2.	Comportamento na presença de Benlate	116
4.19.5.3.	Produção de enzimas amilolíticas em placas	116
4.19.5.4.	Segregação	116
4.19.5.5.	Extração e quantificação do DNA	121
4.19.5.6.	Produção de amiloglicosidase	121
5.	DISCUSSÃO	123
5.1.	Instabilidade	123
5.1.1.	Segregação espontânea	123
5.1.2.	Efeito do Benlate	124
5.1.3.	Número de núcleos e diâmetro em conídios	124
5.1.4.	Considerações finais sobre instabilidade e variabilidade	125
5.2.	Isolamento de mutantes	126
5.2.1.	Auxotróficos e morfológicos	127
5.2.2.	Resistentes ao Brometo de Etídio	127
5.3.	Evidenciação do bloqueio metabólico na via biossintética dos aminoácidos arginina e prolina	127
5.4.	Cruzamento intra-específico	128
5.4.1.	Obtenção de heterocários e prováveis diplóides	128
5.4.2.	Caracterização das linhagens prováveis diplóides	130
5.4.3.	Caracterização dos segregantes	132
5.5.	Produção de amiloglicosidase	134
5.5.1.	Curva de acúmulo	134
5.5.2.	Atividade de <u>AG</u> na presença de inibidor específico com dextrina limite ou amido como substrato	134
5.5.3.	Determinação da melhor concentração de aminoácidos	135
5.5.4.	Produção de <u>AG</u>	135
5.6.	Cruzamento interespecífico	136

5.6.1.	Fusão espontânea de protoplastos . . . . .	136
5.6.2.	Fusão induzida de protoplastos . . . . .	136
5.6.3.	Caracterização das colônias isoladas em MM KCl . . . . .	137
5.6.4.	Isolamento do provável produto de fusão . . . . .	137
5.6.5.	Caracterização dos prováveis produtos de fusão e de seus segregantes . . . . .	137
5.6.6.	Produção de <u>AG</u> do híbrido . . . . .	139
6.	CONCLUSÕES . . . . .	141
7.	RESUMO . . . . .	143
8.	SUMMARY . . . . .	145
9.	BIBLIOGRAFIA . . . . .	147
	APÊNDICE . . . . .	174

## L I S T A   D E   T A B E L A S

01	Frequência da segregação espontânea de conídios <u>arg/pro</u> nas várias mi crocolônias isoladas . . . . .	49
02	Frequência da segregação espontânea de colônias com morfologia altera da . . . . .	50
03	Simbologia adotada para os setores, de acordo com a linhagem, o meio de cultura dos quais foram isolados e a coloração dos conídios . . .	52
04	Frequência de setores da linhagem NRRL 3112, submetida aos três trata mentos . . . . .	53
05	Frequência de setores da linhagem <u>Awm</u> 3, submetida aos três tratamen tos . . . . .	53
06	Análise de variância dos dados da Tabela 04 . . . . .	53
07	Análise de variância dos dados da Tabela 05 . . . . .	54
08	Frequência de setores da linhagem NRRL 3112, submetida aos dois trata mentos . . . . .	54
09	Frequência de setores da linhagem <u>Awm</u> 3, submetida aos dois tratamen tos . . . . .	54
10	Análise de variância dos dados da Tabela 08 . . . . .	55
11	Análise de variância dos dados da Tabela 09 . . . . .	55
12	Média do diâmetro das colônias (em mm) das várias linhagens e seto res, crescidas em MC e em MC contendo acetona . . . . .	56
13	Análise de variância para os dados da Tabela 12 . . . . .	57
14	Comparação da linhagem <u>Awn</u> 3 com seus setores, em relação às médias dos diâmetros (em mm) das colônias crescidas em MC e em MC contendo Benlate . . . . .	58

15	Comparação da linhagem NRRL 3112 com seus setores, em relação à média dos diâmetros (em mm) das colônias crescidas em MC e em MC contendo Benlate . . . . .	59
16	Porcentagem do número de núcleos por conídio das várias linhagens e setores . . . . .	61
17	Porcentagem do número de núcleos por conídio das várias linhagens e setores . . . . .	62
18	Análise de variância dos dados da Tabela 16 . . . . .	63
19	Análise de variância dos dados da Tabela 17 . . . . .	63
20	Comparação das médias dos dados da Tabela 16 . . . . .	64
21	Comparação das médias dos dados da Tabela 17 . . . . .	65
22	Diâmetro dos conídios (em mm) apresentado pelas várias linhagens e setores . . . . .	67
23	Diâmetro dos conídios (em mm) apresentado pelas várias linhagens e setores . . . . .	68
24	Análise de variância dos dados da Tabela 22 . . . . .	69
25	Análise de variância dos dados da Tabela 23 . . . . .	69
26	Comparação das médias dos dados da Tabela 22 . . . . .	70
27	Comparação das médias dos dados da Tabela 23 . . . . .	71
28	Frequência de setores da linhagem NRRL 3112 e do setor T <sub>19</sub> , quando crescidos em MC . . . . .	72
29	Análise de variância dos dados da Tabela 28 . . . . .	73
30	Porcentagem de conídios viáveis nas linhagens NRRL 3112 e <u>Awm</u> 3 . . . . .	73
31	Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem NRRL 3112 ao tratamento com luz UV . . . . .	74

32	Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem <u>Awm 3</u> , ao tratamento com luz UV . . . . .	74
33	Número de mutantes obtidos com o método de filtração nas linhagens NRRL 3112 e <u>arg/pro gre<sub>1</sub></u> . . . . .	76
34	Teste da frequência de reversão das deficiências nutricionais de mutantes obtidos na linhagem NRRL 3112 . . . . .	78
35	Crescimento das linhagens e mutantes em MC, em MM e em MM suplementado . . . . .	79
36	Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem <u>arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> gre<sub>1</sub></u> ao tratamento com Brometo de Etídio . . . . .	81
37	Médias do diâmetro de colônias dos vários mutantes, submetidos ao tratamento com Brometo de Etídio em várias concentrações . . . . .	82
38	Frequência de setores das linhagens tratadas com Benlate . . . . .	84
39	Análise de variância dos dados da Tabela 38 . . . . .	84
40	Comparação das médias dos dados da Tabela 38 . . . . .	85
41	Frequência de colônias prováveis diplóides e heterocarióticas dos três cruzamentos realizados . . . . .	88
42	Germinação de conídios dos diplóides, em MC e MM suplementado com <u>prolina</u> . . . . .	90
43	Porcentagem do número de núcleos por conídio das várias linhagens . . . . .	90
44	Diâmetro de conídios das colônias prováveis diplóides comparadas com as linhagens parentais . . . . .	91
45	Média do diâmetro de colônias das linhagens mutantes parentais e diplóide, tratadas com várias concentrações de Brometo de Etídio . . . . .	94
46	Conteúdo médio de DNA por núcleo ( $\mu\text{g DNA} \times 10^{-8}$ ) das várias linhagens nos dois experimentos . . . . .	96

47	Absorbâncias observadas em função da concentração de DNA . . . . .	96
48	Análise mitótica do diplóide <u>arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>s</sup> bwn<sub>1</sub>//arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sup>s</sup> gre<sub>1</sub></u> . . . . .	99
49	Análise mitótica do diplóide <u>arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>s</sup> bwn<sub>1</sub>//arg<sub>1</sub> pro mor<sub>2</sub> etb<sup>s</sup> gre<sub>1</sub></u> . . . . .	100
50	Análise mitótica do diplóide <u>arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>s</sup> bwn<sub>1</sub>//arg<sub>2</sub> pro mor<sub>2</sub> etb<sup>s</sup> gre<sub>1</sub></u> . . . . .	100
51	Análise mitótica das características comuns aos três cruzamentos . .	101
52	Dados referentes à curva de acúmulo de <u>AG</u> (U/ml) em função do tempo de incubação . . . . .	103
53	Atividade das enzimas amilolíticas (em U/ml) nas diferentes concentrações do inibidor <u>AG</u> , e em dois substratos . . . . .	105
54	Produção de amiloglicosidase (em U/ml) do setor T <sub>10</sub> em várias concentrações de prolina . . . . .	106
55	Produção de amiloglicosidase (em U/ml) de um setor ( <u>pro leu</u> ) em várias concentrações de leucina . . . . .	106
56	Produção de amiloglicosidase (em U/ml) de um setor ( <u>pro arg</u> ) em várias concentrações de arginina . . . . .	
57	Análise de variância dos dados do primeiro experimento . . . . .	107
58	Análise de variância dos dados do segundo experimento . . . . .	107
59	Comparação das médias da produção de enzima, pelo teste de Tukey . .	108
60	Comparação das médias da produção de enzima, pelo teste de Tukey . .	109
61	Viabilidade e número de colônias crescidas em MC e MC KCl . . . . .	110
62	Média do número de colônias crescidas após fusão espontânea de protoplastos em MC, MC KCl e MM KCl . . . . .	111

63	Viabilidade e número de colônias crescidas em MC e MC KCl . . . . .	111
64	Média do número de colônias crescidas após fusão induzida de protoplastos em MC, MC KCl e MM KCl . . . . .	112
65	Características morfológicas, auxotróficas e de produção de enzimas amilolíticas dos segregantes do provável produto de fusão . . . . .	117
66	Características morfológicas, auxotróficas e de produção de enzimas amilolíticas dos segregantes do provável produto de fusão . . . . .	118
67	Análise mitótica do provável produto de fusão . . . . .	119
68	Conteúdo médio de DNA por núcleo ( $\mu\text{g DNA} \times 10^{-8}$ ) das várias linhagens	121
69	Análise da variância dos dados relativos à produção de <u>AG</u> . . . . .	122
70	Comparação das médias da produção de <u>AG</u> . . . . .	122

## L I S T A   D E   F I G U R A S

01	Linhagens isoladas a partir da NRRL 3112 . . . . .	47
02	Esquema adotado para a seleção de linhagens prototróficas puras, utilizando-se o método de isolamento por colônias . . . . .	48
03	Setores produzidos pela linhagem NRRL 3112 em MC contendo Benlate . .	51
04	Setores produzidos pela linhagem <u>Awm</u> 3 em MC e em MC contendo Benlate	51
05	Curvas de sobrevivência das linhagens NRRL 3112 e <u>Awm</u> 3 à luz ultravioleta . . . . .	75
06	Genealogia dos mutantes auxotróficos e morfológicos isolados após tratamento com UV, das linhagens NRRL 3112 e <u>Awm</u> 3 . . . . .	77
07	Curva de sobrevivência da linhagem <u>arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> gre<sub>1</sub></u> ao Brometo de Etídio . . . . .	80
08	Curvas de resistência ao Brometo de Etídio . . . . .	83
09	Setores heterocarióticos formados nos cruzamentos intra-específicos .	86
10	Características morfológicas das colônias heterocarióticas e prováveis diplóides, crescendo em MM contendo prolina . . . . .	89
11	Características morfológicas apresentadas pelas linhagens . . . . .	89
12	Setores produzidos pelos prováveis diplóides em MC contendo Benlate .	92
13	Setores produzidos pelos prováveis diplóides em MC . . . . .	92
14	Curvas de resistência ao Brometo de Etídio . . . . .	95
15	Curva padrão de absorvância em função da concentração de DNA . . . .	97
16	Representação gráfica do diâmetro médio de conídios das linhagens parentais e diplóides e histograma dos diâmetros dos segregantes . . .	102
17	Curva de acúmulo de amiloglicosidase em função do tempo de incubação	104

18	Colônias crescidas em MM KCl . . . . .	113
19	Colônias crescidas por 15 dias em MM . . . . .	114
20	Colônias crescidas por 15 dias em MC . . . . .	114
21	Setores parentais e prototróficos produzidos em MC contendo Benlate (1,5µg/ml) . . . . .	115
22	Setores produzidos pelo provável produto de fusão em MC contendo Benlate (1,5µg/ml) . . . . .	120
23	Segregantes isolados do provável produto de fusão . . . . .	120
24	Bloqueios metabólicos sugeridos para os mutantes . . . . .	129

L I S T A   D E   T A B E L A S   D O   A P Ê N D I C E

A 1	Características morfológicas, auxotróficas e de resistência ou sensibilidade ao Brometo de Etídio dos segregantes espontâneos isolados do diplóide <u>arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>s</sup> bwn<sub>1</sub>//arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sup>r</sup> gre<sub>1</sub> . . .</u>	175
A 2, A 3 e A 4	Características morfológicas, auxotróficas e de resistência ao Brometo de Etídio dos segregantes isolados do diplóide <u>arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>s</sup> bwn<sub>1</sub>//arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sup>r</sup> gre<sub>1</sub> . . . . .</u>	176
A 5, A 6 e A 7	Características morfológicas e auxotróficas dos segregantes isolados do diplóide <u>arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>s</sup> bwn//arg<sub>1</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>s</sup> gre<sub>1</sub> . . . . .</u>	179
A 8, A 9 e A 10	Características morfológicas e auxotróficas dos segregantes isolados do diplóide <u>arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>s</sup> bwn<sub>1</sub>//arg<sub>2</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>s</sup> gre<sub>1</sub> . . . . .</u>	182

## 1. Introdução

Os ciclos de reprodução sexual e parassexual ainda não foram relatados para o fungo filamentoso *Aspergillus awamori* (RAPER e FENNELL, 1965; BONATELLI Jr. e col., 1984; FUNGARO, 1984). Esta espécie tem sido utilizada industrialmente para a produção de amiloglicosidase (E.C. 3.2.1.3.), enzima que promove a sacarificação do amido de vários substratos amiláceos, como por exemplo a mandioca (BANKS e col., 1976). Nesse processo, partindo de extremidades não redutoras, a enzima hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 do amido, liberando unidades de glicose (DIXSON e WEBB, 1962) que, entre outros fins, podem ser utilizadas para a fermentação alcoólica (FAITH e col., 1971; NEVALAINEN e PALVA, 1979).

Parte dos trabalhos envolvendo a amiloglicosidase tem se preocupado em estudar suas características bioquímicas (HAYASHIDA, 1975; BENDETSKII, 1977; SAVELEV e FIRSOV, 1982). Outros, visam a otimização da produção de enzima, quer através do melhoramento das condições ambientais e do meio de cultivo (BARTON e col., 1969; PERSOW e col., 1973; BEKKER e col., 1980), ou através do melhoramento genético do fungo pelo método de mutação e seleção (PARK e SANTI, 1977; NEVALAINEN e PALVA, 1979). Porém, os métodos que envolvem hibridação e recombinação têm sido recomendados nesse caso e não foram ainda aplicados à espécie *A. awamori* pelos motivos já apontados.

Assim, o presente trabalho tem como objetivos principais verificar a ocorrência do ciclo parassexual nessa espécie e testar a produção de amiloglicosidase dos mutantes e diplóides obtidos.

São também objetivos do presente trabalho estudar a possível causa da instabilidade em *A. awamori* e verificar a ocorrência de fusão nuclear interespecífica entre esta espécie e *A. niger*. Para este último caso, serão tentadas as técnicas convencionais baseadas no método de ROPER (1952) e a fusão de protoplastos que permite a fusão citoplasmática e nuclear quando a anastomose de hifas é difícil ou inexistente (PEBERDY, 1979a).

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Os fungos *Aspergillus awamori* e *Aspergillus niger*

Os fungos *Aspergillus awamori* e *Aspergillus niger* são considerados por RAPER e FENNELL (1965) como pertencente ao grupo *niger*. As espécies de *Aspergillus* deste grupo são provavelmente mais comuns do que qualquer outro grupo dentro do gênero. Apresentam ampla distribuição geográfica e ocorrem numa grande variedade de substratos. São abundantes em todos os solos examinados, e, parecem ser particularmente abundante em solos tropicais e subtropicais. Esses fungos se destacam pelo grande valor econômico, sendo largamente utilizados em processos industriais.

Pertencendo a um grupo cujas espécies são bastante heterogêneas, tanto *Aspergillus awamori* Nakazawa quanto *Aspergillus niger* van Tieghen, são descritos como possuindo esterigmas bisseriados quando cultivados em meio de Czapek sólido.

O *Aspergillus niger* apresenta colônias com conídios globosos de aspecto rugoso sem equinulações verdadeiras e coloração negra a olho nu, medindo em torno de 4,0 a 5,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

O *Aspergillus awamori* apresenta conídios com coloração marrom-avermelhada e com diâmetro variando de 4,0 a 4,5  $\mu\text{m}$  e conidióforos medindo de 1,0 a 1,5 mm de comprimento.

Devido a inexistência ou não evidenciação do ciclo sexual, essas duas espécies são classificadas como Deuteromicetos. Como alternativa de recombinação genética, o *Aspergillus niger* apresenta o ciclo parassexual (PONTECORVO e col. 1953a). No caso do *Aspergillus awamori*, não se encontrou na literatura relatos sobre a ocorrência do ciclo parassexual.

### 2.2. Instabilidade genética

Dentre os primeiros casos descritos sobre instabilidade genética, estão os trabalhos realizados com a bactérias *Escherichia coli*. TREFEERS e col. (1954) observaram num variante da linhagem K-12, aumento da taxa de mutação para resistência à estreptomicina. GOLDSTEIN e SMOOT (1955), estudando uma outra linhagem, observaram elevada taxa de mutação para auxotrofia. SKAAR (1955), quando estudava as causas de uma alta taxa de mutação para estreptomicina, identificou um fator mutador (Mut) ligado ao locus da leucina. Ainda *E. coli*, COX e col. (1972) mapearam os genes mutadores, sugerindo que as causas das elevadas frequências de mutação estariam ligadas aos processos de replicação, recombinação e reparo do DNA.

VON BORSTEL e col. (1973), identificaram genes mutadores em diversas linhagens de leveduras. Assim como ocorria em *E. coli*, esses genes provocam alterações de bases, tais como transições, transversões, adições e deleções.

RHOADES (1941), descreve o caso de gene estável  $a_1$  que torna-se altamente instável na presença de um outro gene chamado "Dotted" (dt). Este gene, situado num cromossomo diferente de  $a_1$ , foi chamado de elemento controlador. Estudos mais detalhados neste sentido, realizados por McCLINTOCK (1951, 1953, 1956, 1965) e PETERSON (1960) revelaram que os elementos controladores podem causar tanto instabilidade somática quanto germinativa em milho. Integrando-se a um gene, ou próximo dele, os elementos controladores poderiam inibir a atividade deste gene. Poderiam também modificar simultaneamente a ação de mais de um gene, quando estes estivessem ligados em seqüência no cromossomo. A qualquer momento pode ocorrer excisão dos elementos controladores e a reintegração pode-se dar em qualquer outra parte do genoma.

Estudos dos genes instáveis em *Salmonella typhimurium*, conduzidos por SMITH-KEARY (1958) e DAWSON e SMITH-KEARY (1963), revelaram a existência de três tipos de reversão do gene leu-151, que podem ser distinguidos pelo crescimento em meio mínimo. Um deles denominado "unstable slow" (US), provavelmente se originaria por instabilidade no locus su-leu A. Linhagens US isoladas independentemente podiam apresentar graus de instabilidade muito diferentes. Por analogia aos "elementos controladores" descritos por McCLINTOCK, esses genes instáveis foram chamados epissomos controladores, e também podiam ser transpostos do locus su-leu A para outros.

Além dos genes mutadores encontrados em bacteriófagos, mais de 30 mutadores independentes já foram isolados em bactérias. Eles aumentam a mutabilidade espontânea dos genes, incluindo mutações diretas e reversas. Alguns desses mutadores têm sido localizados no cromossomo bacteriano. Em *E. coli*, são conhecidas três regiões onde os mutadores estão preferencialmente localizados (MOHN e WÜRGLER, 1972).

Em *Proteus mirabilis* estudos indicam ser um transposon o responsável pela resistência à canamicina (BIANCO e col., 1982). NEWTON e col. (1982), observaram alta freqüência de clones auxotróficos quando estudaram populações de diferentes linhagens de *P. mirabilis*, sendo que estes mutantes eram quase sempre deficientes para carbamil fosfato sintetase. Tais mutantes parecem não reverter para a condição de prototrofia. O aparecimento de auxotróficos parece depender da presença de um transposon que após causar deleção do gene carbamil fosfato sintetase pode ou não permanecer na população, mantendo segregações de freqüências variadas.

Em leveduras, alguns dos genes responsáveis pelo aumento da radiosensibilidade apresentaram atividades de mutadores. Uma linhagem sensível à radiação ultravioleta apresentou uma duplicação na taxa de mutação espontânea, enquanto outra linhagem sensível aos Raios X exibiu um aumento de cerca de 50 vezes na taxa de mu

tação espontânea. O aumento parece estar restrito às mutações do tipo adição-deleção (MOHN e WÜRGLER, 1972).

Outros casos de instabilidade genética, interpretados em termos de transposição são os descritos por EGEL (1976) e por GREER e FINK (1979). Estes últimos estudaram o gene *his 4C* ( $C^+$ ) de *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto que EGEL (1976) estudou o locus do tipo de reação sexual em *S. pombe*.

Tanto aberrações cromossômicas quanto estruturais podem causar instabilidade genética.

ROPER (1952), explicou a instabilidade em linhagens diplóides de *Aspergillus nidulans*, como resultante de permutas mitóticas e não disjunção, conduzindo à haploidização. A partir deste trabalho, um grande número de estudos foram realizados nessa espécie, com relação às aberrações numéricas (PONTECORVO e col. 1954; PONTECORVO e KÄFER, 1958; KÄFER, 1958, 1960, 1961).

Os mesmos mecanismos foram evidenciados por PONTECORVO (1952) e PONTECORVO e col. (1953 a) em *Aspergillus niger*, assim como em outras espécies de fungos que apresentam ciclo parassexual (AZEVEDO, 1976).

Linhagens aneuplóides de *A. nidulans* foram estudadas intensamente e mostraram-se instáveis, apresentando elevada frequência de perdas cromossômicas espontâneas (BALL e AZEVEDO, 1976). Em *Saccharomyces cerevisiae*, PARRY e COX (1970) e SHAFFER e col. (1971), relataram tolerância à aneuploidia em linhagens com o grupo de ligação III, V, IX e XIII em duplicatas.

Aberrações estruturais foram descritas por NEWMAYER (1975) e NEWMAYER e TAYLOR (1967) em *Neurospora*. Os autores estudaram um caso de instabilidade associada à inversão paracêntrica. A ocorrência de permuta dentro da região invertida dava origem a dois produtos recíprocos: um duplicado 100% e outro letal, deficiente para o mesmo segmento. Análises preliminares sugeriram que a segregação somática se devia algumas vezes à permuta mitótica e outras vezes à perda do material duplicado.

NEWMAYER e GALEAZZI (1977) estudaram a instabilidade e seu controle genético em linhagens de *Neurospora* com duplicação. NEWMAYER e GALEAZZI (1978) e NEWMAYER e col. (1978), observaram que alguns mutantes de *Neurospora* apresentaram um aumento na instabilidade das duplicações. O mutante *mei-3*, dentre outros efeitos, aumenta a instabilidade de duplicação que não sejam em tandem, sendo este efeito mais marcante a 25°C. Dois outros mutantes (*uvs-3* e *uvs-6*) também têm a instabilidade aumentada devido à permuta mitótica, deleções ou a ambos os mecanismos. A instabilidade das duplicações é aumentada pela presença de histidina no meio de cultura, mesmo na ausência de mutação conferindo sensibilidade à luz ultravioleta.

BAINDRIDGE e ROPER (1966), estudando fatores genéticos que influenciavam a morfologia de certas linhagens de *A. nidulans*, evidenciaram um novo processo espontâneo de instabilidade. Seus estudos basearam-se num variante com colônias de aspecto enrugado (Crinkled), originado do cruzamento de duas linhagens normais, sendo que uma delas apresentava translocação não recíproca de um segmento do cromossomo III para o VIII. Esse variante era portador de uma duplicação cromossômica e possui uma taxa de crescimento reduzida. Apresentava ainda instabilidade vegetativa, produzindo setores com crescimento vigoroso e morfologia semelhante às linhagens normais. A origem desses setores, provavelmente se devia à perda do segmento em duplicata.

A linhagem A de *A. nidulans*, portadora de uma duplicação de um segmento do grupo de ligação I translocado para o grupo de ligação II (NGA e ROPER, 1968), constituiu-se em material mais apropriado para estudos genéticos. Possuindo marcadores para coloração de conídios localizados na região duplicada, além de marcas para requisitos nutricionais, a linhagem A pode dar origem a setores:

- a. melhorados: de morfologia e crescimento semelhantes à linhagem normal não duplicada. Esses variantes se originam pela perda parcial ou total, do segmento em duplicata. A perda parcial pode ser intersticial, e ocorre com maior frequência no segmento translocado. Dependendo do segmento em duplicata que é perdido, se no grupo de ligação I ou II, os setores formados são verdes ou amarelos.
- b. deteriorados: com grau de instabilidade maior ou menor do que a linhagem com duplicação, eles apresentam textura e coloração variáveis. Podem se originar por inversão, novas duplicações em tandem ou transposição do segmento duplicado (NGA e ROPER, 1968; AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971). Segundo BIRKETT e ROPER (1977), não há evidências marcantes da existência de duplicações em tandem, mas as não em tandem são conhecidas e têm sido a principal fonte de informações sobre deleções.
- c. heterocarióticos: apresentam uma mistura não usual de conidióforos com conídios verdes e amarelos. Um único conidióforo pode ter conídios verdes e amarelos. Ocorrendo em baixa frequência, esses setores heterocarióticos podem ter um de seus componentes letais, que devem surgir pela deleção de um segmento maior do que o duplicado (ROPER e NGA, 1969).

NGA e ROPER (1969), para caracterizar a instabilidade cromossômica na mitose propuseram o termo "não conformidade mitótica". Observaram que a insta

bilidade era produzida pelo não balanceamento cromossômico e que as mudanças genéticas típicas estavam restritas aos próprios segmentos. CASE e ROPER (1981) observaram que diplóides heterozigotos para a duplicação IR → IIR sofrem deleções, mas, o restabelecimento do balanço genômico se deve mais frequentemente à permuta mitótica, processo que elimina o segmento translocado. Nos diplóides homozigotos para a mesma duplicação, os autores verificaram uma extrema instabilidade para os segmentos presentes em quadruplicata, cuja estabilidade é restabelecida por deleção e não por permuta mitótica. Apesar de terem analisados poucos variantes desses diplóides homozigotos, foi observado que as deleções ocorrem preferencialmente em posições diferentes das verificadas para as linhagens duplicadas haplóides.

SEXTON e ROPER (1984) obtiveram revertentes espontâneos do mutante "leaky" adE 20 de *A.nidulans*. Quando analisados geneticamente, observou-se que cerca de 20% dos revertentes espontâneos podiam ser inequivocamente reconhecidos como tendo um segmento cromossômico adicional na região do gene adE 20. Um total de onze linhagens com duplicação espontânea foram analisadas geneticamente. Os resultados sugeriram um sítio preferencial para a iniciação dos segmentos duplicados, assim como um sítio preferencial de ligação.

AZEVEDO e ROPER (1970) verificaram que a instabilidade dos setores morfológicos deteriorados, obtidos a partir de linhagens com duplicação IR → IIR, poderia ser tentativamente explicada por novas duplicações ocorrendo em um ou no outro segmento em duplicata. Um aumento na estabilidade é obtida quando todo o material genético extra, ou parte dele, é transposto para um outro sítio do genoma onde não haja duplicação. Na maioria dos casos analisados, os determinantes de mudanças morfológicas segregaram como gene simples e foram chamados de determinantes de deterioração.

MENEZES (1974) obteve variantes deteriorados espontâneos e, induzidos por luz ultravioleta e DNA exógeno, a partir da linhagem com duplicação IR → IIR. MENEZES e AZEVEDO (1978), estudaram seis reversões obtidas a partir de variantes originados da linhagem com duplicação IR → IIR. Através de análise genética concluíram que cinco delas eram devidas a supressores e uma era provavelmente causada por mutação reversa. Verificaram também, que esses supressores segregavam como genes simples e não estavam ligados aos genes que suprimiam.

ZUCCHI (1975) e ZUCCHI e AZEVEDO (1979), a partir de linhagens possuindo duplicações III → VIII, obtiveram espontaneamente e analisaram, setores deteriorados conspícuos e seus derivativos. Foi observado que esses setores possuíam uma alta taxa de permuta mitótica e que a deterioração podia estar associada à deleção nos segmentos em duplicata, embora em dois casos os determinantes de deterioração

tenham sido localizados em grupos de ligação que não estavam envolvidos na duplicação original.

BIRKETT e ROPER (1977), estudando setores deteriorados obtidos a partir de uma linhagem com duplicação III → VIII, sugeriram que nos principais genótipos isolados a partir de um único setor deteriorado, o evento inicial era uma deleção. Esta, deixava um locus aderente ("sticky") que provoca permuta mitótica originando assim, vários tipos de fenótipos deteriorados.

Agentes químicos, físicos e mesmo fatores genéticos podem alterar o padrão normal de instabilidade de linhagens com duplicações cromossômicas.

Certas substâncias como o azul de tripan (COOKE e col., 1970), cafeína, atebrina e verde malaquita (PALMER e ROPER, 1970), etilmetano sulfonato (ROSATO e AZEVEDO, 1978), DNA exógeno (MENEZES, 1974), Chloroneb (AZEVEDO e col., 1977) e curarina (MAJERGELD e ROPER, 1978), aumentam a instabilidade de linhagens com duplicação. Efeito semelhante é também causado por genes que conferem sensibilidade à luz ultravioleta (BURR e col., 1982).

Alguns compostos, como a cicloheximida, cristal violeta, acriflavina, metano, 6-aminonicotinamida, não afetam o nível de instabilidade (PALMER e ROPER, 1970). Já o Brometo de Etídio (BONATELLI e AZEVEDO, 1977), 1-4-oxathiin (AZEVEDO e col., 1977) e  $Mn^{2++}$  (BURR e col., 1982), reduzem a instabilidade.

Os genes chamados de *stf-1* (AZEVEDO, 1975) e *bin A<sub>1</sub>* (PIZZIRANI-KLEINER, 1981) são relatados como causadores de redução da instabilidade em linhagens com duplicação cromossômica. A luz ultravioleta também influencia na instabilidade dessas linhagens (MENEZES, 1974; AZEVEDO, 1975, PARAG e ROPER, 1975).

A temperatura é uma variável ambiental das mais importantes e seu efeito tem sido observado em diferentes organismos há várias décadas. NGA e ROPER (1968), observaram que a 34 e 42°C, a instabilidade vegetativa das linhagens enrugadas portadoras de duplicação cromossômica, era maior do que a 37°C. Ainda em *A. nidulans*, LIEBER (1976 a), observou que a maioria das deleções em linhagens duplicadas, ocorre no segmento duplicado translocado, e sua frequência total depende da temperatura de crescimento. Existe uma série de outros trabalhos mostrando a influência da temperatura nessa espécie, entre elas, os de BIRKETT e ROPER (1975), LIEBER (1976 b), NIFINEGGER e SOUZA (1979), PIZZIRANI-KLEINER e AZEVEDO (1986) e OLIVEIRA (1982).

GABRIELLI e AZEVEDO (1980), utilizando o variante deteriorado *V<sub>58</sub>*, concluíram que a variação na temperatura não influenciava na frequência da produção de dissômicos.

JINKS (1966), explicou certo tipo de instabilidade em *A. nidulans*, como causado por fatores citoplasmáticos.

A instabilidade em microorganismos de interesse industrial, tem sido largamente relatada. Neste caso, a instabilidade poderia ser separada em dois tipos. No primeiro tipo, ela ocorreria devido a variações na produção de uma mesma linhagem quando são feitas diversas fermentações, sendo caracterizado por flutuações na produção. Este fenômeno poderia ser explicado pela sensibilidade da linhagem com relação às diferenças, mesmo que pequenas, na composição química do meio de fermentação ou de cultura, ou ainda, por diferenças nas condições das repetições, como a presença de substâncias contaminantes, variações de temperatura, pH, etc..., que possam afetar a acumulação do produto desejado. Dentro desse primeiro tipo de instabilidade, encaixam-se os trabalhos de GARDNER e col. (1956) e MILLIS e col. (1963) em *Aspergillus niger*, BALL (1973) em *Penicillium chrysogenum* e MERRICK (1975) em *A. nidulans*.

O segundo tipo de instabilidade, se daria devido ao aparecimento, em determinada linhagem, de derivativos com produção alterada, frequentemente com diminuição acentuada da produção. Diversas podem ser as causas desse fenômeno. YUILL (1953), observou o aparecimento de dois mutantes numa linhagem de *A. niger*, sendo que um deles tinha taxa de crescimento e produção de ácido cítrico reduzidas. HAAS e col. (1956), consideram a heterocariose como causa da instabilidade numa linhagem de *P. chrysogenum* com alta produção de penicilina. REUSSER e col. (1961), atribuíram ao mesmo fenômeno, a diminuição na produção de novobiocina em linhagens de *Streptomyces niveus*. MACDONALD (1968), constatou o aparecimento de colônias com baixa produção de penicilina em *P. chrysogenum*, após estocagem e transferência em série. Concluiu que a causa da baixa produção estava sob o controle nuclear. MAYNE e col. (1971), sugeriram que um fator citoplasmático presente no micélio e não nos esporos, estaria causando redução na produção de aflatoxina em linhagem de *A. parasiticus*.

BALL (1971), estudando *P. chrysogenum*, verifica instabilidade associada a um fator cromossômico. Sugere uma similaridade ao observado por BAINDRIDGE e ROPER (1966) e NGA e ROPER (1968) em *A. nidulans*.

BONATELLI JR. (1978) sugere como possível causa da instabilidade na linhagem 10 V 10 de *A. niger*, a heterocariose, tendo em vista a produção de setores por colônias desenvolvidas em meio mínimo e a não produção dos mesmos em meio completo, assim como a baixa viabilidade dos conídios em meio mínimo.

BALL e AZEVEDO (1976), discutem diversas causas de instabilidade em fungos com ciclo parassexual. Citam que, em fungos de interesse industrial, a instabilidade tanto pode ser indesejável, quando produz variantes de baixa produção, quanto desejável, quando utilizada para a recombinação de características consideradas de interesse. Destacam a grande instabilidade que é característica de aneu

plóides e linhagens com duplicações parciais de genoma.

CHANG e TUVESON (1975) estudaram o mutante morfológico  $B_{42}$ , obtido a partir da linhagem Bode de *Aspergillus foetidus*, utilizando a nitrosoguanidina como agente mutagênico. Contrastando com os conídios pretos produzidos pela linhagem Bode, o mutante  $B_{42}$  possui conídios de coloração amarelo camurça, e conidiação visivelmente reduzida. Foi observado que quando conídios do mutante  $B_{42}$  eram semeados em meio completo, surgiam dois tipos básicos de colônias: uma exibindo densa esporulação e micélio amarelo claro (tipo I) enquanto que a outra tinha esporulação menos densa e micélio amarelo escuro (tipo II). Verificaram os autores que conídios produzidos por colônias do tipo II eram todas deficientes para prolina e que as colônias do tipo I eram instáveis, produzindo variadas proporções de conídios  $pro^+$  e  $pro^-$ , não tendo sido possível isolar a partir de conídios uma colônia estável do tipo I. A linhagem Bode quando testada, também exibiu colônias do tipo I e tipo II. Uma relação inversa entre quantidade de conídios tipo II e produção de AG foi verificada, ou seja, quanto maior a proporção conídios  $pro^-$  produzida por uma linhagem, menor será sua produção de AG.

Verificaram também que conídios derivados do tipo I são um pouco mais resistentes à luz ultravioleta e ao calor. Constataram que as linhagens Bode e  $B_{42}$  produzem setores espontaneamente e que a frequência destes aumenta quando cafeína é adicionada ao meio de cultivo, mas permanece inalterada na presença de pFA. Trinta setores foram isolados e testados, sendo que cinco deles formaram setores secundários. Os autores sugerem como explicação da instabilidade, a duplicação parcial do genoma, uma vez que segregantes estáveis do tipo I e II puderam ser isolados como setores a partir das linhagens de crescimento reduzido Bode e  $B_{42}$ . As linhagens duplicadas teriam provavelmente uma duplicação cromossômica no segmento contendo o gene prolina. Se um segmento fosse  $pro^+$  e outro  $pro^-$ , a perda de  $pro^-$  resultaria em linhagens estáveis  $pro^+$  enquanto que a perda do segmento  $pro^+$  daria linhagens  $pro^-$  estáveis. Os autores não conseguiram explicar no entanto, a impossibilidade de se isolar espontaneamente linhagens estáveis do tipo I, a partir de conídios.

FUNGARO (1984) estudando as linhagens ATCC 22342 de *A. awamori* e ATCC 22343 de *A. niger*, observou que elas segregavam espontaneamente conídios com deficiência para prolina ou arginina. Concluiu que a causa de tal fenômeno nessas espécies era a heterocariose, uma vez que a separação de colônias prototróficas, auxotróficas e proto/auxotróficas foi conseguida.

### 2.3. Ciclo parassexual em fungos

Este ciclo é uma alternativa de recombinação apresentada pelos fungos Deuteromicetos e, desde sua descoberta em *A. nidulans* por PONTECORVO e ROPER (1952) vem sendo intensivamente estudado.

Segundo PONTECORVO (1956), o ciclo parassexual é caracterizado pela seguinte sequência de eventos: fusão de núcleos haplóides, permuta mitótica e haploidização. Evidências de que o primeiro evento seja passível de ocorrer na natureza, são dadas pelos trabalhos de NGA e col. (1975) em *A. niger*, WHELAN e MAGEE (1981) em *Candida albicans* e UPSHALL (1981) em *A. nidulans*. Linhagens diplóides isoladas da natureza podem apresentar letalidade condicional (WHELAN e SOLL, 1982 e ROBERTS e UPSHALL, 1980).

O aparecimento de diplóides somáticos por fusão de núcleos haplóides caracteriza fase importante do ciclo parassexual, porém, a origem dos diplóides pode também ser devida a falhas no processo mitótico ou meiótico.

Ao contrário dos diplóides homocigotos que podem ser originados por fusões de núcleos ocorridas espontaneamente nos processos de divisão celular, diplóides heterocigotos de genótipo conhecido são utilizados em análises genéticas. A obtenção destes diplóides é o objetivo primordial de estudos normalmente conduzidos em condições de laboratório.

O processo inicial para formação de diplóides somáticos, é a obtenção de mutantes auxotróficos e/ou morfológicos. Esses mutantes são conseguidos mais facilmente em espécies com abundante produção de esporos, preferencialmente unicelulares que também, apresentam crescimento em meios de cultura de composição definida.

O procedimento usual de isolamento de mutantes auxotróficos consiste em avaliar individualmente grande quantidade de sobreviventes ao tratamento com mutagênico. Entretanto, métodos mais eficientes podem ser utilizados, principalmente em linhagens onde a frequência de isolamento de mutantes auxotróficos é baixa, como por exemplo, em espécies com conídios multinucleados.

O método de enriquecimento por filtração foi primeiramente utilizado em *Ophiostoma multiannulatum* por FRIES (1947), e consiste em inocular conídios submetidos a tratamento mutagênico em meio mínimo líquido e a seguir, remover por repetidas filtrações, as hifas dos esporos germinados. Para tanto, utilizou algum tipo de filtro estéril. Este método foi utilizado com sucesso em *Neurospora* (WOODWARD e col., 1954; CATCHESIDE; 1954), *Coprinus lagopus* (DAY e ANDERSON, 1961), *Schizophyllum commune* (ANDERSON e DEPPE, 1977), *Metharhizium anisopliae* (SILVEIRA, 1983) e em *A. niger* e *A. awamori* (FUNGARO, 1984).

Após a obtenção e caracterização dos mutantes auxotróficos e morfológicos, e também, após ter-se verificado frequências de reversões adequadas, deve-se proceder à formação de heterocários entre linhagens complementares para requisitos nutricionais. A heterocariose pode se originar pela anastomose de hifas adjacentes e migração de núcleos de uma hifa para outra (ROPER, 1952), ou por mutação

(ISHITANI e SAKAGUCHI, 1956; TINLINE, 1962; CUNHA, 1969). Os processos de anastomose de hifas e heterocariose foram objeto de revisões por CATEN e JINKS (1966), DAVIS (1966) e TINLINE e MACNEILL (1969).

Como consequência da proximidade de núcleos diferentes no mesmo citoplasma, existe a possibilidade de ocorrer a fusão de núcleos ou cariogamia, originando diplóide somático heterozigoto. A frequência desse evento é normalmente baixa (1 diplóide por  $10^4$  a  $10^7$  conídios coletados de heterocários) mas, pode ser aumentada com a utilização de agentes físicos como a luz ultravioleta (ISHITANI e col., 1956) ou agentes químicos como a colchicina (SHCHERBAKOVA e RESVAYA, 1978), cânfora (PONTECORVO e col., 1953 a, 1953 b; ROPER, 1966). Em *A. niger*, PONTECORVO e col. (1953 a), verificaram que o tratamento com cânfora era desnecessário devido à alta frequência de diplóides obtida espontaneamente.

Os diplóides somáticos heterozigotos assim obtidos assemelham-se às linhagens selvagens com relação às características morfológicas e nutricionais, porém devem ser observados outros critérios para confirmação da condição diplóide, tais como: a) conteúdo de DNA dos núcleos; b) contagem do número de cromossomos; c) segregação da marca genética em heterozigose; d) volume celular e nuclear; e) sensibilidade à luz ultravioleta; f) mutabilidade; g) número de núcleos em conídios; h) sensibilidade ao fungicida Benlate; i) forma e diâmetro da vesícula dos conióforos, etc... Esses critérios podem fornecer boas evidências ou confirmar a condição diplóide da linhagem isolada.

Em muitas espécies, como é o caso de *A. nidulans*, o volume dos conídios da linhagem diplóide é aproximadamente o dobro do das linhagens haplóides. Em outros casos, essa relação não é observada, sendo impossível separar conídios haplóides dos diplóides pelo volume (IKEDA e col., 1957 em *A. sojae*; HOLLIDAY, 1961 em *Ustilago maydis*; TINLINE, 1962 em *Cochliobolus sativus*; PAPA, 1973 e MESSIAS, 1977 em *A. flavus* e PAPA, 1978 em *A. parasiticus*). ISHITANI e col. (1956) verificaram que em *A. sojae* e *A. oryzae*, apesar de não haver diferença em relação ao volume dos conídios, diplóides podiam ser separados de haplóides pela frequência do número de núcleos por conídio. Resultados semelhantes são reportados por MESSIAS e AZEVEDO (1980).

A condição diplóide permite a formação de recombinantes que surgem por permuta mitótica e/ou não disjunção mitótica, eventos que podem ser seguidos ou não pela haploidização.

A permuta mitótica, descrita por STERN (1936) sem *Drosophila*, foi estudada por ROPER e PRITCHARD (1955) e PONTECORVO e KÄFER (1958) em *A. nidulans*. Esses autores concluíram que o fenômeno é raro, ocorrendo uma vez em cada 500 mitoses e se dá no estágio de 4 fios. Forma também produtos recíprocos e permite a formação

de núcleos homozigotos para alelos ligados e distais em relação ao ponto de permuta. Isto ocorre com os marcadores proximais e marcas genéticas em outros cromossomos continuando em heterozigose. Neste tipo de análise, podem ser estabelecidas as ordens dos genes e posição do centrômero num braço cromossômico. Mas, segundo ROPER (1966), existem limitações, pois com esse fenômeno não se pode ter idéia da associação dos genes em relação a outros grupos de ligação e também há necessidade das marcas seletivas distais serem recessivas ou semi-dominantes. Uma avaliação rápida das freqüências de recombinação, como ocorre nas análises mitóticas, também não é possível.

De acordo com KÄFER (1960, 1961), a ocorrência de segregantes haplóides, diplóides e aneuplóides são devidas às perdas sucessivas de cromossomos (não disjunção mitótica) que originariam diversos estados aneuplóides instáveis como os hiperdiplóides ( $2n + 1$ ) e os hiperhaplóides ( $n + 1$ ).

Uma série de substâncias com efeito haploidizante têm sido descobertas. Os primeiros relatos nesse sentido foram feitos para a espécie *A. niger*, onde o agente utilizado foi *p*-fluorfenilalanina (pFA) (LHOAS, 1961; MORPURGO, 1961; LHOAS, 1968). Depois de sua descoberta, o pFA vem sendo utilizado como agente haploidizante em várias espécies de fungos, e sua possível influência na seleção de marcas auxotróficas também tem sido reportada (BALL, 1971; PAPA, 1976; BRADSHAW e col. 1983). Outras drogas utilizadas como agente haploidizante são a N-glicosil polifungina (BALL e col., 1975), Griseofulvina (KAPPAS e GEORGOPOULOS, 1974), Cloroneb (KAPPAS e GEORGOPOULOS, 1975; AZEVEDO e col., 1977), fungicidas benzimidazólicos e thiophanato (KAPPAS e col., 1973), Botran, PCNB e SOPP (KAPPAS e GEORGOPOULOS, 1975) e BENOMYL (HASTIE, 1970). Este último, tem sido utilizado para separar linhagens haplóides e diplóides (UPSHALL e col., 1976; BRADSHAW e col., 1983; BONATELLI JR. e col. 1983).

NÜESCH e col. (1973) e BALL e HAMLIN (1978), estudando *Acremonium chrysogenum* (*Cephalosporium acremonium*), observaram que no processo de seleção dos diplóides eram obtidas duas classes de colônias prototróficas. Na primeira classe, as colônias eram estáveis, não segregando nenhuma das marcas genéticas envolvidas no cruzamento, mesmo utilizando-se pFA ou raios gama. A segunda classe, ocorreria apenas em alguns cruzamentos e, era composta por colônias prototróficas instáveis, que segregavam pelo menos uma das marcas genéticas envolvidas no cruzamento. Os resultados foram confirmados e ampliados com a utilização da técnica de fusão de protoplastos, pois puderam ser isolados, com o uso de meios seletivos, colônias recombinantes sem que fosse constatada a presença de diplóides. Estes resultados sugerem que o estado diplóide é transitório, como ocorre na meiose, apresentando segregação cromossômica e permuta mitótica em alta freqüência. Pode ser dito que

este fenômeno, observado em *A. chrysogenum*, apresenta-se como exceção à sequência de eventos do ciclo parassexual. Um outro exemplo foi o estudado por CALAM e col. (1973) em *Penicillium patulum*, onde foi constatada a formação de prototróficos estáveis com raros segregantes haplóides, tornando-se difícil a interpretação desses resultados uma vez que critérios inequívocos para se estabelecer a natureza haplóide ou diplóide das linhagens não haviam sido estabelecidos. Fenômeno similar foi constatado em *A. niger* por BONATELLI JR. e col. (1983) e, recebeu a denominação de parameiose.

Além de sua importância como fonte de variabilidade, o ciclo parassexual favorece certos estudos de ordem genética. Podem ser citados o mapeamento genético em fungos imperfeitos (AZEVEDO, 1972, 1976), as interações gênicas alélicas ou não, sendo o estado diplóide importante modelo para o estudo de regulação gênica em eucariotos (revisão em SMITH e PATEMAN, 1977), a instabilidade genética (AZEVEDO, 1972, 1976), o melhoramento de características de interesse econômico (SERMONTI, 1969; BONATELLI JR., 1977, MESSIAS, 1979; BRADSHAW e col. 1983; UMBUZEIRO VALENT, 1985) e estudos da origem e relações genéticas entre raças fisiológicas de fungos fitopatogênicos (BUXTON, 1956, 1962; AZEVEDO, 1976). Através da análise mitótica, pode-se também estabelecer o número de grupos de ligação de uma determinada espécie. Assim, foram atribuídos seis grupos de ligação para *A. niger* (LHOAS, 1967), sete para *A. flavus* (PAPA, 1976) e quatro para *Humicola* (BERTOLDI e CATEN, 1975).

Além das 41 espécies de fungos filamentosos, pertencentes a vários gêneros, nas quais a parassexualidade foi demonstrada (AZEVEDO, 1976; MESSIAS, 1979), outras espécies têm sido relatadas como possuindo este ciclo (RIBA e RAVELOJOANO, 1984). POULTER e col. (1981), demonstraram pela primeira vez a ocorrência de ciclo parassexual em *Candida albicans*, utilizando-se a técnica de fusão de esferoplastos. Foi evidenciado que nessa espécie o ciclo parassexual deve ocorrer no sistema  $2n \times 2n \rightarrow 4n \rightarrow 2n$ .

#### 2.4. A enzima amiloglicosidase

A enzima amiloglicosidase ou glucoamilase (AG) (E.C. 3.2.1.3.) hidroliza ligações alfa 1,4 e alfa 1,6 do amido, removendo unidades de glicose a partir das extremidades não redutoras das cadeias. Portanto a maltose, a amilose e a amilopectina são totalmente convertidas em glicose por esta enzima (DIXON e WEBB, 1962; BARMAN, 1969).

A demonstração de que a AG atua nas extremidades das moléculas de amido liberando somente glicose como produto final, foi conseguida por KERR e col. (1951)

e PAZUR e ANDO (1959) quando estudaram a ação da AG sobre amilose e amilopectina em *A. niger*. Em 1962, essa enzima foi purificada por PAZUR e KLEPPE; que também determinaram seu modo de ação e seu peso molecular aproximado ( $97000 \pm 5\%$ ).

FLEMING e STONE (1965), LINEBACK (1968), FINCH e LEONARD (1978), SVENSSON e col. (1982) e RAMANESH e col. (1982) estudando *A. niger* mostraram a existência das formas I e II de AG, as quais segundo MANJUNATH e RAO (1980) são imunologicamente idênticas.

MOHSIN e col. (1979 a, b, c) estudando a produção de AG por algumas espécies do gênero *Aspergillus*, purificaram esta enzima de *A. foetidus* e *A. awamori* e fizeram seu fracionamento.

As formas I, II, III de AG com respectivos pesos moleculares de 76000, 38000 e 3800, foram identificadas em *A. oryzae*. A seguir, a ação das três diferentes formas de AG foram estudadas em diferentes substratos (MIAH e UEDA, 1977a, b). SAHA e col. (1979), além de estudarem isoladamente a forma I, mostraram que as formas apresentavam-se na seguinte proporção: 5I(I); 3II) e 1(III). RAZZAQUE e UEDA (1978), estudando outra linhagem de *A. oryzae* com alta produção de AG; observaram que ela também produzia três formas de AG, porém diferentes das relatadas anteriormente, apresentando baixa capacidade na digestão do amido cru.

Em *Rhizopus* sp, TAKAHASHI e col. (1978), também purificaram três formas de AG, estudando suas propriedades.

Em 1982, HAYASHIDA e col. evidenciaram um sítio de afinidade para amido cru na AG I de *A. awamori*.

UEDA e KOBAYASHI (1973) descobriram um composto produzido por uma linhagem de *Streptomyces* sp nº 280, capaz de inativar algumas amilases. De pequeno peso molecular, esse composto age como inibidor de glucoamilase, alfa-amilases pancreática e salivar e alfa-amilase de bactérias. O inibidor mostrou um efeito acentuado sobre glucoamilase de *Rhizopus*, inibindo 72,2% da atividade. Sua ação na amilase de *Aspergillus* causa apenas 8,3% de inibição. Esse composto foi purificado por NAKANISHI e col. (1981) e se revelou complexo, apresentando pelo menos duas frações principais; uma que se comporta como oligossacarídeo de grupamento amilo livre e outra, é provavelmente um glicopeptídeo. NEDDA e col. (1981) estudaram a ação do inibidor descrito acima, contra glucoamilase I purificada de *Aspergillus*. Uma inibição de 97% foi conseguida quando a concentração de 1,6 µg/ml do inibidor foi utilizada em 1,8 U da enzima. UMBUZEIRO VALENT (1985) verificou que em linhagens de *A. niger*, a presença de 7,0 µg/ml do inibidor é suficiente para causar uma inibição da atividade enzimática da ordem 60%. Esse índice sobe para 80% com o uso de 23,0 µg/ml do inibidor.

LE MENSE e col. (1974) testaram 278 culturas do gênero *Aspergillus* e verificaram que o melhor produtor de enzima dextrinizante (AG) era a linhagem NRRL 337 de *A. niger*. Fatores que afetavam a produção também foram estudados. Em 1964, SMILEY e col. mostraram que a linhagem NRRL 3112 de *A. awamori* produzia mais AG que NRRL 337 de *A. niger*. CADMUS e col. (1966), constataram que as linhagens NRRL 3112 de *A. awamori* e NRRL 3122 de *A. niger* apresentaram maior eficiência na digestão do amido, do que a linhagem NRRL 337. Observaram também que isso se devia a menor atividade de transglicosidase, enzima responsável pela polimerização de unidades de glicose em oligossacarídeos.

Vinte linhagens de fungos obtidas de vários laboratórios e dez linhagens pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*, isoladas a partir de amostras de solo foram examinadas quanto à produção de amiloglicosidase. Dessas, somente sete eram produtoras de enzima, sendo que as linhagens NRRL 3112 de *A. awamori* e NRRL 3122 de *A. niger* produziram-na em grandes quantidades (PARK e DE LIMA, 1972).

KVESITADZE e col. (1981 a) testaram 42 linhagens verdes e 111 pretas, todas pertencentes ao gênero *Aspergillus*, e verificaram que somente as pretas produzem AG. Entre essas, a maioria das boas produtoras eram linhagens *A. awamori* e *A. niger*.

Os mutantes auxotróficos são essenciais para estudos de recombinação em microorganismos e podem determinar ganho, perda ou não alteração na produção dos metabólitos (revisões em SERMONTI, 1969; DEMAİN, 1973; HOPWOOD e MERRICK, 1977).

BONNER (1947), estudando *Penicillium notatum* observou que em relação aos mutantes auxotróficos, os deficientes para lisina, em 25% dos casos, foram os que apresentaram síntese defectiva de penicilina.

Em *Streptomyces rimosus*, trabalhos conduzidos por ALIKHANIAN e col. (1959) indicam que mutantes deficientes para metionina e nicotinamida, reduzem a produção de terramicina apenas se os compostos forem adicionados em baixas concentrações no meio de fermentação. No caso do mutante deficiente para nicotinamida, a redução é de 8 a 28% em relação à linhagem original. Foi verificado também que a adição em excesso de vitamina no meio de fermentação causa um aumento na produção de 93 para 144%.

FANTINI E OLIVE (1960) e FANTINI (1962) estudaram *Emericellopsis salmosy nemata* e verificaram que as deficiências nutricionais reduzem acentuadamente a produção de cefalosporina N (penicilina N).

ALIKHANIAN e BORISOVA (1961) estudando recombinação em *Streptomyces aureofaciens* observaram que a maioria dos mutantes auxotróficos isolados era deficiente para arginina e usualmente não acumulavam tetraciclina, enquanto que um mutante deficiente para isoleucinavalina produzia cerca de 1/10 da linhagem paren

tal. Alguns mutantes para cisteína, metionina e arginina, produzindo 5-10% menos também foram obtidos em trabalho posterior JÁRAI (1961, apud SERMONTI, 1969).

POLSINELLI e col. (1963) relatam que em *Streptomyces antibioticus*, a queda significativa na produção de actinomicina ocorre somente com deficiência na síntese de aminoácidos encontrados na molécula do antibiótico. Porém, em *P. chrysogenum* (MACDONALD e col. 1963) e em *A. niger* (BONATELLI JR., 1977) há perda em relação a produção de penicilina e ácido cítrico, respectivamente. Essa perda é observada em mutantes deficientes para a síntese de adenina, a qual aparentemente, não está relacionada com a síntese dos metabólitos citados.

MUSÍLKOVÁ e FENCL (1970) verificaram em *A. niger* que mutantes deficientes para arginina produziam cerca de 14% a mais de ácido cítrico que a linhagem parental, enquanto que mutantes deficientes para vitaminas e mutantes deficientes para aminoácidos e bases nitrogenadas tiveram a mesma ou menor produção, respectivamente. Observaram ainda uma relação entre a menor produção de ácidos e o menor crescimento das linhagens.

ILCZUK (1971) verifica também em *A. niger*, diminuição da produção de ácido cítrico, em mutantes deficientes para niacina, piridoxina, tiamina e ácido fólico.

CHANG e TERRY (1973) observaram através da formação de heterocários e diplóides, que mutantes auxotróficos de *A. niger*, exceto dois deficientes para metionina e histidina, produziram menos ácido cítrico que a linhagem parental em meio de fermentação suplementado com 250 µg/ml da substância requerida. Também as marcas morfológicas podem influir na produção. ILCZUK (1968) e LOCKWOOD (1975) em *A. niger* e SERMONTI (1969) em *P. chrysogenum* demonstraram isso, estudando mutações para coloração de conídios.

Linhagens diplóides obtidas por métodos diversos em diferentes espécies, bem como os segregantes conseguidos a partir dessas linhagens, têm sido alvo de muitos estudos no que se refere à produção de metabólitos de interesse industrial. Considerando diplóides homocigotos, os conseguidos do cruzamento de mutantes obtidos de uma única linhagem parental, apenas em dois trabalhos foi obtido ganho significativo na produção (ELANDER, 1966 apud SERMONTI, 1969; DAS e ROY, 1978). Nos demais casos, a produção foi similar ou inferior às linhagens parentais. Certas características, como por exemplo maior estabilidade, pode ser de grande utilidade na produção. Resultados nesse sentido foram obtidos por TAVARES e AZEVEDO (1974) e BONATELLI JR. (1978).

Considerando diplóides heterocigotos como aqueles sintetizados entre linhagens divergentes por muitos passos de tratamento com mutagênicos ou entre linhagens isoladas independentemente após tratamento com mutagênico para obtenção de mu

tantes com produção elevada ou entre linhagens com diferentes origens, ganho de produção pode ser observado em alguns cruzamentos descritos nos trabalhos de SERMONTI (1969), BALL (1973) e TAVARES e AZEVEDO (1974). MACDONALD (1966), obteve duas classes de diplóides: uma de baixa produção de penicilina (300 - 1200 µg/ml) e outra de alta produção (3000 a 3500 µg/ml) em *Penicillium chrysogenum*.

BALL e HAMLIN (1978) estudando segregantes do cruzamento entre linhagens de *Acremonium chrysogenum*, verificaram que um deles produzia 40% mais cefalosporina C que a linhagem parental mais produtiva.

RUDD e HOPWOOD (1979), estudando *Streptomyces coelicolor*, obtiveram 76 mutantes incapazes de produzir o antibiótico "actinorhodin". Eles foram divididos em 7 classes fenotípicas levando em consideração a síntese de antibiótico, acúmulo de pigmentos ou produtos precursores. Um membro de cada classe mutante foi mapeado num pequeno segmento entre os loci his D e qua A, tendo sido sugerido que os genes estruturais para a biossíntese da "actinorhodin" podem formar um agregado gênico.

YAMASHITA e FUKUI (1984) utilizando etilmetanosulfonato (EMS) como agente mutagênico, isolaram mutantes de *Saccharomyces diastaticus* que não produziam amiloglicosidase (amy<sup>-</sup>). Verificaram que as mutações pertenciam a dois grupos de complementação amy 1 e amy 2 e eram recessivas. As mutações amy 1 estavam localizadas no gene STA 1 (produtor de AG I). Para formação de diplóides foi usado o método de fusão de protoplastos.

UMBUZEIRO VALENT (1985) estudando genes que afetam a produção de AG em *A. niger*, constatou que em testes de interação alélica, todas as mutações induzidas eram recessivas. No teste de complementação, foram revelados pelo menos dois genes que afetam a produção de AG: o lap 61 e lap 73 e/ou lap 38.

CHANG e TUVESON (1975) estudando uma linhagem de *Aspergillus foetidus* que segrega espontaneamente conídios com deficiência para prolina, verificaram que quanto maior proporção de conídios pro<sup>-</sup>, menor é a quantidade de AG produzida. Linhagens apresentando 3% de conídios pro<sup>-</sup> produziram uma média de 14,5 U/ml de enzima enquanto que, linhagens com 32% de conídios pro<sup>-</sup>, produziram 5,5 U/ml.

## 2.5. Protoplastos

EDDY e WILLIAMSON (1957, 1959) e BACHAMANN e BONNER (1959), fizeram os primeiros relatos sobre a técnica de obtenção de protoplastos em fungos filamentosos. Estes, têm sido utilizados para facilitar a manipulação genética, permitindo realizar cruzamentos que dificilmente ocorreriam utilizando técnicas convencionais (PEBERDY, 1979a, 1980).

### 2.5.1. Isolamento

Protoplastos de células microbianas são obtidos pela digestão to tal ou perfuração localizada da parede celular, procedimento que liberará o conteu do celular envolvido pela membrana para um meio hipertônico.

A liberação de protoplastos, envolve normalmente o uso de enzimas líticas. EDDY e WILLIAMSON (1957, 1959) foram os primeiros a utilizar o suco digestivo de *Helix pomatia*, como complexo lítico para a obtenção de protoplastos em *Saccharomyces cerevisiae*. Depois deles, outros autores vêm utilizando a mesma enzima em outras espécies de leveduras (DEUTCH e PARRY, 1974; SHAHIM, 1971; PARTRIDGE e DREWE, 1974) e também em outros fungos (EMERSON e EMERSON, 1958 e BACHMANN e BONNER, 1959) em *Neurospora crassa*; FAWCETT e col., 1973 em *Penicillium chrysogenum* e *Cephalosporium acremonium*; FERENCZY e col., 1974 em *Geotricum candidum*; MUSÍLKOVÁ e FENCL, 1968 em *A. niger*; MUSÍLKOVÁ e col., 1969 em *P. purpugenum*.

Boa parte dos pesquisadores que trabalham com fungos preferem utilizar complexos enzimáticos obtidos a partir de microorganismos. Entre vários exemplos encontra-se a Zimoliase derivada de *Arthrobacter luteus* (YAMAMURA e col., 1975).

De VRIES e WESSELS (1973), trabalharam com enzimas líticas de *Trichoderma viride* e verificaram que a mesma possuía três componentes principais: S-glucanase ( $\alpha$  1,3 glucanase), R-glucanase ( $\alpha$  1,3-,  $\beta$  1,6-glucanase) e quitinase. Verificaram também que esses três componentes foram necessários para a liberação de protoplastos em *Schizophyllum commune*. Por outro lado, SIETSMA e col., (1967), estudaram um complexo lítico obtido do *Streptomyces satsumaensis* e verificaram que ele era composto por dois importantes componentes: uma celulase e uma exolaminarinas.

HOUSSET e col. (1975), conseguiram aumento na eficiência da produção de protoplastos em *Schizosaccharomyces pombe*, através da adição de  $\alpha$  - 1,3 - glucanase e  $\beta$  - 1,3 - glucanase à enzimas de suco digestivo de caramujo. MORRIS (1978), verificou que a adição de glusulase ao complexo lítico proveniente de *Trichoderma harzianum*, aumentou a velocidade de liberação de protoplastos em *A. nidulans*. ANNE e col. (1976), obtiveram produção máxima de protoplastos em *P. chrysogenum* quando enzimas produzidas por *Trichoderma* foram misturadas a uma preparação proveniente de *Streptomyces gramineofasciens* e a uma celulase comercial.

Complexos enzimáticos purificados e constituído por diferentes polissacarases (celulase, gumase, maltase, hemicelulase e quitinase), têm sido utilizados para obtenção de protoplastos em diferentes espécies de fungos (EMERSON e EMERSON, 1958; DIATEWA e col., 1981; HAMLIN e col., 1981).

PEBERDY e col. (1976), estudando fatores que afetavam a liberação de protoplastos em *A. nidulans*, *A. flavus*, *P. chrysogenum*, *N. crassa* e *Fusarium culmorum*, concluíram que uma maior eficiência era obtida quanto utilizadas culturas em fase exponencial de crescimento. Existem muitos trabalhos relatando a influência dessa variável, principalmente em leveduras (EDDY e WILLIAMSON, 1957; BROWN, 1971; SHAHIM, 1971; DEUTCH e PARRY, 1974; STEPHEN e NASIM, 1981).

MUSILKOVÁ e FENCL (1968), estudando *A. niger*, concluíram que a aeração é uma variável muito importante na liberação de protoplastos. Concluíram também que o meio residual de cultivo deve ser retirado da suspensão de micélio, através de lavagem com solução de alta pressão osmótica.

Uma outra maneira de aumentar a eficiência da produção de protoplastos é fazer um pré-tratamento das células com certas substâncias. Entre elas, a 2-deoxi D-glicose (FOURY e GOUFFEAU, 1973), o Dithiothreitol, 2-Mercaptoetanol ou cisteamina (DOOIJEWAAARD e col., 1973; FAWCETT e col., 1973; FINKELMAN e col., 1980). Pode-se promover a liberação de protoplastos através de um pré-tratamento do micélio com detergentes tais como: desoxicolato, laurilsulfato e Triton X 100. Este último foi apontado como o mais eficaz para *Pythium* sp (SIETSMA e BOER, 1973).

EMERSON e EMERSON (1958), trabalharam com *N. crassa* e observaram que protoplastos produzidos a partir de conídios, parecem ser menos uniformes do que os obtidos a partir de hifa especialmente em baixas concentrações de açúcares e enzimas. GENTHNER e BORGIA (1978) em *Mucor racemosus* e BOS e SLAKHORST (1981) em *A. nidulans* e *A. niger*, verificaram que a produção de protoplastos a partir de conídios, resulta mais homogênea no que se refere à composição de organelas e portanto no seu desenvolvimento.

#### 2.5.2. Fusão

LOPEZ-BELMONTE e col. (1966), descreveram pela primeira vez, como um evento raro, a fusão espontânea de protoplastos em *Fusarium culmorum*. Já a primeira tentativa de fusão controlada foi feita por FERENCZY e col. (1974) em *Geotrichum candidum*, onde foi obtida baixa frequência de colônias heterocarióticas. BINDING (1974), conseguiu um aumento na frequência da fusão de protoplastos em *Phicomycetes blakesleeanus*, utilizando água do mar e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  tamponado como agentes de fusão. Neste último, os autores observaram que a frequência de fusão foi duas vezes maior do que a obtida com a água do mar e 37 vezes maior do que a obtida por FERENCZY e col. (1974). FERENCZY e col. (1975), trabalharam com *A. nidulans* e utilizaram os mesmos agentes de fusão, tendo obtido um aumento na frequência de fusão.

CONSTABEL e KAO (1974), trabalhando com protoplastos de plantas, conseguiram aumentar a frequência de fusão através do uso de polietileno glicol (PEG).

Em *P. chrysogenum*, ANNE e PEBERDY (1975) estudaram algumas variáveis relacionadas com o PEG e verificaram que a melhor concentração foi de 30% (p/v) com um tempo de exposição de 10 minutos a 30°C. PEBERDY e col. (1976) encontraram frequências de fusão 1000 vezes maiores do que as relatadas anteriormente. A partir desses estudos, ANNE e PEBERDY (1976), estabeleceram uma metodologia de fusão de protoplastos que pode ser aplicada com sucesso a várias espécies de fungos. Utilizando mutantes auxotróficos complementares, esses mesmos autores, realizaram fusões intra-específicas e também interespecíficas. Colônias heterocarióticas foram selecionadas em meio mínimo e alguns diplóides foram caracterizados através da confirmação de prototrofia, volume e coloração de esporos e conteúdo de DNA.

Cruzamentos entre células com o mesmo tipo de reação sexual foi possível graças a técnica de fusão de protoplastos, e têm sido descritos em *S. cerevisiae* (SVOBODA, 1978; CHRISTENSEN, 1979).

POULTER e col. (1981), através de fusão de esferoplastos, obtiveram em *C. albicans*, colônias prototróficas cujas células possuíam o dobro do volume das linhagens auxotróficas utilizadas no cruzamento. Obtiveram também, recombinantes auxotróficos com volume nuclear semelhante à linhagem prototrófica, e concluíram se tratar de permuta mitótica.

BALL e HAMLIN (1982) não obtiveram evidências nítidas da formação de diplóide em linhagens relacionadas e divergentes de *C. acremonium*. Recombinantes, provavelmente haplóides foram recuperados através de plaqueamento da solução de fusão para uma série de meios seletivos de regeneração.

SILVEIRA e AZEVEDO (1987), obtiveram alto número de protoplastos de linhagens de *M. anisopliae*. Observaram que dentro e entre linhagens, produtos de fusão apareceram em alta frequência. Recombinantes mitóticos foram isolados a partir das colônias prototróficas. Segundo os autores, tais estudos vêm confirmar a importância dessa técnica para estudos genéticos visando melhoramento.

A técnica de fusão de protoplastos tem possibilitado a realização de cruzamentos interespecíficos e inter-genéricos. Assim, FERENCZY e col., (1977) relataram a fusão e complementação nutricional entre *A. nidulans* e *A. fumigatus* a uma baixa frequência e sugeriram que o fenômeno da complementação teve como causa a aneuploidia.

Colônias heterocarióticas de crescimento lento em meio mínimo, que deram origem a diplóides vigorosos, foram obtidas por KEVEI e PEBERDY (1977, 1979), ao realizarem fusão entre *A. nidulans* e *A. rugulosus*. Após haploidização, os autores verificaram distribuição ao acaso dos grupos de ligação, sugerindo um alto grau de homologia entre as espécies.

PEBERDY e col. (1977), cruzaram *P. chrysogenum* e *P. cyaneo-fulvum* via fusão de protoplastos, após terem tentado exaustivamente as técnicas convencionais. Obtiveram colônias heterocarióticas em meio mínimo numa frequência da ordem de 0,01, com crescimento lento e irregular e totalmente diferentes das linhagens parentais. Em meio completo, essas colônias rapidamente originavam os tipos parentais, distinguidos pela coloração dos conídios. Após 5 - 7 dias de incubação em meio mínimo, setores com micélio mais denso foram isolados, os quais em meio completo produziram cerca de  $1 \times 10^8$  conídios em uma colônia de 8 cm de diâmetro. Esses isolados foram considerados "híbridos" e eram instáveis na presença de agentes haploidizantes. Setores prototróficos e auxotróficos parentais bem como recombinantes foram obtidos e analisados quanto ao diâmetro de conídios. Sugeriram então, se tratar de diplóides, aneuplóides e haplóides. KEVEI e PEBERDY (1977,1979) também obtiveram diplóides recombinantes para as marcas parentais. GODFREY e col. (1978), utilizando técnicas de fusão de protoplastos, observaram um aumento de 200 a 1000 vezes no número de cruzamentos obtidos entre *S. fradae* e *S. birkiniensis*, quando comparado com técnicas convencionais. CARRAU e col. (1982), obtiveram produtos de fusão entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*.

BRADSHAW e col. (1983), através de fusão de protoplastos, obtiveram híbridos entre *A. rugulosus* e uma linhagem de *A. nidulans* que possuía uma marca genética em cada um dos grupos de ligação. Estes híbridos apresentaram conidiação pobre e a análise de seus segregantes obtidos pelo tratamento com Benlate revelou a existência de recombinação entre todos os pares de marcas não ligadas. Todos os segregantes se mostraram estáveis em MC e MC contendo Benlate, não tendo sido observada nenhuma colônia instável que apresentasse um comportamento semelhante por exemplo às linhagens duplicadas ou aneuplóides. A recuperação de segregantes parentais numa frequência significativamente maior do que a esperada e também a observação de que essa segregação aberrante não estava correlacionada com um grupo de ligação em particular, levou os autores a concluir que se tratava de incompatibilidade interespecífica. O estudo da segregação das marcas genéticas de *A. rugulosus* obtidos a partir dos híbridos sugere que *A. nidulans* e *A. rugulosus* diferem quanto ao número e tamanho dos cromossomos.

FUNGARO (1984), relata a obtenção em baixa frequência de produtos de fusão entre *A. niger* e *A. awamori*. Considera como causa de baixa frequência o número relativamente pequeno de protoplastos utilizados para a fusão e a baixa quantidade de colônias obtidas em meio completo contendo KCl, talvez explicada pela baixa capacidade de regeneração. Outro aspecto seria em relação ao PEG, que no caso estaria exercendo um efeito tóxico preferencial sobre uma das linhagens cruzadas. Cerca de 92% das colônias crescidas em meio completo contendo KCl eram de *A. awamori*.

FERENCZY e MARÁZ (1977), realizaram transferências de mitocôndrias entre linhagens do mesmo tipo de reação sexual em *S. cerevisiae*. FUKUDA e KIMURA (1980) e YAMASHITA e col. (1981) realizaram transferência inter-genérica de mitocôndrias de *Hansenula wingei* para protoplastos de *S. cerevisiae*, usando a metodologia de miniprotoplastos. MARÁZ e SUBIK (1981) fusionaram protoplastos de linhagens auxotróficas de *S. cerevisiae* de "reações sexuais" iguais e opostas, carregando diferentes marcadores mitocondriais.

HINNEN e col. (1978), transformaram protoplastos de *S. cerevisiae leu 2<sup>-</sup>* com plasmídeo bacteriano Col E 1 contendo o gene *leu 2<sup>+</sup>* de levedura. Estes, se inserem em várias regiões do genoma, incluindo a região *leu 2<sup>+</sup>*. BEGGS (1978), utilizando plasmídeo quimérico entre Col E 1, 2  $\mu$ m e mais o gene *leu 2<sup>+</sup>*, transformou protoplastos de *S. cerevisiae*. Ainda nessa espécie, MANN e MECKE (1980), isolaram e caracterizaram membranas nucleares e núcleo através de composição química e padrão eletroforético de proteína total.

Uma metodologia desenvolvida mais recentemente tem sido aplicada com sucesso na fusão de protoplastos. Trata-se da eletrofusão, que tem sido reportada como causando aumento na frequência de fusão da ordem de 200 vezes (WEBER e col., 1981; ZIMMERMANN e VIENKEN, 1982), quando comparado com o tratamento sem campo elétrico.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Linhagens utilizadas

As linhagens de *Aspergillus awamori* utilizadas no presente trabalho são a NRRL 3112 e a Awm 3. Esta última, é um mutante morfológico obtido a partir da linhagem NRRL 3112 através de tratamento com luz ultravioleta que apresenta conídios de coloração marrom e deficiência nutricional espontânea para arginina ou prolina. Também foi utilizada a linhagem pab<sub>1</sub> nic<sub>1</sub> olv<sub>2</sub> de *Aspergillus niger*, que possui conídios de coloração oliva e deficiência para os ácidos *p*-aminobenzóico e nicotínico (gentilmente cedida por Gisela U. Valent - UNICAMP).

#### 3.2. Meios de cultura e de fermentação utilizados

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

Nitrato de sódio .....	6,0 g
Fosfato dihidrogenado de potássio .....	1,5 g
Cloreto de potássio .....	0,5 g
Sulfato de magnésio 7 H <sub>2</sub> O .....	0,5 g
Sulfato de ferro .....	traços
Sulfato de zinco .....	traços
Glicose .....	10,0 g
Água destilada .....	1,0 l

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1N; quando desejado sólido, foram adicionadas 15,0 gramas de ágar por litro.

##### 3.2.2. Meio Mínimo 2 vezes forte

Foi preparado de maneira semelhante ao item 3.2.1., onde cada componente foi colocado em quantidade dobrada, com exceção da água.

##### 3.2.3. Meio Completo (MC) (PONTECORVO e col., 1953 b)

Foi adicionado a 1 litro de Meio Mínimo:

Peptona .....	2,0 g
Caseína hidrolisada .....	1,5 g
Extrato de leveduras .....	0,5 g
Solução de vitaminas .....	1,0 ml
Ácido nucleico de leveduras .....	2,5 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1N; quando sólido, foram adicionadas 15,0 gramas de ágar por litro.

#### 3.2.4. Meio Completo 2 vezes forte

Foi preparado de acordo com o Ítem 3.2.3., onde cada componente foi colocado em quantidade dobrada, com exceção da água.

#### 3.2.5. Meio Mínimo líquido com 4% de Meio Completo

Foi adicionado ao Meio Mínimo (suplementado com prolina quando necessário) 4% de Meio Completo. A solução resultante foi distribuída em tubos de ensaio com 2,5 ml, autoclavada e conservada sob refrigeração.

#### 3.2.6. Meio para a produção de micélio - MCS

Ao Meio Mínimo líquido adicionou-se:

Caseína hidrolisada .....	2,0 g
Extrato de levedura .....	5,0 g

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1N. O meio foi complementado com as substâncias para as quais as linhagens eram deficientes.

#### 3.2.7. Meio de regeneração de protoplastos

Misturou-se, assepticamente, iguais volumes de Meio Mínimo ou Meio Completo 2 vezes forte e KCl 1,2 M (Ítem 3.3.19.). Foi mantido à temperatura de 50 - 60°C até a hora do uso.

#### 3.2.8. Meio de fermentação MAC (BONATELLI JR. e col., 1984)

Farinha de raspa integral de mandioca .....	20,0 g
Nitrato de sódio .....	1,0 g
Fosfato dihidrogenado de potássio .....	1,0 g
Sulfato de magnésio 7 H <sub>2</sub> O .....	0,5 g
Água destilada .....	1,0 l

O pH foi ajustado para 5,5 com NaOH 4% ou HCl 1N e a esterilização é feita a 1 atm e 120°C por 15 minutos. Alíquotas de 25 ml do meio foram distribuídas em frascos erlenmeyer de 125 ml. Quando necessário, foram adicionados requisitos nutricionais.

#### 3.2.9. Meio Mínimo com amido

Foi preparado de maneira idêntica à descrita no ítem 3.2.1., com exceção da glicose que foi substituída pelo amido, na mesma concentração

### 3.3. Soluções utilizadas

#### 3.3.1. Solução de Vitaminas

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

A solução foi esterilizada em vapor fluente e guardada em frasco escuro sob refrigeração.

#### 3.3.2. Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras

Foram colocadas 2 g de ácido nucleico de leveduras em 15 ml de solução 1N de NaOH e 2 g de ácido nucleico de leveduras em 15 ml de solução 1N de HCl. As soluções foram aquecidas por 20 minutos a 100°C, misturadas e o pH foi ajustado para 6,0. Em seguida, a mistura foi filtrada, e o volume completado para 40 ml e guardada sob clorofórmio e refrigeração.

#### 3.3.3. Soluções estoque de aminoácidos e vitaminas

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

As soluções foram esterilizadas em vapor fluente e guardadas sob refrigeração.

#### 3.3.4. Solução de "Tween"

Foi adicionado "tween 80" à água destilada numa concentração de 0,1% (V/V). Aliquotas de 2,5 ml dessa solução foram colocadas em tubos de ensaio, autoclavadas e conservadas sob refrigeração.

#### 3.3.5. Solução salina

Cloreto de sódio .....	8,5 g
Água destilada .....	1,0 l

Frascos contendo 9 ml dessa solução foram preparados e autoclavados.

## 3.3.6. Tampão fosfato pH 7,0

Fosfato dihidrogenado de potássio .....	600 mg
Fosfato hidrogenado de sódio .....	2800 mg
Água destilada .....	1000 ml

Essa solução foi estocada em frasco escuro a 4°C.

## 3.3.7. Tampão fosfato pH 5,8

Solução A - fosfato dihidrogenado de potássio .. 24,0 g/l

Solução B - fosfato hidrogenado de sódio ..... 71,6 g/l

Foram adicionados 920 ml da solução A em 80 ml da solução B. A solução final foi estocada em frasco escuro sob refrigeração.

## 3.3.8. Solução de albumina

Foram adicionados 5 ml de clara de ovo a 95 ml de água destilada estéril. A solução foi conservada a 4°C.

## 3.3.9. Solução fixadora

Foram misturados álcool absoluto, ácido acético glacial e ácido lático na proporção de 6:1:1, respectivamente. A solução foi colocada em frasco escuro e conservada à temperatura ambiente.

## 3.3.10. Solução de Giemsa

Giemsa .....	1,0 g
Glicerina .....	54,0 ml
Metanol .....	84,0 ml

Giemsa foi dissolvido em glicerina quente, deixada esfriar, e a seguir, adicionado metanol. Se necessário, a solução foi filtrada, aquecida e deixada resfriar. Depois, a solução foi guardada em frasco escuro a temperatura ambiente. Na hora do uso, 18 gotas de corante foram misturadas em 10 ml de tampão fosfato pH 7,0.

## 3.3.11. Solução de Benlate em acetona

Foram adicionadas 4 mg de Benlate [fungicida: metil - 1-(butil-carbamoil) - 2 - benzimidazol - carbamato] a 100 ml de acetona. A solução foi conservada em frasco a 4°C.

## 3.3.12. Solução de Benlate em água

Foram colocadas 60 mg de Benlate em um frasco escuro previamente esterilizado. Ao Benlate foi acrescentado 1 ml de acetona. Com o auxílio de um

bastão de vidro, a solução foi homogeneizada, e a ela adicionou-se 99 ml de água destilada esterilizada. A solução foi então agitada e conservada à temperatura ambiente.

### 3.3.13. Solução estoque de Brometo de Etídio

Foram adicionadas 210 mg de Brometo de Etídio (Sigma) a 21 ml de água destilada estéril. A solução foi colocada em frasco escuro envolto com papel alumínio, esterilizada em vapor fluente e conservada a 4°C.

### 3.3.14. Solução lisol 10%

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

### 3.3.15. Solução de amido 1% em tampão citrato 0,1 M - pH 4,0

Dissolveu-se 1 g de amido solúvel, à quente, em aproximadamente 40 ml de água destilada. Misturou-se 33 ml de uma solução 0,1 M de ácido cítrico em 17 ml da solução 0,1 M de citrato de sódio  $2H_2O$ ; adicionou-se o amido dissolvido e completou-se o volume para 100 ml com água destilada. O pH foi ajustado para 4,0.

### 3.3.16. Solução de dextrina limite\* 1% em tampão citrato 0,1 M - pH 4,0

Procedeu-se de maneira idêntica a descrita no item anterior, substituindo-se o amido solúvel pela dextrina limite (UEDA, 1980).

### 3.3.17. Solução estoque do inibidor\* de amiloglicosidase (AG)

Pesou-se 5,0 mg do inibidor (UEDA e KOBA, 1973) e misturou-se a 82,6 ml de água destilada estéril, de tal modo a se obter a concentração de 60,0 µg/ml. A solução foi conservada a 4°C.

### 3.3.18. Solução de KCl 1,2 M

Dissolveu-se 89,47 g de KCl em 500 ml de solução A (item 3.3.7.), com agitação e aquecimento. O pH final foi ajustado para 5,8, adicionando-se a solução B. Acertou-se o volume para 1 litro com tampão fosfato pH 5,8.

### 3.3.19. Solução de KCl 0,6 M

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

\* Gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Seinosuke Ueda, Kyushu University, Fukuoka, Japão.

### 3.3.20. Soluções de ácido perclórico

A partir do ácido perclórico 11,64 N, foram preparadas várias soluções com diferentes normalidades:

HClO <sub>4</sub> 0,2 N .....	1 ml de HClO <sub>4</sub> :	57,2 ml de água
HClO <sub>4</sub> 1,5 N (10%) .....	1 ml de HClO <sub>4</sub> :	6,8 ml de água
HClO <sub>4</sub> 3,75N .....	1 ml de HClO <sub>4</sub> :	2,1 ml de água

As soluções foram preparadas em banho gelo-água, em frascos escuros e guardadas a 4°C.

### 3.3.21. Solução 0,3 N de KOH

Um volume de 80 ml de água, foi acrescentado 1,34 g de KOH.

### 3.3.22. Solução de difenilamina

Foi preparada uma solução 4% de difenilamina em ácido acético glacial, a qual, foi guardada em frasco escuro com tampa esmerilhada.

### 3.3.23. Solução de acetaldeído

Um volume de 0,1 ml de acetaldeído (1,6 mg/ml), foi adicionado a 49,9 ml de água. A solução foi guardada em frasco escuro com tampa esmerilhada.

### 3.3.24. Solução de PEG 30%

Solução A: CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O - 14,6 g em 1 litro de água destilada.

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

Foram adicionados 10 ml da solução A em 10 ml da solução B, e o volume completado para 100 ml com água destilada. O pH foi corrigido para 8,0 com NaOH 4% e adicionado PEG 6000 (Sigma) em concentração final de 30%.

### 3.3.25. Solução estoque de DNA de salmão (Sigma)

Em 20 ml de ácido perclórico 1,5 N (Ítem 3.3.20.), foram diluídas 30 mg de DNA purificado. A solução foi colocada em frasco escuro e guardada sob refrigeração.

## 3.4. Esterilização e temperatura de incubação

Todos os meios de cultura e soluções utilizados no presente trabalho (a menos que esteja especificado no Ítem de maneira diversa) foram esterilizados em autoclave a temperatura de 120°C e a pressão de 1 atmosfera por 15 minutos.

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

### 3.5. Estimativa da viabilidade dos conídios

Suspensões de conídios obtidos de colônias incubadas 7 dias em placas de petri contendo MC, foram preparadas em solução "Tween" (item 3.3.4.). O número de conídios foi estimado em lâmina hematimétrica, e as diluições em solução salina foram feitas de 1:10 até que concentrações em torno de  $3 \times 10^3$  conídios por mililitro fossem obtidas. Da diluição final, foram retiradas alíquotas de 0,1 ml e espalhadas em placas de petri contendo MC sólido. Após incubação de 2 - 3 dias, os números de colônias crescidas observadas nas placas foram comparados com os números esperados. As proporções de conídios viáveis puderam assim ser estimadas. Foram feitas quatro repetições para cada linhagem.

### 3.6. Estimativa da taxa de segregação espontânea

Suspensões de conídios foram preparadas e semeadas em MC, de acordo com o descrito no item anterior. Após 2 - 3 dias de incubação, as colônias foram transferidas para placas de petri contendo MM e marcadas no fundo com 26 pontos. Estas, foram incubadas por 24 horas, e a seguir, a porcentagem de colônias auxotróficas e prototróficas puderam ser estimadas. Foram ensaiadas 364 colônias. Foi realizada também auxanografia para as colônias com crescimento residual.

### 3.7. Isolamento de linhagens auxotróficas puras e prototróficas puras

#### 3.7.1. Auxotróficas

Procedeu-se de forma idêntica à descrita no item 3.6., desde a preparação das suspensões até a transferência das colônias para placas com MM sólido. As colônias que apresentaram crescimento residual foram transferidas em blocos de agar com cerca de 2 mm de diâmetro para MC. A proporção de conídios auxotróficos e conídios prototróficos foi estimada nesses isolados de acordo com o descrito no item 3.6.. A deficiência nutricional das colônias auxotróficas foi confirmada, transferindo-as para MM contendo arginina ou prolina.

#### 3.7.2. Prototróficas

##### 3.7.2.1. Isolamento por colônias

Procedimento semelhante ao descrito no item 3.7.1. foi adotado inicialmente nesse caso, exceto no final, onde foram isoladas colônias com crescimento vigoroso em MM. Essas colônias foram transferidas para MM inclinado e após 7 dias de incubação, a proporção de colônias auxotróficas e colônias prototróficas foi calculada para cada um dos isolados (item 3.6.). O número de colônias

ensaiadas foi sempre de 200 ou 208. A deficiência nutricional das colônias auxotróficas foi confirmada de acordo com o item 3.7.1..

#### 3.7.2.2. Isolamento por microcolônias

Suspensões de conídios foram preparadas, diluídas e plaqueadas em MM de acordo com o item 3.5.. Após 24 horas, as placas foram examinadas com auxílio de microscópio estereoscópio para se localizar microcolônias, que foram coletadas ao acaso de regiões onde as mesmas se encontravam isoladas. As microcolônias foram transferidas com auxílio de fio de platina esterilizado em blocos de agar com cerca de 2 mm de diâmetro, e transferidas para MM inclinado. A proporção de colônias auxotróficas e colônias prototróficas para cada uma das microcolônias foi estimada de acordo com o descrito no item 3.6., tendo sido amostradas de 200 a 1560 colônias. A deficiência nutricional das linhagens auxotróficas também foi confirmada.

#### 3.8 Estimativa da frequência de segregação de colônias com morfologia alterada

À medida que as microcolônias tiveram seus conídios semeados e crescidos em MC (item 3.7.2.2.), contou-se o número de colônias em morfologia alterada e dividiu-se pelo número total de colônias. Foi realizada auxanografia para essas colônias, transferindo-se para MC, MM e MM contendo arginina ou prolina.

#### 3.9. Teste preliminar de sensibilidade ao Benlate diluído em acetona

Colocou-se em tubos de ensaio, 20 ml de MC fundido. Estes tubos foram tampados, autoclavados e mantidos em banho maria a 50°C. Aliquotas da solução estoque de Benlate (item 3.3.11.) foram adicionadas aos tubos contendo MC, com o auxílio de micropipetas, de tal forma a proporcionarem concentrações na faixa de 0,04 a 1,6 µg/ml. A homogeneização foi feita colocando-se os preparados por alguns segundos no agitador (VORTEX), e em seguida, foram transferidos para placas de petri esterilizadas. Foi feito controle com MC e com MC + acetona. Foram ensaiadas duas placas por tratamento.

Após um período de 2 - 3 horas, tempo suficiente para que os meios de cultura se solidificassem, conídios das linhagens a serem testadas foram inoculadas com o auxílio de um fio de platina esterilizado. Foram feitas quatro inoculações por placa.

O crescimento das colônias nos vários tratamentos foi verificado, e a melhor faixa de concentração do fungicida, determinada.

### 3.10. Teste preliminar de sensibilidade ao Benlate diluído em água

Este teste foi realizado de maneira idêntica à descrita no item 3.9., excetuando-se o fato de que foi utilizada a solução estoque de Benlate diluído em água (item 3.3.12.) e também que a faixa de concentrações testadas variou de 0,2 a 4,0  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.11. Teste de efeito de acetona no crescimento das colônias

Também realizado de maneira similar à descrita no item 3.9., volumes variados de acetona foram adicionados aos tubos de ensaio contendo MC. As concentrações finais variam de 20 a 150  $\mu\text{l/ml}$  e a leitura foi feita medindo-se o diâmetro das colônias após 48 horas de incubação. Foram feitas 4 repetições por tratamento.

### 3.12. Obtenção e frequência de setores

#### 3.12.1. Tratamento com Benlate diluído em acetona

Frascos do tipo erlenmeyer contendo 200 ml de MC sólido fundido foram colocados em banho maria a 50°C. Aliquotas da solução estoque de Benlate (item 3.3.11.) foram adicionadas ao meio de cultura de tal forma a se obter a concentração de 0,12  $\mu\text{g/ml}$ . Após homogeneização, o meio foi distribuído em placas de petri, que após terem sido inoculadas uma vez na região central com conídios das linhagens a serem testadas, foram incubadas por um período de 7 a 9 dias.

O controle foi feito utilizando-se placas com apenas MC e placas com MC contendo acetona numa concentração de 150  $\mu\text{l}/20\text{ ml}$  meio. Foram amostradas no mínimo 13 placas para cada tratamento.

#### 3.12.2. Tratamento com Benlate diluído em água

Procedimento semelhante ao descrito no item anterior foi adotado também nesse caso, sendo que aliquotas da solução estoque de Benlate (item 3.3.12.) foram adicionadas ao MC de tal forma a obter a concentração de 2,0  $\mu\text{g/ml}$ . O controle foi feito com apenas MC e foram amostradas nunca menos que 21 placas por tratamento.

### 3.13. Isolamento de setores

Conídios de regiões bem características dos setores obtidos, foram coletados com uma alça de platina esterilizada, e transferidos por meio de estrias para placas de petri contendo MC. Após incubação de 3 a 5 dias, colônias que cresceram isoladamente, tiveram seus conídios transferidos para tubos inclinados contendo MC e estocados.

### 3.14. Caracterização das linhagens e setores

#### 3.14.1. Testes de sensibilidade ao Benlate diluído em água

Foi preparado MC contendo Benlate na concentração de 2,0 µg/ml, de acordo com o descrito no item 3.12.1.. Foi feito controle com apenas MC e ensaiadas 3 placas por tratamento. Conídios das linhagens a serem testadas foram inoculados nas placas em 4 pontos e a leitura efetuada após 48 horas de incubação.

#### 3.14.2. Auxotrofia

Placas de 26 pontos na disposição 5 x 5 + 1 contendo MC, contendo MM e placas com MM contendo prolina ou arginina, ou ainda uma combinação dos dois aminoácidos, foram inoculados com conídios de cada uma das linhagens e setores a serem testados. As placas foram incubadas por 24 - 28 horas, após o que, foram efetuadas as leituras.

#### 3.14.3. Número de núcleos por conídio (PAES DE BARROS, 1977)

Conídios das linhagens e setores foram inoculados em placas de petri contendo MC e incubadas por 3 dias. Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, blocos de ágar com cerca de 1 cm<sup>2</sup> foram retirados da porção central das colônias. As superfícies das colônias contidas nesse bloco foram tocadas levemente por várias vezes em lamínulas que possuíam uma das faces impregnada com solução de albumina (item 3.3.8.). Depois de terem sido deixadas secar por uns 15 minutos, as lamínulas foram mergulhadas em solução fixadora (item 3.3.9.) por 10 minutos. A hidratação foi feita em álcool 95%, 70% e 50%, e em água destilada, sendo que cada uma dessas passagens durou cerca de 1 minuto. A hidrólise foi feita em HCl 1N a frio por 5 minutos e a quente por 6 minutos. A seguir, as superfícies das lamínulas foram lavadas 5 vezes em tampão fosfato (item 3.3.6.) e colocados em Giemsa (item 3.3.10.) por um período de 10 a 15 minutos. O excesso de corante foi lavado com tampão fosfato e as lâminas foram montadas a fresco. A seguir, foram levadas ao microscópio e utilizando o aumento de 400 vezes, o número de núcleos por conídio pode ser estimado. Foram amostrados cerca de 300 conídios para cada uma das linhagens e setores. Quando a observação foi feita algumas horas depois da preparação, as lâminas foram mantidas dentro de placas de petri, que continham papel embebido em água destilada.

#### 3.14.4. Diâmetro de conídios

Os diâmetros dos conídios foram estimados simultaneamente ã contagem do número de núcleos, tendo sido utilizada ocular micrométrica. Para a obtenção dos valores em micras, multiplicou-se por 1,19 cada valor observado. Quando possível, foram amostrados cerca de 30 conídios para cada uma das classes

de número de núcleos apresentada por uma dada linhagem ou setor. Assim, por exemplo, uma linhagem que apresentou conídios uni, bi e trinucleados, teve cerca de 30 conídios amostrados para cada um dos 3 grupos, dando portanto um total de cerca de 90. Em muitos casos foi impossível encontrar 30 conídios com um dado número de núcleos.

### 3.15. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos

#### 3.15.1. Curvas de sobrevivência

Suspensões de conídios obtidas de acordo com o descrito no item 3.5. foram colocadas em placas de petri vazias esterilizadas, e irradiadas nos tempos de 2,5 - 5,0 - 7,5 - 10,0 - 15,0 - 20,0 minutos com lâmpada emitindo luz ultravioleta (UV) de ondas curtas (2537 Å), colocada a uma altura de cerca de 6,5 cm. Aliquotas de cada uma das suspensões irradiadas e também das suspensões não irradiadas foram semeadas em placas contendo MC. Após 2 a 3 dias de incubação, as colônias desenvolvidas foram contadas e a porcentagem de sobrevivência foi calculada para cada um dos tratamentos, tomando como 100% o número de conídios viáveis estimado na amostra sem irradiação. Foram ensaiadas 4 placas por tratamento.

#### 3.15.2. Isolamento de mutantes

##### 3.15.2.1. Auxotróficos

###### 3.15.2.1.1. Isolamento total

Suspensões de conídios preparadas de acordo no item 3.5., foram submetidas ao tratamento com luz UV, pelo tempo necessário para a obtenção de 1% a 5% de sobrevivência. Aliquotas de 1 ml das suspensões tratadas foram convenientemente diluídas em salina e semeadas em 10 a 20 placas de petri contendo MC e a seguir incubadas por 2 a 3 dias. As colônias sobreviventes foram então transferidas uma a uma para MM sólido ou MM contendo substâncias adicionais (item 3.3.3.) quando se desejou obter mutantes com uma segunda marca auxotrófica. Após incubação de 24 a 48 horas, as colônias que não apresentaram crescimento ou o apresentaram de forma residual, foram transferidas em blocos de agar com cerca de 2 mm, para MC. Passados 7 dias, conídios das colônias crescidas em MC foram suspensos em "Tween" e, uma alíquota de 0,2 ml foi misturada a MM mantido a 50°C. O meio foi plaqueado e deixado solidificar por 2 a 3 horas. Posteriormente, com auxílio de micropipetas esterilizadas, gotas de compostos exclusivos de MC (item 3.2.3.) foram colocadas em 5 pontos equidistantes marcados no fundo da placa. Novamente incubados por 24 a 48 horas, as colônias que apresentaram crescimento restrito a uma ou mais substâncias, o que é evidenciado por halo de crescimento ao redor do ponto onde as mesmas foram adicionadas, foram purificadas por microco

lônias e estocadas em MC inclinado. Após crescimento em um determinado composto, as colônias foram ensaiadas para cada um dos componentes do mesmo, determinando portanto, a deficiência nutricional específica. Este método é descrito em PONTE CORVO e col. (1953 b), e recebe a denominação de isolamento total.

#### 3.15.2.1.2. Filtração

Foram preparadas suspensões de conídios de acordo com o item 3.5. e tratadas com luz UV conforme o descrito no item anterior. Ao mesmo tempo, frascos erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml de MM líquido mais prolina, foram convenientemente fechados e autoclavados. Em seguida, volumes de 5 ml das soluções irradiadas foram adicionadas a esses frascos, que levados para plataforma rotatória, foram mantidos por 20 horas em agitação. Os conteúdos dos frascos foram então passados em filtros compostos por 6 camadas de gaze presas a funis de vidro por fitas adesivas. Os filtrados foram centrifugados (Centrífuga Excelsa Baby da Fanem) por 20 minutos com o regulador na posição 5, os sobrenadantes eliminados e os sedimentos ressuspensos em solução salina.

A solução salina foi novamente inoculada em MM contendo prolina, incubada por 20 horas e filtrada mais uma vez, sofrendo portanto um segundo ciclo, ou foi diretamente espalhada em MC sólido depois de adequadamente diluída. Esta técnica está de acordo com o descrito em SILVEIRA e AZEVEDO (1984).

Após incubação de 2 a 3 dias, os mutantes auxotróficos foram isolados de acordo com o descrito no item anterior.

#### 3.15.2.2. Mutantes morfológicos

As colônias sobreviventes crescidas em MC após tratamento com luz UV, conforme descrito nos itens 3.15.2.1.1. e 3.15.2.1.2., foram examinadas quanto à presença de alterações em relação à coloração de conídios, sendo a seguir isoladas por meio de estrias em MC, purificadas por microcolônias e estocadas em MC inclinado.

#### 3.16. Reversão das marcas auxotróficas

De acordo com o descrito no item 3.5. suspensões contendo  $10^7$  conídios viáveis por mililitro foram preparadas, e alíquotas de 0,1 ml das mesmas foram espalhadas em placas de petri contendo MM ou em MM complementado, quando necessário, e em placas controle com MC. Após 7 dias de incubação, as colônias revertentes foram contadas e a frequência de reversão estimada. Foram ensaiadas 10 placas de MM ou MM complementado e 2 placas de MC para cada mutante.

### 3.17. Teste para a verificação do bloqueio metabólico na via biossintética dos aminoácidos arginina e prolina

Conídios de algumas linhagens e mutantes foram inoculados em placas contendo MC, MM e MM suplementado com substâncias que fazem parte da via biossintética dos aminoácidos arginina e prolina (ornitina, ácido glutâmico e citrulina). A leitura foi feita após 48 horas de incubação, verificando-se a presença ou ausência de crescimento. Foi ensaiada uma repetição por tratamento.

### 3.18. Resistência ao Brometo de Etídio

#### 3.18.1. Curva de sobrevivência

A partir da solução estoque de Brometo de Etídio (item 3.3.13.), foi feita diluição de 1:10 em água esterilizada. Dessa solução, alíquotas de volumes diferentes foram transferidas para placas de petri vazias e esterilizadas, às quais se acrescentou a seguir 20 ml de MC fundido. As concentrações finais obtidas ficaram na faixa de 4,0 a 19,0 µg da droga por mililitro de meio. Foram ensaiadas 3 placas por tratamento, sendo que para o controle foi utilizado MC sem a droga.

#### 3.18.2. Mutantes espontâneos

Placas contendo MC e Brometo de Etídio foram preparadas de acordo com o descrito no item anterior. No primeiro experimento, a concentração única utilizada foi de 19,0 µg/ml. Nos experimentos subsequentes, a concentração única utilizada foi de 24,0 µg/ml. Foram ensaiadas 10 placas contendo MC com a droga e 3 placas contendo apenas MC para cada um dos experimentos.

Conídios foram suspensos em solução de "Tween", de acordo com o descrito no item 3.5., numa concentração de  $10^7$  por mililitro. Alíquotas de 0,1 ml dessa diluição foram transferidas para placas de petri com e sem a droga. Após incubação de 5 a 7 dias, conídios das colônias que cresceram na presença da droga foram transferidos pelo método de estrias, para uma das duas regiões em que tinham sido divididas as placas contendo MC com 24,0 µg/ml de Brometo de Etídio. Para a outra região das placas, foram transferidos conídios de colônias da mesma linhagem que não tinham tido contato com a droga, servindo assim como controle. Esse processo foi repetido de 1 a 3 vezes. Após 5 a 7 dias de incubação, colônias com crescimento vigoroso tiveram seus conídios suspensos em solução de "Tween" e diluídos como no item 2.5. até a faixa de concentração de  $1 \times 10^3$  -  $2 \times 10^3$  conídios/ml. A seguir, alíquotas de 0,1 ml foram semeadas em placas contendo apenas MC e em placas contendo MC com 24,0 µg/ml de Brometo de Etídio. Depois de 2 a 7 dias de incubação, o número de colônias crescidas nos dois tratamentos foi estimado.

### 3.18.3. Mutantes induzidos

Como descrito no ítem 3.18.1., foram preparadas placas contendo MC, no qual se diluiu 24,0 µg/ml de Brometo de Etídio. O mesmo número de placas citado no ítem anterior foi aqui utilizado.

Depois de preparados de acordo com o descrito no ítem 3.5., os conídios foram irradiados com luz UV de ondas curtas (2537 Å), tendo a lâmpada sido colocada a uma altura de 6,5 cm. A concentração foi calculada de tal forma que após a irradiação houvesse  $10^6$  conídios viáveis/ml. Os passos seguintes foram exatamente iguais aos descritos no ítem anterior excetuando-se o período de incubação, que foi de 2 a 3 dias.

### 3.18.4. Curva de resistência

De maneira idêntica à descrita no ítem 3.18.1., placas contendo concentrações que variaram de 4,0 a 53,0 µg de Brometo de Etídio por mililitro de MC, foram preparadas e inoculadas com conídios das linhagens a serem testadas. Foram feitas 4 inoculações por placas. Após 48 horas de incubação, o diâmetro das colônias foi medido e as curvas, traçadas. Foram ensaiadas 3 placas por tratamento e o controle foi feito com MC.

## 3.19. Técnicas genéticas

### 3.19.1. Utilizadas no ciclo parassexual

As técnicas genéticas utilizadas estão baseadas nos relatos do PONTECORVO e col. (1953 b) para trabalhos que utilizam o ciclo parassexual e seguem, como referências principais, a obtenção de heterocários, diplóides e segregantes dos diplóides.

#### 3.19.1.1. Obtenção de heterocários

Conídios de linhagens diferentes quanto à morfologia e/ou deficiências nutricionais foram misturados em tubos de ensaio contendo MM mais 4% de MC (ítem 3.2.5.). Após 2 a 4 dias de incubação, a película desenvolvida na superfície do líquido foi transferida para placas contendo MM sólido suplementado com prolina quando necessário. Este último passo permite a evidênciação do heterocário formado como setores de crescimento vigoroso.

#### 3.19.1.2. Isolamento de colônias prototróficas

Conídios de setores heterocarióticos foram coletados, suspensos em solução de "Tween" e semeados em placas contendo MM suplementado com prolina quando necessário. Foram usadas concentrações na faixa de  $10^4$  a  $10^6$  conídios/placa. Após incubação de 3 a 5 dias, colônias crescendo isoladas com co

loração e morfologia uniformes, foram selecionadas. Seus conídios foram transferidos para MM sólido (suplementado com prolina quando necessário), pelo método de estrias. Passados 2 a 4 dias de incubação, foi observado o crescimento que, no critério seletivo adotado, deveria ser uniforme ao longo das estrias, com a coloração de conídios e a morfologia das colônias semelhantes à linhagem original (NRRL 3112). Procedida a seleção e caracterização, as colônias prototróficas foram estocadas em tubo inclinado contendo MC.

A solução de  $10^4$  conídios/ml, foi diluída de tal modo que, quando colocadas alíquotas de 0,1 ml da diluição final em placas com MC, crescessem cerca de 50 colônias por placas. As colônias de cada um dos mutantes foram contadas, estimando-se assim as frequências.

#### 3.19.1.3. Haploidização de colônias prototróficas diplóides

O agente haploidizante utilizado foi o fungicida Benlate diluído em água (item 3.3.12.), na concentração de 2,0  $\mu\text{g/ml}$  de MC (HASTIE, 1970). Os setores obtidos com esse tratamento foram purificados pelo método de estrias e, em seguida, pela obtenção de colônias isoladas. A estocagem foi feita em tubos inclinados contendo MC. A seguir, os setores foram caracterizados.

#### 3.19.2. Teste de complementação

Para este teste, foi utilizada a técnica descrita por ROPER (1952) em *Aspergillus nidulans*. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso tanto para fungos uni como multinucleados.

Conídios de duas linhagens diferentes mas com a mesma deficiência nutricional foram coletados e testados de maneira idêntica à descrita no item 3.19.1.1.. A leitura foi realizada observando-se a presença ou ausência de setores heterocarióticos.

### 3.20. Caracterização dos prováveis diplóides

Além do número de núcleos por conídio (item 3.14.3.) e da resistência ao Brometo de Etídio (item 3.18.4), outras variáveis foram estudadas no processo de caracterização das linhagens prováveis diplóides.

#### 3.20.1. Germinação em MM e MC

Conídios das linhagens a serem testadas foram semeadas em placas contendo MM + prolina e em placas de MC. A concentração estimada foi de 100 conídios/placa. Após 2 a 4 dias de incubação, a leitura foi tomada, contando-se o número de colônias crescidas em cada uma das placas. Foram ensaiadas 10 placas por tratamento.

### 3.20.2. Estimativa do diâmetro de conídios, a fresco

Com auxílio de uma alça de platina, conídios das linhagens a serem testadas foram transferidos e misturados a uma gota de lisol 10% (item 3.3.14.) na superfície de uma lâmina. Após se colocar a lamínula, as medidas dos diâmetros foram efetuadas utilizando-se uma ocular micrométrica. Trabalhou-se com diâmetro médio, obtido a partir da medida de nunca menos de 30 conídios.

### 3.20.3. Comparação da produção de setores entre as linhagens prováveis diplóides e as parentais

Conídios das linhagens parentais e das prováveis diplóides foram inoculados em placas contendo MC e Benlate numa concentração de 2,0  $\mu\text{g/ml}$ . Após incubação de 5 a 7 dias, a leitura foi realizada diariamente, observando-se o crescimento, a presença ou ausência de setores e também a coloração dos conídios dos setores formados. Foram feitas duas repetições.

### 3.20.4. Crescimento e formação de setores

Conídios das linhagens prováveis diplóides foram inoculados em placas contendo MC e em placas contendo MC + 2,0  $\mu\text{g}$  de Benlate/ml. Após incubação de 5 a 7 dias, setores espontâneos e induzidos foram purificados pelo método de estrias e estocados em tubos de MC inclinado, para posterior caracterização. Quando possível, segregantes com conídios de coloração verde e segregantes com conídios marrons, foram isolados em proporções semelhantes. Foram ensaiadas no mínimo 30 placas por tratamento.

### 3.20.5. Extração e quantificação de DNA

#### 3.20.5.1. Preparação de conídios

Conídios de colônias crescidas por 7 dias em placas de petri contendo MC, foram suspensos em solução de "Tween" (item 3.3.4.), e a concentração, estimada em lâmina hematimétrica. Multiplicando-se o valor obtido pelo número médio de núcleos por conídio de cada uma das linhagens, chegou-se ao volume que continha  $10^9$  núcleos. Num segundo experimento, o número de núcleos utilizado foi reduzido para  $5,0 \times 10^8$ .

#### 3.20.5.2. Extração do DNA (VAN TUYLL, 1977)

Suspensões de conídios, preparadas de acordo com o descrito no item anterior, foram transferidas para tubos de centrífuga com fundo cônico e centrifugadas por 10 minutos na posição 5 da centrífuga Excelsa Baby. Os precipitados foram lavados duas vezes em água destilada estéril, tendo a centrifugação sido realizada como descrito acima.

Depois, os conídios foram incubados em 5 ml de ácido perclórico 0,2 N (ítem 3.3.20.) por 10 minutos em banho gelo-água e centrifugados por 10 minutos na posição 5. Esse processo foi repetido mais uma vez sendo os "pellets" então suspensas 4 ml de KOH 0,3 N (ítem 3.3.21.) e mantidos a 37°C por mais ou menos 16 horas.

O DNA foi precipitado com a adição de 0,6 ml de ácido perclórico 3,75 N (ítem 3.3.20.) à suspensão resfriada em banho gelo-água. Após centrifugação de 10 minutos, os sobrenadantes foram desprezados e as "pellets", lavadas duas vezes com ácido perclórico 0,2 N em banho gelo-água e tratadas com 1 ml de ácido perclórico 1,5 N (ítem 3.3.20.) por 20 minutos a 70°C. Foram centrifugadas de maneira idêntica à descrita acima e o último tratamento foi novamente aplicado. Os sobrenadantes obtidos nas duas etapas foram combinados e o volume de cada um foi acertado para 3 ml com ácido perclórico 1,5 N.

No primeiro experimento, terminada esta fase, passou-se imediatamente para a determinação da quantidade de DNA. Já no segundo experimento, foi feita antes uma incubação a 70°C por 10 minutos seguida de centrifugação também por 10 minutos na posição 4 da centrífuga Excelsa Baby.

#### 3.20.5.3. Determinação da quantidade de DNA

A determinação foi feita pelo método da defenilamina modificado (GILES e MYERS, 1965), no qual o DNA é utilizado como padrão. Este método consiste em misturar 2 ml da solução de difenilamina (ítem 3.3.22.) com 2 ml da solução teste em ácido perclórico 10% (ítem 3.3.20.) e 0,1 ml da solução de acetaldéido 1,6 mg/ml (ítem 3.3.23.). Esta mistura é incubada a 30°C por 18 a 20 horas e a leitura, feita em 595 e 700nm. A quantidade de DNA das amostras é estimada pela diferença entre as duas leituras e pela comparação com a curva padrão.

#### 3.20.5.4. Curva padrão

Foi retirada uma alíquota de 1 ml da solução estoque de DNA (ítem 3.3.25.), adicionada a 36,5 ml de ácido perclórico 1,5 N, obtendo-se assim uma solução de 40 µg/ml. A partir desta, foram feitas diluições de modo a se obter concentrações de 20, 10 e 5 µg/ml. Com essas soluções, foi traçada a curva padrão conforme metodologia descrita no ítem anterior. O controle foi feito com ácido perclórico 1,5 N sem DNA. A reta de regressão foi traçada e o coeficiente de correlação calculado.

### 3.21. Caracterização dos segregantes

Além do diâmetro de conídios (ítem 3.20.1.) outras variáveis foram estudadas no processo de caracterização dos segregantes:

### 3.21.1. Auxotrofia

Conídios dos segregantes isolados, foram inoculados em placas de 26 pontos contendo MC, também chamadas mestras. Após 2 a 3 dias de incubação e com auxílio de replicador de 26 fios, conídios das colônias crescidas nas placas mestras, foram inoculados simultaneamente numa seqüência de placas contendo MM e MM mais suplementação com todas as substâncias envolvidas num determinado cruzamento, as quais foram colocadas isoladamente em MM e, combinadas de todas as formas possíveis. A leitura foi feita observando-se presença ou ausência de crescimento nos pontos inoculados, após 2 dias de incubação.

### 3.21.2. Morfologia

#### 3.21.2.1. Coloração de conídios

Os segregantes isolados em todos os cruzamentos foram classificados visualmente quanto a coloração de conídios.

#### 3.21.2.2. Alteração morfológica (mor<sub>1</sub>)

As colônias que possuem essa marca morfológica se caracterizam por possuírem crescimento radial semelhante às que contêm o alelo selvagem e massa micelial menos densa, de tal forma que, quando observadas contra a luz, elas se apresentam mais translúcidas. Essas observações foram feitas em placas contendo MM acrescido de todas as substâncias suplementares envolvidas no cruzamento.

#### 3.21.2.3. Alteração morfológica (mor<sub>2</sub>)

As colônias com essa característica são enrugadas, possuem uma elevação na região central, crescimento radial mais lento e formação de conídios mais tardia. Os conídios das colônias mor<sub>2</sub> possuem coloração mais clara.

#### 3.21.2.4. Proliferação de conidióforos secundários

A partir de um conidióforo normal formam-se conidióforos secundários que podem ser em número de 1, 2 ou mais. A observação das características nas linhagens e setores foi feita em MC e em MC contendo 2,0 µg de Benlate/ml, com auxílio de microscópio estereoscópio.

### 3.21.3. Setorização espontânea e induzida

Este experimento foi conduzido de maneira idêntica à descrita no item 3.20.3.. A leitura foi realizada observando-se presença ou ausência de setores e também pela comparação do crescimento entre as linhagens parentais e diploides.

#### 3.21.4. Resistência ao Brometo de Etídio

A partir das placas mestras (item 3.21.1.), conídios dos segregantes foram inoculados com auxílio de replicador de 26 fios em placas de petri contendo MC mais 36,0 µg/ml de Brometo de Etídio. A leitura foi feita após 2 a 3 dias de incubação.

### 3.22. Metodologia para produção de enzima e medida de sua atividade

#### 3.22.1. Curva de acúmulo da enzima em função do tempo de incubação

Após crescerem por 7 dias em MC, conídios de linhagem a ser testada, foram suspensos em "Tween" (item 3.3.4.) na concentração de  $10^6$ /ml. Aliquotas de 1 ml dessas suspensões foram inoculadas em frascos erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml de meio MAC (item 3.2.8.). Os frascos foram incubados em estufa, e diariamente do 2º ao 8º dia, 4 deles eram retirados para análise. O micélio era então transferido para um pedaço de papel alumínio previamente pesado e colocado por 48 horas a 80°C. Após a pesagem, o peso seco do micélio foi calculado pela diferença entre o peso do papel mais o micélio e o peso do papel apenas.

Após terem sido filtrados, o pH de cada um dos meios fermentados foi medido, e a enzima produzida foi estimada segundo metodologia descrita nos itens 3.22.2. e 3.22.3..

#### 3.22.2. Medida da atividade enzimática

Após o filtrado ter sido convenientemente diluído, 0,5 ml do mesmo foi misturado com 0,5 ml da solução de amido a 1% em tampão citrado (item 3.3.15.) e deixado por 60 minutos em banho maria a 60°C (condições adaptadas dos trabalhos de PARK e PAPINI, 1970 e BANKS e col., 1976). Após esse período, as amostras foram retiradas e imediatamente colocadas em água fervente por 3 minutos para a inativação da enzima. A seguir, procedeu-se a medida da quantidade de açúcares redutores, liberados da hidrólise do amido pela amiloglicosidase.

#### 3.22.3. Medida da quantidade de açúcares redutores

A quantidade de açúcares redutores foi estimada pelo método colorimétrico de HULTMAN (1959) e expressa em mg de glicose/100 ml ou em unidades (U) da enzima/ml, sendo que, cada 1000 mg de glicose/ml correspondem a 1 unidade de amiloglicosidase.

A medida dos açúcares redutores presentes no filtrado foi feita pelo mesmo método, correspondendo à glicose residual existente no meio de fermentação.

#### 3.22.4. Teste com inibidor

A partir da solução estoque do inibidor (ítem 3.3.17.), foi feita uma série de diluições cujas concentrações variaram de 10 a 40 µg/ml mas cujos volumes foram fixos. A seguir, 1 ml de cada uma das diluições foi transferido para tubos de ensaio, nos quais foram adicionadas alíquotas de 1 ml do meio MAC fermentado por 3 dias. Os tubos foram incubados por 10 minutos a 40°C e a seguir foi feita a medida da atividade enzimática dos vários tratamentos (ítems 3.22.2. e 3.22.3.). Amido (ítem 3.3.15.) e dextrina limite (ítem 3.3.16.) foram utilizados como substratos. Foi feita uma repetição por tratamento, e o controle foi ensaiado sem inibidor.

#### 3.22.5. Determinação da melhor concentração de aminoácido para a produção de amiloglicosidase

A frascos contendo meio MAC (ítem 3.22.1.), foram adicionados separadamente os aminoácidos prolina, leucina e arginina (ítem 3.3.3.), obtendo-se concentrações que variaram de 25 a 200 µg/ml. Aos frascos controle foi adicionado apenas água.

Conídios das linhagens auxotróficas foram inoculados também de acordo com o ítem 3.22.1., e após 3 dias de fermentação, a quantidade de enzima produzida foi estimada (ítems 3.22.2. e 3.22.3.). Foram feitas 4 repetições por tratamento.

#### 3.22.6. Produção de enzima

Suspensões de conídios das linhagens a serem testadas foram preparadas e inoculadas de acordo com o descrito no ítem 3.22.1.. Quando necessário, ao MAC foi adicionado separadamente ou combinado de maneira exigida, os requisitos prolina, leucina, arginina, ácido nicotínico e ácido p-aminobenzóico nas respectivas concentrações de 50, 100, 200, 5 e 5 µg/ml. Após 3 dias de fermentação, a quantidade de enzima produzida foi estimada de acordo com os ítems 3.22.2 e 3.22.3..

#### 3.22.7. Teste de produção de enzimas amilolíticas em placas

As linhagens a serem testadas foram inoculadas em MM com amido (ítem 3.2.9.). Após 4 dias de incubação, cristais de iodo sublimado foram colocados nas tampas das placas de petri, as quais foram mantidas invertidas por 2 minutos. Com esse procedimento, as regiões onde o amido foi degradado permanece clara, contrastando com a cor azulada das demais regiões.

A leitura foi feita medindo-se o diâmetro das colônias mais os halos de degradação e das colônias apenas. Os índices foram calculados pela razão entre as variáveis: halo de degradação + colônia/halo da colônia.

### 3.23. Cruzamento interespecífico

#### 3.23.1. Tentativa pelo método de crescimento em agitação

Alíquotas de suspensões contendo  $5,0 \times 10^7$  conídios/ml das linhagens a serem cruzadas, foram inoculadas juntas em frascos erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de MM líquido mais 4% de MC (item 3.2.5). Após agitação de 3 dias, os conteúdos dos frascos foram centrifugados e os sobrenadantes desprezados. Os sedimentos foram misturados a MM fundido ( $50^{\circ}\text{C}$ ) e semeados. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas por 10 dias, e a seguir observadas quanto à presença de colônias com crescimento vigoroso.

#### 3.23.2. Tentativa via fusão de protoplastos

##### 3.23.2.1. Obtenção de protoplastos (HAMLIN e col., 1981)

Frascos erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de MCS (item 3.2.6.) mais complemento nutricional exigido para cada linhagem, foram inoculados com  $10^6$  conídios/ml. Os frascos foram mantidos em agitador rotatório a 110-120 rpm por 16 - 18 horas à temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ . Depois, o conteúdo foi filtrado a vácuo em funil de Büchner previamente esterilizado e o micélio retido no papel foi lavado por 2 - 3 vezes com KCl 0,6 M ou 1,2 M (itens 3.3.18. e 3.3.19.), sendo que a solução foi esgotada por sucção sem se deixar secar demais. Todo o micélio foi coletado e transferido para placa de petri esterilizada e tarada.

Em frascos de 30 ml, foram colocados 5 ml de KCl 0,6 M de 175 a 200 mg de micélio. Os frascos foram agitados até que as "pellets" se desagregassem e a seguir se acrescentou 20 mg de enzima NOVOZYM 234 (Novo Industri) e 20 mg de enzima CP (John Sturge). Estes frascos foram depois incubados em agitador recíproco por 3 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ , sendo que, após 2 horas iniciou-se um acompanhamento da formação de protoplastos em lâminas preparadas com pequenas alíquotas retiradas do frasco de reação. A seguir, os conteúdos dos frascos foram transferidos para tubos de centrifuga esterilizados e a cada um deles foi adicionado 5 ml de KCl 0,6 M. Nessa etapa, tomou-se o cuidado de lavar bem as paredes do tubo de reação.

Após terem sido centrifugados por 30 segundos na posição 1 da centrifuga Excelsa Baby, os sedimentos foram desprezados e os sobrenadantes, transferidos cuidadosamente para outros tubos com auxílio de pipetas. Se necessário, o micélio foi lavado por mais 1 ou 2 vezes antes de ser desprezado, bastando para isso, ressuspendê-lo em KCl 0,6 M.

O número de protoplastos foi estimado em lâmina hemimétrica e diluições na base de 10 foram feitas até a ordem de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ , utilizando-se 0,5 ml da suspensão de protoplastos e 4,5 ml de KCl 0,6 M.

A seguir, os protoplastos foram semeados em MM KCl e em MC KCl, a partir das menores diluições. Para se verificar a presença de fragmentos de hifas e conídios viáveis, as diluições de ordem maior foram semeadas em MM e em MC.

A técnica utilizada para a semeadura foi "pour plate" e a contagem das colônias crescidas foi feita após 2 - 3 dias de incubação. A viabilidade foi estimada comparando-se o número de colônias obtidas com o número de protoplastos estimado em lâmina hematimétrica. Foram efetuadas 2 repetições para cada diluição em cada tratamento.

### 3.23.2.2. Fusão de protoplastos

#### 3.23.2.2.1. Espontânea

Os protoplastos, obtidos em KCl 0,6 M, de acordo com o descrito no item anterior, foram misturados na proporção de  $3,0 \times 10^5$  de *Aspergillus awamori* para  $3,2 \times 10^5$  de *Aspergillus niger*, e centrifugadas por 10 minutos na posição 5 da centrífuga Excelsa Baby. Depois de mantida a 4°C por 30 minutos, a ressuspensão foi efetuada de maneira a serem obtidos aglomerados de protoplastos. Uma parte dessa suspensão foi diluída como no item anterior, e semeada pela técnica de "pour plate" em MC com e sem KCl 0,6 M. A outra parte da suspensão foi semeada, sem diluição, em MM com e sem KCl 0,6 M.

A leitura foi feita após 3 - 4 dias de incubação, contendo-se o número de colônias crescidas em cada um dos tratamentos.

#### 3.23.2.2.2. Induzida (PEBERDY, 1979a)

Quantidades iguais de protoplastos das linhagens a serem cruzadas, cerca de  $10^6$ , foram misturadas e centrifugadas por 10 minutos na posição 5 da centrífuga Excelsa Baby. O sobrenadante foi eliminado, e ao precipitado se adicionou 1 ml de PEG (item 3.3.24.), tendo sido mantido a 30°C por 10 minutos. Depois, adicionou-se 9 ml de KCl 0,6 M, centrifugou-se de acordo com o descrito acima. O sobrenadante foi desprezado e 10 ml de KCl 0,6 M foi adicionado. Centrifugou-se novamente, e o precipitado foi ressuspensionado em 1,5 ml de KCl 0,6 M. O plaqueamento e contagem foi realizado de maneira similar à descrita no item anterior.

### 3.23.3. Caracterização das Colônias crescidas em MM KCl

O processo de caracterização foi realizado de forma idêntica a relatada para os prováveis diplóides (item 3.20.), excetuando-se os itens relacionados abaixo, que passaram por algumas modificações.

### 3.23.3.1. Crescimento em MM e MC

Foram escolhidas 10 colônias que se desenvolveram em MM KCl, cortadas ao meio, e cada uma das metades foi transferida em blocos de ágar para MM e MC. Após 15 dias de incubação, foi escolhida uma das colônias crescidas em MC, a partir da qual foi preparada uma suspensão com cerca de  $10^7$  conídios/ml. Alíquotas de 0,1 ml foram espalhadas em 6 placas contendo MM. Em MC, foram semeadas alíquotas também de 0,1 ml, da mesma suspensão diluída 4 vezes de 1:10. As placas foram incubadas por 3 a 5 dias e o número de colônias crescidas nos 2 tratamentos foram contadas.

Foram escolhidas 10 colônias que cresceram em MM, cortadas ao meio e transferidas da maneira descrita acima para placas contendo MM e placas contendo MC.

### 3.23.3.2. Morfologia e auxotrofia

Foram escolhidas 100 colônias que cresceram em MC, e testadas quanto à auxotrofia, transferindo-se para placas contendo MM e para placas contendo MM acrescidos dos suplementos necessários, em todas as combinações possíveis. Após 2 a 3 dias de incubação, a leitura foi feita observando-se presença ou ausência de crescimento e também a morfologia das colônias.

### 3.23.3.3. Segregação

Através de blocos de ágar, uma das colônias crescidas em MM KCl, crescido por 15 dias em MM (último repique), foi transferida para placas contendo MM, MC e MC mais Benlate nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5  $\mu\text{g/ml}$ . Os blocos de agar foram colocados no centro das placas. Os setores que se desenvolveram foram purificados pelo método de estrias e colocados em tubos inclinados contendo MC. Foram feitas 8 repetições por tratamento.

### 3.23.4. Caracterização dos segregantes dos prováveis produtos de fusão

Além da auxotrofia e morfologia, os segregantes foram analisados quanto ao diâmetro de conídios (item 3.20.1.) e quanto ao comportamento na presença de Benlate (item 3.20.3.), só que na concentração de 1,5  $\mu\text{g/ml}$ .

## 3.24. Análises estatísticas

### 3.24.1. Dos dados obtidos com formação de setores, de acordo com os itens 3.12.1. e 3.12.2.

A análise de variância dos dados foi efetuada utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, após os valores terem sido normalizados com a transformação  $(x + 0,5)^{1/2}$ .

3.24.2. Dos dados obtidos com o número de núcleos por conídio, de acordo com o item 3.14.3.

O total de conídios amostrados para cada uma das linhagens e setores foi aleatoriamente dividido em dois grupos, as médias parciais foram calculadas e a seguir utilizadas na análise de variância tendo em vista o delineamento casualizado. A comparação das médias foi feita segundo o teste de "Tukey" (PIMENTEL GOMES, 1984).

3.24.3. Dos dados obtidos com o diâmetro de conídios, de acordo com o item 3.14.4.

Os dados foram agrupados de maneira idêntica à descrita para o item anterior. O delineamento foi também o inteiramente casualizado e a comparação, feita pelo teste de "Tukey" (PIMENTEL GOMES, 1984).

3.24.4. Comparação do crescimento em MC e em MC contendo acetona, de acordo com o descrito nos itens 3.9. e 3.11.

A comparação de crescimento nestes dois tratamentos foi feita empregando-se o delineamento de blocos casualizados na análise de variância. Na comparação das médias foi utilizado o teste de "Tukey" (PIMENTEL GOMES, 1984).

3.24.5. Correlação entre dados

Foi aplicada para verificar uma possível correlação entre as médias do número de núcleos por conídio e as médias do diâmetro dos conídios.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Segregação espontânea

A linhagem NRRL 3112 apresentou segregação espontânea de conídios com deficiência nutricional para arginina ou prolina (arg/pro) numa taxa de 10%, os quais, possuem crescimento residual em MM. Esta estimativa foi feita de acordo com o descrito no item 3.6..

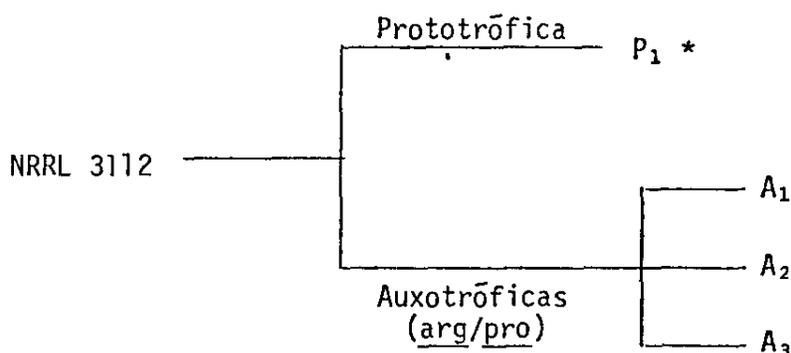
### 4.2. Tentativa de isolamento de linhagens auxotróficas puras e prototróficas puras

Seguindo a metodologia descrita no item 3.7.1., linhagens auxotróficas puras foram facilmente isoladas a partir da linhagem NRRL 3112 (Figura 01).

Quanto às prototróficas, a linhagem isolada inicialmente (Figura 01) continuou a segregar conídios arg/pro. A partir dela iniciou-se o processo de seleção (item 3.7.2.1. e 3.7.2.2.) através do qual foi obtido apenas uma redução na taxa de segregação espontânea (Figura 02).

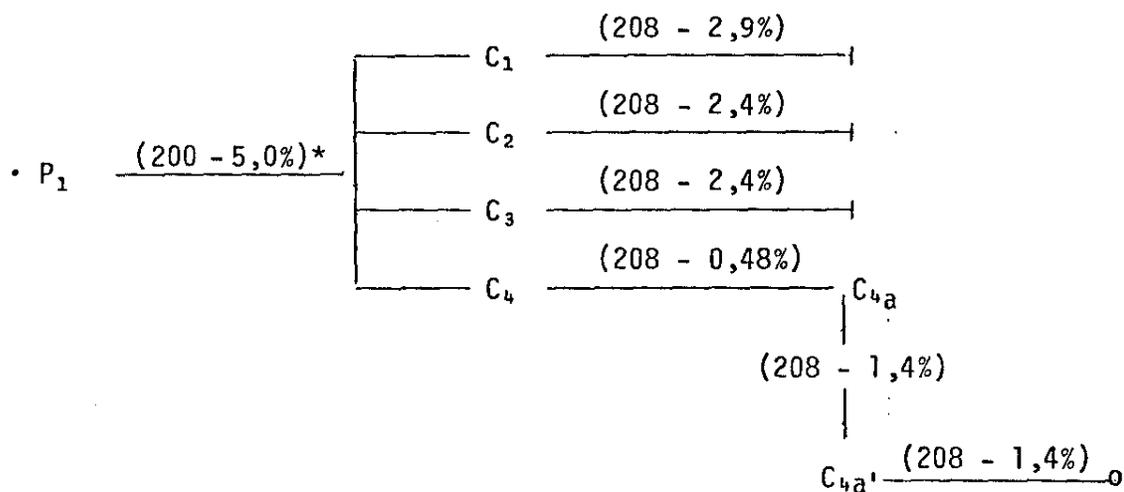
Durante a realização dos estudos com as microcolônias foi também observada a segregação espontânea de colônias com morfologia alterada (Tabela 02). Nesse caso foi seguida a metodologia descrita no item 3.8..

FIGURA 01 - Linhagens isoladas a partir da NRRL 3112



\* Esta linhagem segregou 5% de conídios arg/pro.

FIGURA 02 - Esquema adotado para a seleção de linhagens prototróficas puras, utilizando-se o método de isolamento por colônias



Símbolos utilizados:

- = Início de seleção
- o = Final de seleção
- | = Interrupção da seleção
- \* = Número de colônias testadas e porcentagem de colônias auxotróficas (arg/pro), respectivamente.

TABELA 01 - Frequência da segregação espontânea de conídios arg/pro nas várias mi crocolônias isoladas

MICROCOLÔNIAS	Nº DE COLÔNIAS TESTADAS	Nº DE COLÔNIAS <u>arg/pro</u>	PORCENTAGEM DE SEGREGAÇÃO
M <sub>1</sub>	208	3	1,40
M <sub>2</sub>	208	3	1,40
M <sub>3</sub>	208	4	1,90
M <sub>4</sub>	200	5	2,50
M <sub>5</sub>	416	3	0,72
M <sub>6</sub>	208	2	0,96
M <sub>7</sub>	208	2	0,96
M <sub>8</sub>	208	3	1,40
M <sub>9</sub>	208	3	1,40
M <sub>10</sub>	416	2	0,48
M <sub>11</sub>	300	6	2,00
M <sub>12</sub>	508	3	0,59
M <sub>13</sub>	208	2	0,96
M <sub>14</sub>	300	7	2,33
M <sub>15</sub>	300	4	1,33
M <sub>16</sub>	250	9	3,60
M <sub>17</sub>	300	2	0,67
M <sub>18</sub>	470	2	0,42
M <sub>19</sub>	250	2	0,80
M <sub>20</sub>	500	2	0,40
M <sub>21</sub>	250	1	0,40
M <sub>22</sub>	250	1	0,40
M <sub>23</sub>	250	2	0,80
M <sub>24</sub>	520	2	0,38
M <sub>25</sub>	250	4	1,60
M <sub>26</sub>	1560	1	0,06
M <sub>27</sub>	560	2	0,36
M <sub>28</sub>	250	2	0,80
M <sub>29</sub>	275	22	8,00
M <sub>30</sub>	250	4	1,60
M <sub>31</sub>	250	2	0,80
M <sub>32</sub>	300	1	0,33

TABELA 02 - Frequência de segregação espontânea de colônias com morfologia alterada

MICRO COLÔNIA	TOTAL DE COLÔNIAS AMOSTRADAS	COLORAÇÃO DO MICÉLIO	CRESCIMENTO EM MEIO MÍNIMO	NÚMERO DE SEGREGANTES	PORCENTAGEM SEGREGAÇÃO
M <sub>8</sub>	800	branco	+	2	0,25
M <sub>13</sub>	400	branco amarelo	+ +	1 1	0,50
M <sub>14</sub>	500	branco amarelo	- +	1 1	0,40
M <sub>16</sub>	400	branco	+	1	0,25
M <sub>17</sub>	400	branco	+	1	0,25
M <sub>21</sub>	500	amarelo e poucos conídios	-	1	0,20

#### 4.3. Isolamento de setores a partir das linhagens NRRL 3112 e Awm 3

Após a realização dos testes preliminares de sensibilidade ao Benlate diluído em acetona (item 3.9.) e diluído em água (item 3.10.), as melhores faixas de concentração do fungicida, visando a obtenção de setores, puderam ser obtidas. No primeiro caso, não foi observado o crescimento em concentrações superiores a 0,30 µg de Benlate/ml. Quando diluído em água esta concentração aumentou para 3,0 µg/ml.

Seguindo metodologia descrita nos itens 3.12.1. e 3.12.2., as linhagens NRRL 3112 e Awm 3 foram tratadas com Benlate, e os setores obtidos foram isolados de acordo com o item 3.13..

Algumas informações sobre os setores isolados e a simbologia adotada, encontram-se esquematizadas na Tabela 03. Pode ser observado também, que entre os setores, existem alguns com morfologia distinta das linhagens que os originaram.

Os tipos de setores formados a partir das linhagens NRRL 3112 e Awm 3, podem ser vistos nas Figuras 03 e 04.

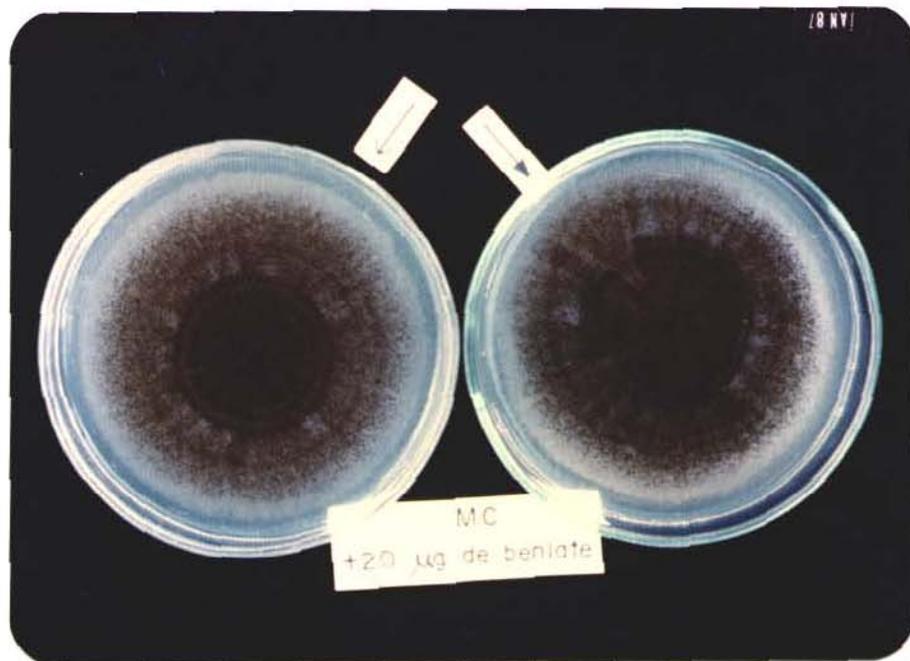


FIGURA 03 - Setores produzidos pela linhagem NRRL 3112 em MC contendo Benlate

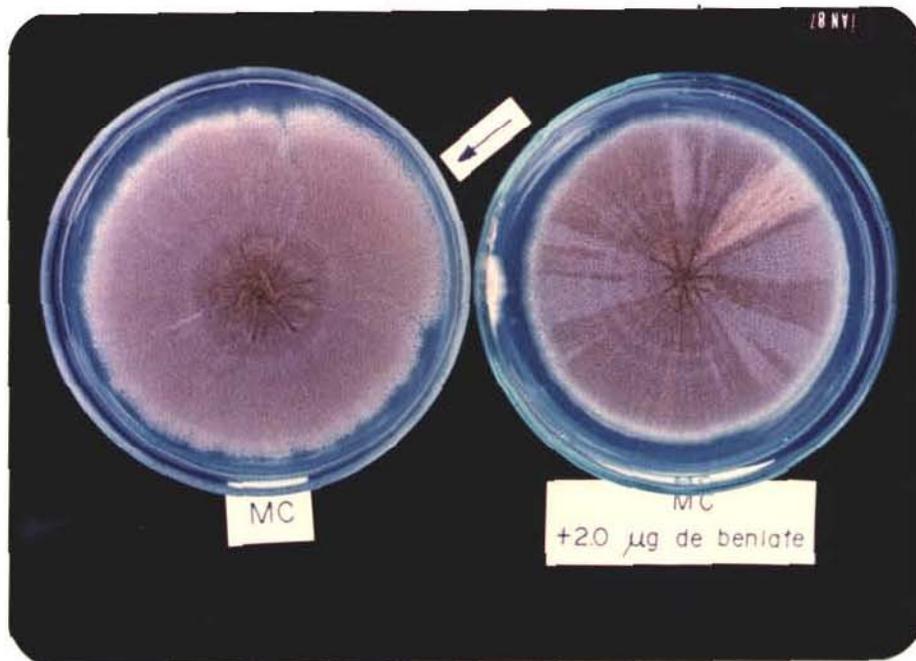


FIGURA 04 - Setores produzidos pela linhagem Awm 3 em MC e em MC contendo Benlate

TABELA 03 - Simbologia adotada para os setores, de acordo com a linhagem, o meio de cultura dos quais foram isolados e a coloração dos conídios

SETORES	LINHAGEM DA QUAL FOI ISOLADO	MEIO DO QUAL FOI ISOLADO	COLORAÇÃO DOS CONÍDIOS
S <sub>1</sub>	<u>Awm</u> 3	MC + Benlate	branca
S <sub>2</sub> ao S <sub>16</sub>	<u>Awm</u> 3	MC + Benlate	marrom
S <sub>17</sub>	<u>Awm</u> 3	MC + Benlate	creme
S <sub>18</sub>	<u>Awm</u> 3	MC + Benlate	branca
S <sub>19</sub>	<u>Awm</u> 3	MC	creme
S <sub>20</sub>	<u>Awm</u> 3	MC	branca
S <sub>21</sub> e S <sub>22</sub>	<u>Awm</u> 3	MC	marrom
S <sub>23</sub> ao S <sub>25</sub>	<u>Awm</u> 3	MC + acetona	marrom
T <sub>1</sub> ao T <sub>10</sub>	NRRL 3112	MC + Benlate	preta
T <sub>11</sub> ao T <sub>14</sub>	NRRL 3112	MC	preta
T <sub>15</sub> ao T <sub>18</sub>	NRRL 3112	MC + acetona	preta
T <sub>19</sub> *	NRRL 3112	MC + Benlate	preta
T <sub>20</sub> **	NRRL 3112	MC + Benlate	preta

\* Setor com alta instabilidade

\*\* Setor com micélio morfológicamente alterado (branco) e com conidiação me nos densa

#### 4.4. Frequência de formação de setores nas linhagens NRRL 3112 e Awm 3

##### 4.4.1. Em Benlate diluído em acetona

As duas linhagens foram tratadas de acordo com o descrito no ítem 3.12.1., e os resultados encontram-se sumarizados nas Tabelas 04 e 05.

Pode ser observado que houve formação de setores tanto nas plcas tratadas com Benlate como nas placas controle. É importante ressaltar também, que apenas setores bem evidentes foram contados e isolados.

TABELA 04 - Frequência de setores da linhagem NRRL 3112, submetida aos três tratamentos

TRATAMENTO	NÚMERO DE PLACAS	NÚMERO DE SETORES *	FREQUÊNCIA
MC	14	25	1,78
MC + acetona	13	18	1,38
MC + Benlate	32	67	2,09

\* Somente setores bem evidentes foram considerados

TABELA 05 - Frequência de setores da linhagem Awm 3 submetida aos três tratamentos

TRATAMENTO	NÚMERO DE PLACAS	NÚMERO DE SETORES *	FREQUÊNCIA
MC	16	10	0,62
MC + acetona	14	3	0,21
MC + Benlate	23	16	0,69

\* Somente setores bem evidentes foram considerados

TABELA 06 - Análise de variância dos dados da tabela 04

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Tratamento	2	0,1410	0,0705	1,1482 <sup>NS</sup>
Resíduo	15	0,9210	0,0614	
		CV = 16,98%		

NS = Não significativo

TABELA 07 - Análise de variância dos dados da tabela 05

FORTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Tratamento	2	0,1438	0,0719	2,1988 <sup>NS</sup>
Resíduo	12	0,3922	0,0327	
CV = 18,35%				

NS = Não significativo

Como pode ser observado, as linhagens NRRL 3112 e Awm 3 não apresentaram diferença significativa em relação a formação de setores nos três diferentes tratamentos.

#### 4.4.2. Em Benlate diluído em água

As freqüências de setorização das linhagens NRRL 3112 e Awm 3, foram também estudadas com o fungicida diluído em água (item 3.12.2.). Os resultados obtidos encontram-se sumarizados nas tabelas 08 e 09.

Também nesse caso houve formação de setores tanto nas placas controle como nas placas tratadas.

TABELA 08 - Freqüência de setores da linhagem NRRL submetida aos dois tratamentos

TRATAMENTO	NÚMERO DE PLACAS	NÚMERO DE SETORES *	FREQÜÊNCIA
MC	33	73	2,21
MC + Benlate	31	112	3,61

\* Somente setores bem evidentes foram considerados

TABELA 09 - Freqüência de setores da linhagem Awm 3 submetida aos dois tratamentos

TRATAMENTO	NÚMERO DE PLACAS	NÚMERO DE SETORES *	FREQÜÊNCIA
MC	21	92	4,38
MC + Benlate	29	190	6,55

\* Somente setores bem evidentes foram considerados

TABELA 10 - Análise de variância dos dados da Tabela 08

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Tratamento	1	0,9963	0,9963	48,8407**
Resíduo	13	0,2647	0,0204	
		CV = 8,12%		

\*\* Significativo ao nível de 1%

TABELA 11 - Análise de variância dos dados da tabela 09

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Tratamento	1	0,6590	0,6590	14,5796**
Resíduo	14	0,6332	0,0452	
		CV = 8,79%		

\*\* Significativo ao nível de 1%

Como pode ser observado, as linhagens NRRL 3112 e Awm 3 apresentaram diferenças significativas quanto a formação de setores nos diferentes tratamentos.

#### 4.5. Efeito da acetona no crescimento das colônias.

Este teste foi realizado de acordo com o descrito no item 3.11., e os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 12.

A análise estatística foi feita com os dados obtidos em MC e em MC contendo a menor quantidade de acetona, ou seja, 1,0 µl/ml (Tabela 13).

TABELA 12 - Média do diâmetro das colônias (em mm) das várias linhagens e setores crescidos em MC e em MC contendo acetona

LINHAGENS E SETORES	MC + ACETONA ( $\mu$ l/ml)				
	0,0	1,0	2,0	4,0	7,5
NRRL 3112	31,00	29,25	27,25	27,25	21,00
P <sub>1</sub> *	29,50	27,00	26,50	25,50	20,05
A <sub>3</sub>	29,00	27,50	26,50	26,50	19,75
<u>Awm 3</u>	26,25	25,50	24,00	22,50	20,50
<u>arg/pro crm</u> **	19,25	18,00	17,50	18,00	17,00
<u>arg/pro whi</u> **	23,50	20,00	12,75	14,25	13,75
S <sub>1</sub>	30,75	26,25	26,50	22,00	20,25
S <sub>2</sub>	19,50	19,25	19,25	20,00	17,25
S <sub>3</sub>	22,75	22,50	21,75	21,00	19,25
S <sub>4</sub>	22,25	22,00	21,25	19,50	19,50
S <sub>5</sub>	25,00	24,50	24,25	24,75	20,00
S <sub>6</sub>	24,50	24,25	24,50	24,25	20,00
S <sub>7</sub>	22,25	22,50	22,00	19,25	18,75
S <sub>8</sub>	22,00	22,00	22,50	21,25	19,50
S <sub>9</sub>	22,75	21,25	21,50	21,00	19,75
S <sub>10</sub>	29,00	24,75	24,25	21,25	17,25
S <sub>11</sub>	23,25	23,25	24,50	23,00	17,00
S <sub>12</sub>	22,50	22,00	22,50	21,00	19,75
S <sub>13</sub>	22,00	21,50	21,50	20,00	19,75
S <sub>14</sub>	22,25	21,50	20,50	19,50	18,00
S <sub>15</sub>	18,75	17,25	17,00	16,50	13,75
S <sub>16</sub>	18,75	18,00	17,50	17,50	15,00

\* Para os símbolos, consultar a Figura 01 e a Tabela 03

\*\* Mutantes morfológicos isolados a partir da linhagem Awm 3

TABELA 13 - Análise de variância para os dados da Tabela 12

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	DESVIO PADRÃO	F
Blocos	3	6,727	2,242	1,497	1,531 <sup>NS</sup>
Linhagem	21	1988,545	94,693	9,731	9,950 *
Resíduo (a)	63	60,273	0,957	0,978	
Parcelas	87	2055,545	23,627	4,861	
Meios	1	63,841	63,841	7,990	10,447 *
Interação	21	76,659	3,650	1,911	2,498 *
Resíduo (b)	153	89,500	0,585	0,765	
CV = 3,28%					

\* Significativo ao nível de 5%

NS Não significativo

Como pode ser observado, tanto as linhagens quanto os meios de cultura diferiram entre si. O fato da interação ser também significativa, indica que as linhagens e setores apresentaram comportamento discrepante, ou seja, algumas cresceram menos em MC contendo acetona, outras não.

Observou-se também nesse experimento que além das linhagens NRRL 3112 e Awm 3, os setores S<sub>1</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>6</sub>, S<sub>7</sub>, S<sub>11</sub> e o derivativo A<sub>1</sub> (Figura 01), apresentaram formação de setores em MC e/ou MC contendo acetona.

#### 4.6. Caracterização das linhagens NRRL 3112, Awm 3, alguns de seus derivados e setores

##### 4.6.1. Auxotrofia

Os 53 setores isolados (Tabela 03) foram testados quanto à auxotrofia de acordo com o descrito no item 3.14.1., e apresentaram, sem exceção, deficiência nutricional para os aminoácidos arginina ou prolina.

##### 4.6.2. Sensibilidade ao Benlate diluído em água

Todos os setores, excetuando-se o T<sub>19</sub> e o T<sub>20</sub> (Tabela 03), foram tratados com Benlate conforme o descrito no item 3.14.2.. O crescimento por eles apresentado foi comparado ao das linhagens NRRL 3112 e Awm 3, e os resultados obtidos encontram-se sumarizados nas Tabelas 14 e 15.

TABELA 14 - Comparação da linhagem Awm 3 com seus setores, em relação às médias dos diâmetros (em mm) das colônias crescidas em MC e em MC contendo Benlate

SETOR	MC	MC + BENLATE (2,0 µg/ml)
S <sub>1</sub> *	22,33(19,67)**	7,67(7,67)
S <sub>2</sub>	18,33(19,67)	6,67(7,67)
S <sub>3</sub>	20,00(20,67)	7,33(6,33)
S <sub>4</sub>	19,33(20,67)	7,00(6,33)
S <sub>5</sub>	18,67(20,33)	5,67(5,67)
S <sub>6</sub>	22,67(20,33)	6,67(5,67)
S <sub>7</sub>	20,67(19,33)	6,67(5,67)
S <sub>8</sub>	20,33(19,33)	8,67(5,67)
S <sub>9</sub>	22,33(20,33)	4,00(4,00)
S <sub>10</sub>	21,00(20,33)	3,67(4,00)
S <sub>11</sub>	17,00(19,33)	4,67(4,00)
S <sub>12</sub>	20,33(19,33)	5,33(4,00)
S <sub>13</sub>	23,00(21,33)	9,33(5,33)
S <sub>14</sub>	22,33(21,33)	7,33(5,33)
S <sub>15</sub>	21,00(20,33)	5,33(3,67)
S <sub>16</sub>	19,33(20,33)	4,67(3,67)
S <sub>17</sub>	16,67(19,00)	8,33(7,00)
S <sub>18</sub>	22,00(19,00)	9,67(7,00)
S <sub>19</sub>	20,00(19,00)	2,33(6,33)
S <sub>20</sub>	21,33(19,00)	4,00(6,33)
S <sub>21</sub>	20,67(21,00)	6,33(6,00)
S <sub>22</sub>	24,33(21,00)	7,00(6,00)
S <sub>23</sub>	23,00(20,00)	6,33(6,33)
S <sub>24</sub>	21,33(20,00)	5,00(6,33)
S <sub>25</sub>	22,00(21,33)	4,67(4,00)

\* Para os símbolos, consultar a Tabela 03

\*\* Os números entre parênteses referem-se às médias da linhagem Awm 3 inoculada como controle na mesma placa.

TABELA 15 - Comparação da linhagem NRRL 3112 com seus setores, em relação às médias dos diâmetros (em mm) das colônias crescidas em MC e em MC contendo Benlate

SETOR	MC	MC + BENLATE (2,0 µg/ml)
T <sub>1</sub> *	21,00(21,67)**	6,00(6,67)
T <sub>2</sub>	20,67(21,67)	6,33(6,67)
T <sub>3</sub>	20,00(21,00)	4,33(5,00)
T <sub>4</sub>	22,00(21,00)	5,00(5,00)
T <sub>5</sub>	20,00(20,33)	4,00(4,00)
T <sub>6</sub>	20,00(20,33)	3,33(4,00)
T <sub>7</sub>	19,33(19,33)	3,33(4,00)
T <sub>8</sub>	19,67(19,33)	3,67(4,00)
T <sub>9</sub>	18,67(20,00)	2,67(3,00)
T <sub>10</sub>	18,33(20,00)	3,67(3,00)
T <sub>11</sub>	20,67(23,00)	7,00(8,00)
T <sub>12</sub>	21,67(23,00)	6,33(8,00)
T <sub>13</sub>	19,00(21,33)	8,67(8,33)
T <sub>14</sub>	22,67(21,33)	10,33(8,33)
T <sub>15</sub>	22,33(24,00)	6,33(7,67)
T <sub>16</sub>	21,67(24,00)	6,00(7,67)
T <sub>17</sub>	18,33(21,67)	7,33(9,00)
T <sub>18</sub>	23,00(21,67)	8,67(9,00)

\* Para os símbolos, consultar a Tabela 03

\*\* Os números entre parênteses referem-se às médias da linhagem NRRL 3112 inoculada como controle na mesma placa.

Pode ser observado que nenhum dos setores apresentou grande discrepância de crescimento em relação às linhagens NRRL 3112 e Awm 3.

No decorrer deste teste, a linhagem Awm 3 produziu setores amarelos, inicialmente observados em MC contendo Benlate, e depois, também em MC. A análise de uma amostra de conídios da linhagem Awm 3, tomada nesse período, revelou que parte deles originava colônias iguais à Awm 3, e os demais originavam colônias morfológicamente iguais aos setores amarelos. Esses setores foram isolados (item 3.13.) e caracterizados quanto à auxotrofia (item 3.14.1.), sendo todos deficientes para a síntese de arginina ou prolina. As colônias morfológicamente iguais à Awm 3 continuaram a produzir setores amarelos.

A linhagem NRRL 3112 e seus setores T<sub>4</sub>, T<sub>7</sub>, T<sub>13</sub> e T<sub>16</sub> também produziram setores no decorrer desse teste. Dois deles são morfológicos, sendo um com micélio amarelo e poucos conídios e o outro com conídios de coloração branca.

#### 4.6.3. Números de núcleos por conídio

Excetuando-se o setor T<sub>19</sub>, o restante dos setores isolados das linhagens NRRL 3112 e Awm 3, e alguns de seus derivados (Tabela 03), foram estudados quanto ao número de núcleos por conídio, de acordo com o descrito no item 3.14.3..

Os resultados obtidos encontram-se sumarizados nas Tabelas 16 e 17.

TABELA 16 - Porcentagem do número de núcleos por contido das várias linhagens e setores

LINHAGENS E SETORES	NÚMERO DE NÚCLEOS POR CONTÍDIO						NÚMERO DE CONTÍDIOS AMOSTRADOS
	1	2	3	4	5	6	
NRRL 3112	58,0	40,7	1,3	-	-	-	332
P <sub>1</sub> *	68,0	31,5	0,5	-	-	-	308
A <sub>3</sub>	70,0	29,0	1,0	-	-	-	307
<u>A<sub>wm</sub> 3</u>	9,5	53,8	27,7	7,3	1,7	-	303
<u>arg/pro crm<sub>1</sub></u>	28,9	40,9	22,4	7,8	-	-	308
<u>arg/pro whi<sub>1</sub></u>	14,8	48,1	31,9	4,5	0,7	-	310
S <sub>1</sub>	21,9	67,6	8,3	2,2	-	-	324
S <sub>2</sub>	54,8	37,7	5,2	2,3	-	-	310
S <sub>3</sub>	23,2	70,5	5,9	0,3	-	-	319
S <sub>4</sub>	43,3	47,5	7,6	1,6	-	-	316
S <sub>5</sub>	30,0	59,4	9,6	1,0	-	-	303
S <sub>6</sub>	36,7	53,1	7,3	2,9	-	-	305
S <sub>7</sub>	30,5	57,9	8,3	3,3	-	-	302
S <sub>8</sub>	38,7	55,2	5,2	0,6	-	0,3	308
S <sub>9</sub>	29,0	58,0	11,0	2,0	-	-	300
S <sub>10</sub>	45,9	44,3	7,9	1,9	-	-	324
S <sub>11</sub>	32,4	58,0	9,3	0,3	-	-	318
S <sub>12</sub>	43,7	44,9	10,0	0,7	0,7	-	305
S <sub>13</sub>	11,5	42,3	44,6	1,6	-	-	314
S <sub>14</sub>	33,3	60,1	6,0	0,6	-	-	316
S <sub>15</sub>	61,8	33,7	4,2	0,3	-	-	306
S <sub>16</sub>	48,0	48,9	3,1	-	-	-	331

\* Para símbolos das linhagens e setores, consultar as Figuras 01 e 06 e a Tabela 03

TABELA 17 - Porcentagem do número de núcleos por conídio das várias linhagens e setores

LINHAGENS E SETORES	NÚMERO DE NÚCLEOS POR CONÍDIO					NÚMERO DE CONÍDIOS AMOSTRADOS
	1	2	3	4	5	
NRRL 3112	58,0	40,7	1,3	-	-	332
<u>Awm</u> 3	9,5	53,8	27,7	7,3	1,7	303
T <sub>1</sub> *	63,3	35,7	1,0	-	-	300
T <sub>2</sub>	66,0	33,3	0,7	-	-	300
T <sub>3</sub>	66,7	33,3	-	-	-	309
T <sub>4</sub>	56,1	43,9	-	-	-	312
T <sub>5</sub>	66,8	33,2	-	-	-	307
T <sub>6</sub>	70,7	29,0	0,3	-	-	307
T <sub>7</sub>	62,2	37,2	0,6	-	-	320
T <sub>8</sub>	66,8	32,6	0,6	-	-	319
T <sub>9</sub>	56,8	41,9	1,3	-	-	308
T <sub>10</sub>	61,9	37,5	0,6	-	-	323
T <sub>11</sub>	51,6	47,8	0,6	-	-	318
T <sub>12</sub>	53,7	46,3	-	-	-	307
T <sub>13</sub>	70,7	29,0	0,3	-	-	314
T <sub>14</sub>	69,8	30,2	-	-	-	378
T <sub>15</sub>	66,5	33,2	0,3	-	-	316
T <sub>16</sub>	67,1	33,3	0,6	-	-	310
T <sub>17</sub>	63,4	36,3	0,3	-	-	303
T <sub>18</sub>	54,9	44,5	0,6	-	-	306
T <sub>20</sub>	59,9	39,8	0,3	-	-	302
S <sub>17</sub>	35,3	60,7	3,3	0,7	-	300
S <sub>18</sub>	34,2	61,5	4,3	-	-	301
S <sub>19</sub>	42,9	52,5	4,0	0,6	-	305
S <sub>20</sub>	34,8	41,4	16,5	7,3	-	316
S <sub>21</sub>	49,4	49,0	1,6	-	-	318
S <sub>22</sub>	36,0	61,0	2,3	0,7	-	300
S <sub>23</sub>	33,0	64,7	2,3	-	-	306
S <sub>24</sub>	41,8	56,3	1,9	-	-	318
S <sub>25</sub>	40,8	55,9	3,3	-	-	304

\* Para os símbolos consultar as Figuras 01 e 06 e a Tabela 03

TABELA 18 - Análise de variância dos dados da Tabela 16

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Linhagem	21	3,711	0,177	855,000**
Resíduo	22	0,004	0,0002	
		CV = 0,793%		

\*\* Significativo ao nível de 1%

Os resultados do teste de Tukey, com diferença mínima significativa de 0,0565, das médias do número de núcleos por conídios apresentado pelas diversas linhagens e setores, encontram-se na Tabela 20.

TABELA 19 - Análise de variância dos dados da Tabela 17

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Linhagem	29	3,096	0,1067	70,233**
Resíduo	30	0,045	0,0015	
		CV = 2,60%		

\*\* Significativo ao nível de 1%

Os resultados do teste de Tukey, com diferença mínima significativa de 0,1599, das médias do número de núcleos por conídios apresentado pelas diversas linhagens e setores, encontram-se na Tabela 21.

TABELA 20 - Comparação das médias dos dados da Tabela 16

LINHAGENS E SETORES		M É D I A S			
<u>Avm</u> 3*	2,377	a**			
S <sub>14</sub>	2,366	a			
<u>arg/pro whi</u> <sub>1</sub>	2,281	b			
<u>arg/pro crm</u> <sub>1</sub>	2,091	c			
S <sub>1</sub>	1,908		d		
S <sub>10</sub>	1,860		d	e	
S <sub>8</sub>	1,845			e	
S <sub>2</sub>	1,843			e	
S <sub>3</sub>	1,834			e	
S <sub>6</sub>	1,816			e	f
S <sub>12</sub>	1,775				f
S <sub>7</sub>	1,764				f
S <sub>15</sub>	1,741				f g
S <sub>13</sub>	1,698				g
S <sub>9</sub>	1,679				g
S <sub>4</sub>	1,675				g
S <sub>11</sub>	1,657				g
S <sub>17</sub>	1,544				h
S <sub>16</sub>	1,431				i
NRRL 3112	1,425				i
P <sub>1</sub>	1,328				j
A <sub>3</sub>	1,306				j

\* Para símbolos das linhagens e setores, consultar as Figuras 01 e 06 e a Tabela 03

\*\* Médias com letras diferentes são significativamente diferentes ao nível de 5%

TABELA 21 - Comparação das médias dos dados da Tabela 17

LINHAGENS E SETORES		MÉDIAS									
Awm 3	2,377	a**									
S <sub>20</sub> *	1,964	b									
S <sub>17</sub>	1,701	c									
S <sub>18</sub>	1,701	c									
S <sub>23</sub>	1,693	c									
S <sub>25</sub>	1,631	c	d								
S <sub>22</sub>	1,676	c	d								
S <sub>19</sub>	1,623	c	d	e							
S <sub>24</sub>	1,599	c	d	e	f	g					
S <sub>21</sub>	1,509		d	e	f	g	h				
T <sub>12</sub>	1,464			e	f	g	h	i	j		
T <sub>11</sub>	1,458				f	g	h	i	j		
T <sub>18</sub>	1,457				f	g	h	i	j		
T <sub>9</sub>	1,445				f	g	h	i	j	k	
T <sub>6</sub>	1,442					g	h	i	j	k	
T <sub>4</sub>	1,438						h	i	j	k	
NRRL 3112	1,425						h	i	j	k	
T <sub>20</sub>	1,403						h	i	j	k	
T <sub>10</sub>	1,387						h	i	j	k	l
T <sub>1</sub>	1,376						h	i	j	k	l
T <sub>17</sub>	1,369						h	i	j	k	l
T <sub>2</sub>	1,346							i	j	k	l
T <sub>14</sub>	1,341							i	j	k	l
T <sub>8</sub>	1,339							i	j	k	l
T <sub>15</sub>	1,339							i	j	k	l
T <sub>16</sub>	1,335							i	j	k	l
T <sub>2</sub>	1,333								j	k	l
T <sub>5</sub>	1,332								j	k	l
T <sub>7</sub>	1,291									k	l
T <sub>13</sub>	1,239										l

\* Para os símbolos, consultar a Tabela 03

\*\* Médias com letras diferentes são significativamente diferentes ao nível de 5%

Pela Tabela 20, verifica-se grande variação entre as linhagens e setores no que se refere ao número de núcleos por conídio. A linhagem NRRL 3112 só não diferiu significativamente do setor  $S_{16}$  enquanto que a Awm 3, só não diferiu do setor  $S_{14}$ .

Pode ser verificado na Tabela 21, que a linhagem Awm 3 diferiu de todos os demais. Já a NRRL 3112, não diferiu significativamente da maioria de seus setores.

#### 4.6.4. Diâmetro de conídios

As mesmas linhagens, setores e derivados relacionados no item anterior, foram também estudados quanto ao diâmetro de conídios. O teste foi realizado de acordo com o descrito no item 3.14.4. e os resultados estão nas Tabelas 22 e 23.

TABELA 22 - Diâmetro dos conídios (em  $\mu\text{m}$ ) apresentado pelas várias linhagens e setores

LINHAGENS E SETORES	NÚMERO DE NÚCLEOS POR CONÍDIO					
	1	2	3	4	5	6
NRRL 3112	4,760(30)*	4,760(30)	4,760(3)	-	-	-
P <sub>1</sub> **	4,760(30)	4,800(30)	4,760(2)	-	-	-
A	4,720(30)	4,839(30)	4,760(2)	-	-	-
<u>Awm</u> 3	4,558(30)	4,677(30)	5,034(30)	5,438(21)	5,712(5)	-
<u>arg/pro crm</u> <sub>1</sub>	4,403(30)	4,439(30)	4,593(30)	4,808(24)	-	-
<u>arg/pro whi</u> <sub>1</sub>	4,562(30)	4,601(30)	4,879(30)	5,185(14)	5,355(2)	-
S <sub>1</sub>	4,760(30)	4,879(30)	5,289(27)	5,780(7)	-	-
S <sub>2</sub>	4,403(30)	4,486(30)	4,760(12)	5,506(7)	-	-
S <sub>3</sub>	4,324(30)	4,720(30)	5,073(19)	5,950(1)	-	-
S <sub>4</sub>	5,077(30)	5,355(30)	5,602(24)	5,950(5)	-	-
S <sub>5</sub>	4,800(30)	4,879(30)	5,293(29)	5,553(3)	-	-
S <sub>6</sub>	4,800(30)	4,879(30)	5,213(21)	5,421(9)	-	-
S <sub>7</sub>	4,998(30)	5,117(30)	5,504(24)	5,842(11)	-	-
S <sub>8</sub>	4,879(30)	5,355(30)	5,578(16)	5,950(2)	-	9,520(1)
S <sub>9</sub>	4,482(30)	4,919(30)	4,914(31)	5,950(6)	-	-
S <sub>10</sub>	4,879(30)	5,118(30)	5,569(25)	5,950(6)	-	-
S <sub>11</sub>	4,839(30)	4,919(30)	5,276(30)	5,950(1)	-	-
S <sub>12</sub>	4,760(30)	5,077(30)	5,038(30)	5,950(2)	6,545(2)	-
S <sub>13</sub>	4,681(30)	4,839(30)	4,958(30)	5,950(5)	-	-
S <sub>14</sub>	4,800(30)	4,641(30)	5,136(19)	5,950(2)	-	-
S <sub>15</sub>	4,998(30)	4,760(30)	4,943(13)	5,950(1)	-	-
S <sub>16</sub>	4,760(30)	4,879(30)	5,474(10)	-	-	-

\* Os números entre parenteses, representam o número de conídios amostrados

\*\* Para os símbolos das linhagens e setores, consultar as Figuras 01 e 06 e a Tabela 03

TABELA 23 - Diâmetro dos conídios (em  $\mu\text{m}$ ) apresentado pelas várias linhagens e setores

LINHAGENS E SETORES	NÚMERO DE NÚCLEOS POR CONÍDIO				
	1	2	3	4	5
NRRL 3112	4,760(30)*	4,760(30)	4,760(03)	-	-
<u>Awm</u> 3	4,588(30)	4,677(30)	5,034(30)	5,438(21)	5,712(05)
T <sub>1</sub> *	4,720(30)	4,879(30)	5,533(03)	-	-
T <sub>2</sub>	4,800(30)	4,879(30)	5,950(02)	-	-
T <sub>3</sub>	4,760(30)	4,839(30)	-	-	-
T <sub>4</sub>	4,720(30)	4,760(30)	-	-	-
T <sub>5</sub>	4,800(30)	4,839(30)	-	-	-
T <sub>6</sub>	4,720(30)	4,839(30)	-	-	-
T <sub>7</sub>	4,681(30)	4,800(30)	5,355(02)	-	-
T <sub>8</sub>	4,800(30)	4,839(30)	5,950(02)	-	-
T <sub>9</sub>	4,760(30)	4,800(30)	5,652(04)	-	-
T <sub>10</sub>	4,760(30)	4,800(30)	5,950(02)	-	-
T <sub>11</sub>	4,541(30)	4,953(30)	5,950(02)	-	-
T <sub>12</sub>	4,760(30)	4,800(30)	-	-	-
T <sub>13</sub>	4,720(30)	4,879(30)	5,950(01)	-	-
T <sub>14</sub>	4,760(30)	4,760(30)	-	-	-
T <sub>15</sub>	4,839(30)	4,839(30)	4,760(01)	-	-
T <sub>16</sub>	4,800(30)	4,958(30)	5,355(02)	-	-
T <sub>17</sub>	4,760(30)	4,839(30)	5,950(01)	-	-
T <sub>18</sub>	4,720(30)	4,800(30)	5,950(02)	-	-
T <sub>20</sub>	4,839(30)	4,958(30)	5,950(01)	-	-
S <sub>17</sub>	4,760(30)	4,839(30)	5,950(10)	-	-
S <sub>18</sub>	4,879(30)	4,879(30)	5,675(13)	-	-
S <sub>19</sub>	4,800(30)	4,958(30)	5,752(12)	5,950(02)	-
S <sub>20</sub>	4,800(30)	4,958(30)	4,958(30)	5,588(23)	-
S <sub>21</sub>	4,760(30)	4,760(30)	5,236(05)	-	-
S <sub>22</sub>	4,681(30)	4,958(30)	5,610(07)	5,952(02)	-
S <sub>23</sub>	4,760(30)	4,800(30)	5,950(07)	-	-
S <sub>24</sub>	4,839(30)	5,117(30)	5,950(06)	-	-
S <sub>25</sub>	4,839(30)	5,038(30)	5,831(10)	4,652(04)	-

\* Os números entre parênteses, representam o número de conídios amostrados

\*\* Para os símbolos, consultar a Tabela 03

TABELA 24 - Análise de variância dos dados da Tabela 22

FORTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Linhagem	21	2,010	0,096	6,000*
Resíduo	22	0,345	0,016	
CV = 2,57%				

\* Significativo ao nível de 5%

Os resultados do teste de Tukey, com diferença mínima significativa de 0,505 das médias do diâmetro de conídios apresentado pelas diversas linhas e setores, encontram-se sumarizados na Tabela 26.

TABELA 25 - Análise de variância dos dados da Tabela 23

FORTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Linhagem	29	0,6489	0,0224	4,9019**
Resíduo	30	0,1369	0,0045	
CV = 1,40%				

\*\* Significativo ao nível de 1%

Os resultados do teste de Tukey, com diferença mínima significativa de 0,2771, das médias do diâmetro de conídios apresentado pelas diversas linhas e setores, encontram-se sumarizados na Tabela 27.

TABELA 26 - Comparação das médias dos dados da Tabela 22

LINHAGENS E SETORES		M É D I A			
S <sub>4</sub>	5,362	a**			
S <sub>9</sub>	5,288	a	b		
S <sub>8</sub>	5,263	a	b	c	
S <sub>11</sub>	5,217	a	b	c	
S <sub>1</sub>	5,026	a	b	c	d
S <sub>12</sub>	5,021	a	b	c	d
S <sub>13</sub>	5,013	a	b	c	d
S <sub>6</sub>	5,006	a	b	c	d
S <sub>7</sub>	4,984	a	b	c	d
<u>Awm</u> 3	4,934	a	b	c	d
S <sub>16</sub>	4,933	a	b	c	d
S <sub>17</sub>	4,913	a	b	c	d
S <sub>14</sub>	4,873	a	b	c	d
S <sub>15</sub>	4,849		b	c	d
S <sub>10</sub>	4,847		b	c	d
P <sub>1</sub>	4,779			c	d
A <sub>3</sub>	4,779			c	d
NRRL 3112	4,760			c	d
arg/pro <u>whi</u> <sub>1</sub>	4,760			c	d
S <sub>3</sub>	4,672				d
S <sub>2</sub>	4,578				d
arg/pro <u>crm</u> <sub>1</sub>	4,540				d

\* Para os símbolos das linhagens e setores, consultar as Figuras 01 e 06 e a Tabela 03

\*\* Médias com letras diferentes são significativamente diferentes ao nível de 5%

TABELA 27 - Comparação das médias dos dados da Tabela 23

LINHAGENS E SETORES		M É D I A S				
S <sub>25</sub> *	5,098	a**				
S <sub>24</sub>	5,006	a	b			
S <sub>19</sub>	5,044	a	b	c		
S <sub>20</sub>	5,033	a	b	c	d	
S <sub>18</sub>	5,015	a	b	c	d	e
S <sub>17</sub>	5,007	a	b	c	d	e
S <sub>23</sub>	4,964	a	b	c	d	e
<u>Awm</u> 3	4,934	a	b	c	d	e
S <sub>22</sub>	4,932	a	b	c	d	e
T <sub>20</sub>	4,915	a	b	c	d	e
T <sub>3</sub>	4,879	a	b	c	d	e
T <sub>2</sub>	4,873	a	b	c	d	e
T <sub>8</sub>	4,855	a	b	c	d	e
T <sub>16</sub>	4,837	a	b	c	d	e
T <sub>1</sub>	4,835	a	b	c	d	e
T <sub>9</sub>	4,834	a	b	c	d	e
S <sub>21</sub>	4,834	a	b	c	d	e
T <sub>5</sub>	4,819		b	c	d	e
T <sub>13</sub>	4,818		b	c	d	e
T <sub>10</sub>	4,817		b	c	d	e
T <sub>11</sub>	4,811		b	c	d	e
T <sub>6</sub>	4,780			c	d	e
T <sub>12</sub>	4,780			c	d	e
T <sub>15</sub>	4,780			c	d	e
T <sub>17</sub>	4,780			c	d	e
NRRL 3112	4,760				d	e
T <sub>7</sub>	4,760				d	e
T <sub>14</sub>	4,760				d	e
T <sub>18</sub>	4,760				d	e
T <sub>4</sub>	4,740					e

\* Para os símbolos consultar a Tabela 03

\*\* As médias com letras diferentes diferem ao nível de 5%

A linhagem Awm 3 não diferiu significativamente de nenhuma das linhagens utilizadas no experimento, enquanto que a linhagem NRRL 3112, diferiu dos setores  $S_4$  e  $S_9$  (Tabela 26).

Pela Tabela 27, observa-se também que a linhagem Awm 3 não diferiu significativamente de nenhuma linhagem ou setor. Já a NRRL 3112 diferiu apenas dos setores  $S_{19}$ ,  $S_{24}$  e  $S_{25}$ .

#### 4.6.5. Correlação entre número de núcleos e diâmetro de conídios

O coeficiente de correlação entre essas duas variáveis foi estimado para todas as linhagens, setores e derivativos, em  $r = 0,077$ , não diferindo significativamente de zero ( $t = 0,5400$ ; G.L. = 48;  $P < 0,05$ ).

#### 4.7. Comparação da frequência da formação de setores entre a linhagem NRRL 3112 e o setor $T_{19}$

O setor  $T_{19}$  (Tabela 03), produz grande número de setores. Esta característica foi comparada à da linhagem NRRL 3112, de acordo com item 3.12.2.. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 28.

TABELA 28 - Frequência de setores da linhagem NRRL 3112 e do setor  $T_{19}$ , quando crescidos em MC

LINHAGEM	NÚMERO DE PLACAS	NÚMERO DE SETORES*	FREQÜÊNCIA
NRRL 3112	33	73	2,21
$T_{19}$	21	165	7,86

\* Somente setores bem evidentes foram considerados

TABELA 29 - Análise de variância dos dados da Tabela 28

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Linhagem	1	7,0391	7,0391	138,5630 **
Resíduo	16	0,8124	0,0508	
CV = 10,9%				

\*\* Significativo ao nível de 1%

Verifica-se, portanto, que a linhagem NRRL 3112 diferiu significativamente do setor  $T_{19}$ , quanto a produção de setores.

4.8. Número, porcentagem relativa, porcentagem de viabilidade e curvas de sobrevivência de conídios das linhagens Awm 3 e NRRL 3112, após tratamento com luz ultravioleta (UV)

Experimentos foram conduzidos de acordo com o descrito no item 3.5., com o objetivo de determinar a porcentagem de conídios viáveis nas linhagens NRRL 3112 e Awm 3. Os resultados obtidos estão na Tabela 30 e, a partir deles, foram efetuadas correções para todas as estimativas do número de conídios realizadas posteriormente.

Os tratamentos com UV foram feitos de acordo com o item 3.15.1.. As curvas de sobrevivência são mostradas na Figura 05, e os resultados dos números e porcentagens relativas dos conídios sobreviventes estão sumarizados nas Tabelas 31 e 32. As  $LD_{95}$  das linhagens NRRL 3112 e Awm 3 foram respectivamente 15,0 e 15,6 minutos.

TABELA 30 - Porcentagem de conídios viáveis nas linhagens NRRL 3112 e Awm 3

LINHAGEM	NÚMERO DE CONÍDIOS OBSERVADOS				MÉDIA	NÚMERO DE CONÍDIOS ESPERADO	PORCENTAGEM DE VIABILIDADE
	01	02	03	04			
NRRL 3112	89,0	110,0	98,0	111,0	102,0	340,0	30
<u>Awm</u> 3	173,0	182,0	156,0	199,0	177,5	325,0	55

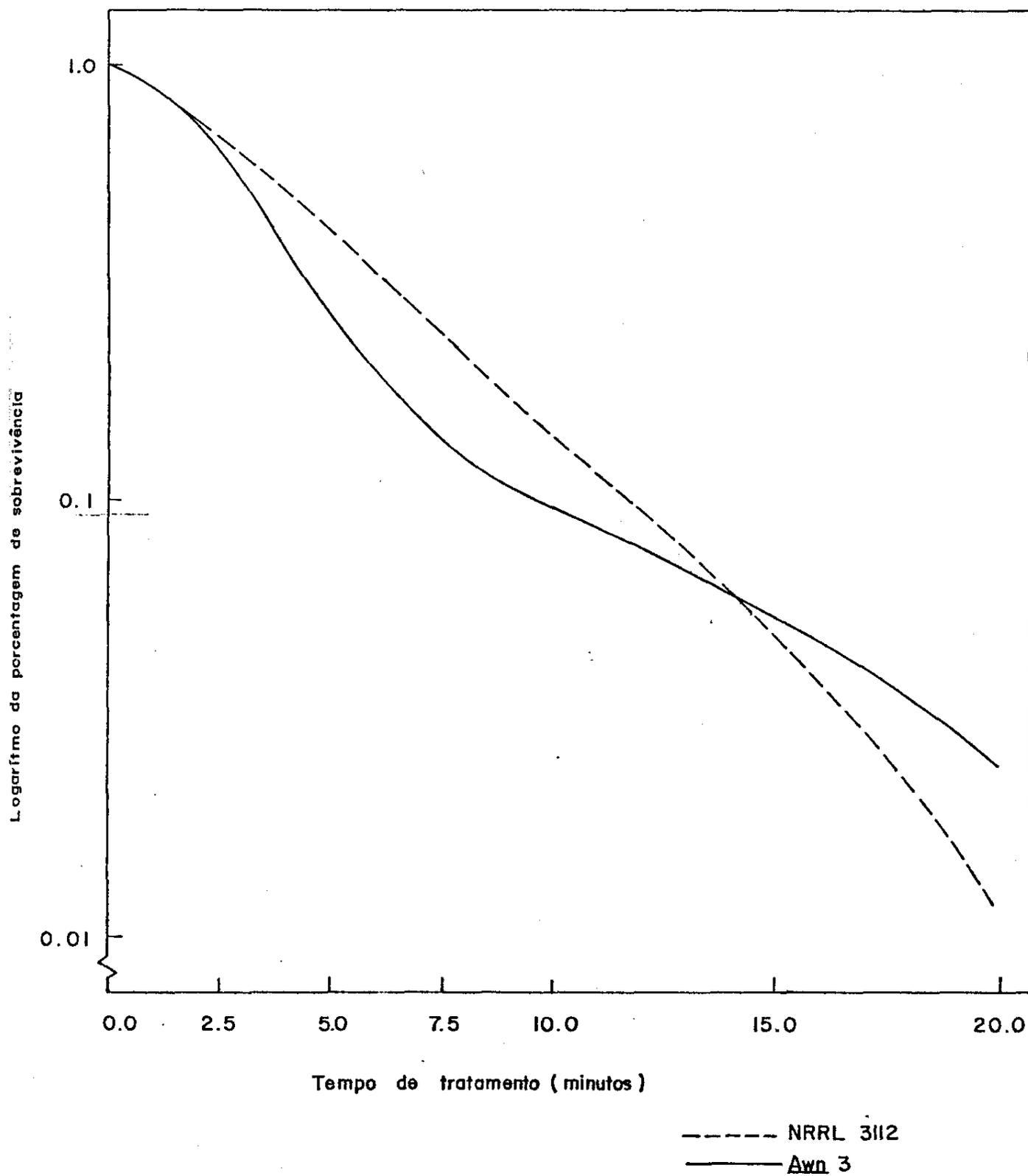
TABELA 31 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem NRRL 3112, ao tratamento com luz UV

TEMPO (MINUTOS)	MÉDIA DE CONÍDIOS VIÁVEIS/ml		PORCENTAGEM RELATIVA DE SOBREVIVÊNCIA	
	1ª REPETIÇÃO	2ª REPETIÇÃO	1ª REPETIÇÃO	2ª REPETIÇÃO
0,0	1330,0	830,0	100,00	100,00
2,5	975,0	492,5	73,31	59,34
5,0	587,0	377,5	44,13	45,48
7,5	250,0	225,0	18,80	27,11
10,0	105,0	160,0	7,89	19,28
15,0	22,5	72,5	1,69	8,73
20,0	2,5	17,5	0,19	2,11

TABELA 32 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem Awm 3, ao tratamento com luz UV

TEMPO (MINUTOS)	MÉDIA DE CONÍDIOS VIÁVEIS/ml		PORCENTAGEM RELATIVA DE SOBREVIVÊNCIA	
	1ª REPETIÇÃO	2ª REPETIÇÃO	1ª REPETIÇÃO	2ª REPETIÇÃO
0,0	960,0	1015,0	100,00	100,00
2,5	492,5	745,0	51,30	73,40
5,0	207,5	287,5	21,61	28,32
7,5	137,5	122,5	14,32	12,07
10,0	92,5	105,0	9,63	10,34
15,0	65,0	45,0	6,77	4,43
20,0	35,0	13,7	3,64	1,35

Figura 5 — Curvas de sobrevivência das linhagens NRRL 3112 e Awn 3, a luz ultravioleta.



#### 4.9. Isolamento de mutantes auxotróficos e morfológicos

##### 4.9.1. Método do isolamento total

Cerca de 2000 colônias da linhagem Awm 3 sobreviventes ao tratamento com UV, e 1200 colônias da linhagem NRRL 3112, foram testadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.15.2.1.1..

A frequência de auxotróficos apresentada pela linhagem Awm 3 foi zero. Três mutantes morfológicos foram isolados entre oito obtidos (Figura 06).

Quanto a linhagem NRRL 3112, foi obtido apenas um mutante auxotrófico e dois com alterações morfológicas. Os mutantes morfológicos foram isolados de acordo com o descrito no item 3.15.2.2..

##### 4.9.2. Método de filtração

Este método descrito no item 3.15.2.1.2., foi aplicado apenas na linhagem NRRL 3112. No primeiro experimento, foi isolado um mutante morfológico simbolizado por arg/pro mor<sub>1</sub> gre<sub>1</sub> (Figura 06). Este mutante foi utilizado nos experimentos seguintes, e a partir dele, três mutantes auxotróficos foram isolados (Figura 06).

A Tabela 33 resume os resultados obtidos, e pode-se observar que mutantes auxotróficos foram isolados somente quando o processo de filtração foi repetido duas vezes.

#### 4.10. Frequência de reversão das mutações auxotróficas

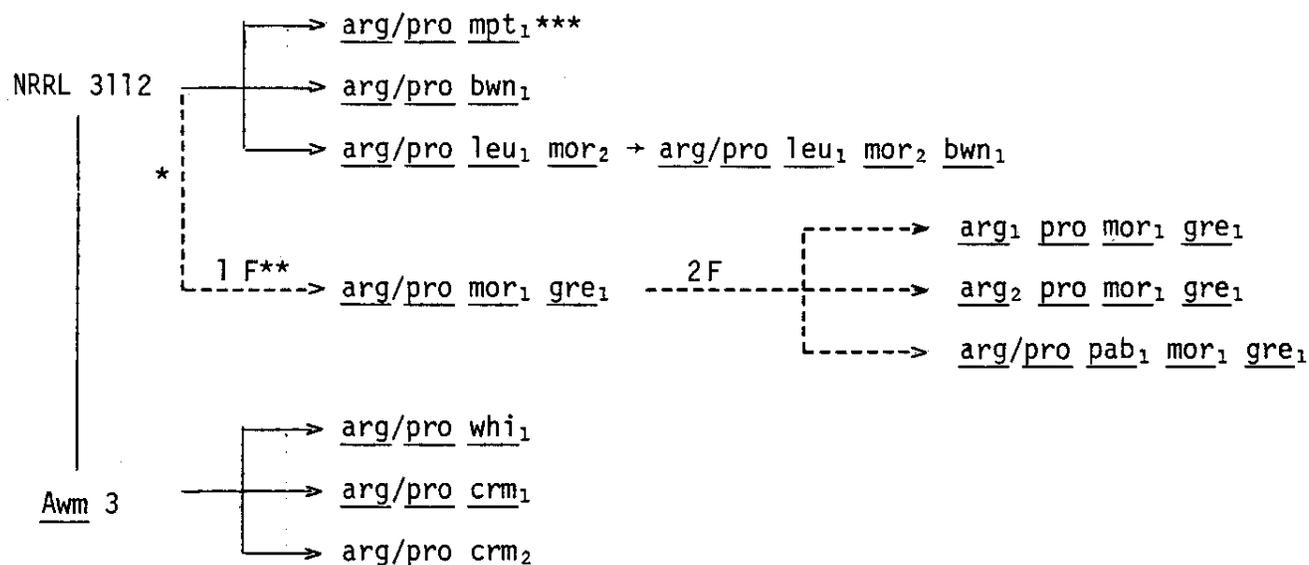
Os resultados obtidos nesse sentido, estão sumarizados na Tabela 34. O teste foi conduzido segundo metodologia descrita no item 3.16.

TABELA 33 - Número de mutantes obtidos com o método da filtração nas linhagens NRRL 3112 e arg/pro gre<sub>1</sub>

LINHAGEM	NÚMERO DE FILTRAÇÕES	NÚMERO DE COLÔNIAS AMOSTRADAS	NÚMERO DE MUTANTES OBTIDOS AUXOTRÓFICOS MORFOLÓGICOS	
NRRL 3112	1	500	0	1
<u>arg/pro gre<sub>1</sub></u> *	1	300	0	0
<u>arg/pro gre<sub>1</sub></u>	2	286	3	0

\* Para os símbolos, ver Figura 06

FIGURA 06 - Genealogia dos mutantes auxotróficos e morfológicos isolados após tratamento com UV, das linhagens NRRL 3112 e Awm 3



\* As setas tracejadas indicam que os mutantes foram obtidos pelo método de filtração, enquanto que, as setas contínuas foram usadas para os mutantes obtidos pelo método do isolamento total

\*\* 1F e 2F significam respectivamente, uma filtração e duas filtrações

\*\*\* Os símbolos usados para os mutantes indicam:

arg/pro → deficiência para a síntese de arginina ou prolina; a adição de arginina ou prolina no meio mínimo provoca o crescimento.

arg pro → deficiência para a síntese de arginina e prolina; nesse caso é necessária a adição dos dois aminoácidos para que ocorra o crescimento.

leu → deficiência para a síntese de leucina

pab → deficiência para a síntese do ácido p-aminobenzóico.

mpt → formação de pigmento preto no meio de cultura

mor<sub>1</sub> e mor<sub>2</sub> → Consultar os itens 3.21.2.2. e 3.21.2.3..

bwn → Conídios de coloração marrom.

gre → Conídios de coloração verde.

whi → Conídios de coloração branca.

crm → Conídios de coloração creme.

TABELA 34 - Teste da frequência de reversão das deficiências nutricionais de mutantes obtidos da linhagem NRRL 3112

MUTANTES	REVERSÃO	MARCA	CONÍDIOS POR PLACA	TOTAL DE CONÍDIOS AMOSTRADOS	FREQÜÊNCIA DE REVERSÃO
<u>arg/pro leu</u> <sub>1</sub> *	leu ---	leu <sup>+</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>	0
<u>arg/pro pab</u> <sub>1</sub>	pab --	pab <sup>+</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>	0
<u>arg</u> <sub>1</sub> <u>pro</u>	arg --	arg <sup>+</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>	0
<u>arg</u> <sub>2</sub> <u>pro</u>	arg --	arg <sup>+</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>	0
A <sub>3</sub> **	arg/pro --	arg <sup>+</sup> /pro <sup>+</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>	0
A <sub>wm</sub> 3	arg/pro --	arg <sup>+</sup> /pro <sup>+</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>	0

\* Para os símbolos dos mutantes ver Figura 06

\*\* Ver Figura 01

#### 4.11. Evidenciação do bloqueio metabólico na via biossintética dos aminoácidos arginina e prolina

Este experimento foi realizado de acordo com o descrito no ítem 3.17., e os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 35.

#### 4.12. Resistência ao Brometo de Etídio

##### 4.12.1. Número, porcentagens relativas e curva de sobrevivência de conídios do mutante arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> gre<sub>1</sub>, após tratamento com Brometo de Etídio

O experimento foi realizado de acordo com o descrito no ítem 3.18.1.. A curva de sobrevivência é mostrada na Figura 07, e os resultados obtidos dos números e porcentagens relativas dos conídios sobreviventes estão sumarizados na Tabela 36. A LD<sub>95</sub> foi 12,5 µg/ml.

##### 4.12.2. Isolamento de mutantes resistentes espontâneos

Seguindo metodologia descrita no ítem 3.18.2. e trabalhando com o mutante arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> gre<sub>1</sub>, tentou-se inicialmente isolar mutantes resistentes ao Brometo de Etídio utilizando a concentração de 19,0 µg/ml, visto que nenhum conídio se desenvolveu nessa dose (Tabela 36). No entanto a concentração teve que ser aumentada para 24,0 µg/ml, uma vez que muitas colônias se desenvolveram em 19,0 µg/ml.

TABELA 35 - Crescimento das linhagens e mutantes em MC, em MM e em MM suplementado .

LINHAGEM	M C	M M	M M COM SUPLEMENTAÇÃO								
			ARG*	PRO	ARG	A G	CIT	ORN	PRO	PRO	PRO
									A G	CIT	ORN
NRRL 3112	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>Awm 3</u>	+	(- +)	+	+	+	(- +)	+	+	+	+	+
<u>arg/pro mor<sub>1</sub> gre<sub>1</sub></u>	+	(- +)	+	+	+	(- +)	+	+	+	+	+
<u>arg<sub>1</sub> pro mor<sub>1</sub> gre<sub>1</sub></u>	+	-	(- +)	-	+	-	-	-	-	-	-
<u>arg<sub>2</sub> pro mor<sub>1</sub> gre<sub>1</sub></u>	+	-	+	-	+	-	(- +)	-	-	+	-

+	crescimento normal	ARG	arginina
-	ausência de crescimento	PRO	prolina
(- +)	crescimento residual	A G	ácido glutâmico
		CIT	citrulina
		ORN	ornitina

Fig. 7 — Curva de sobrevivência da linhagem arg / pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> gre<sub>1</sub> ao Brometo de Etídio.

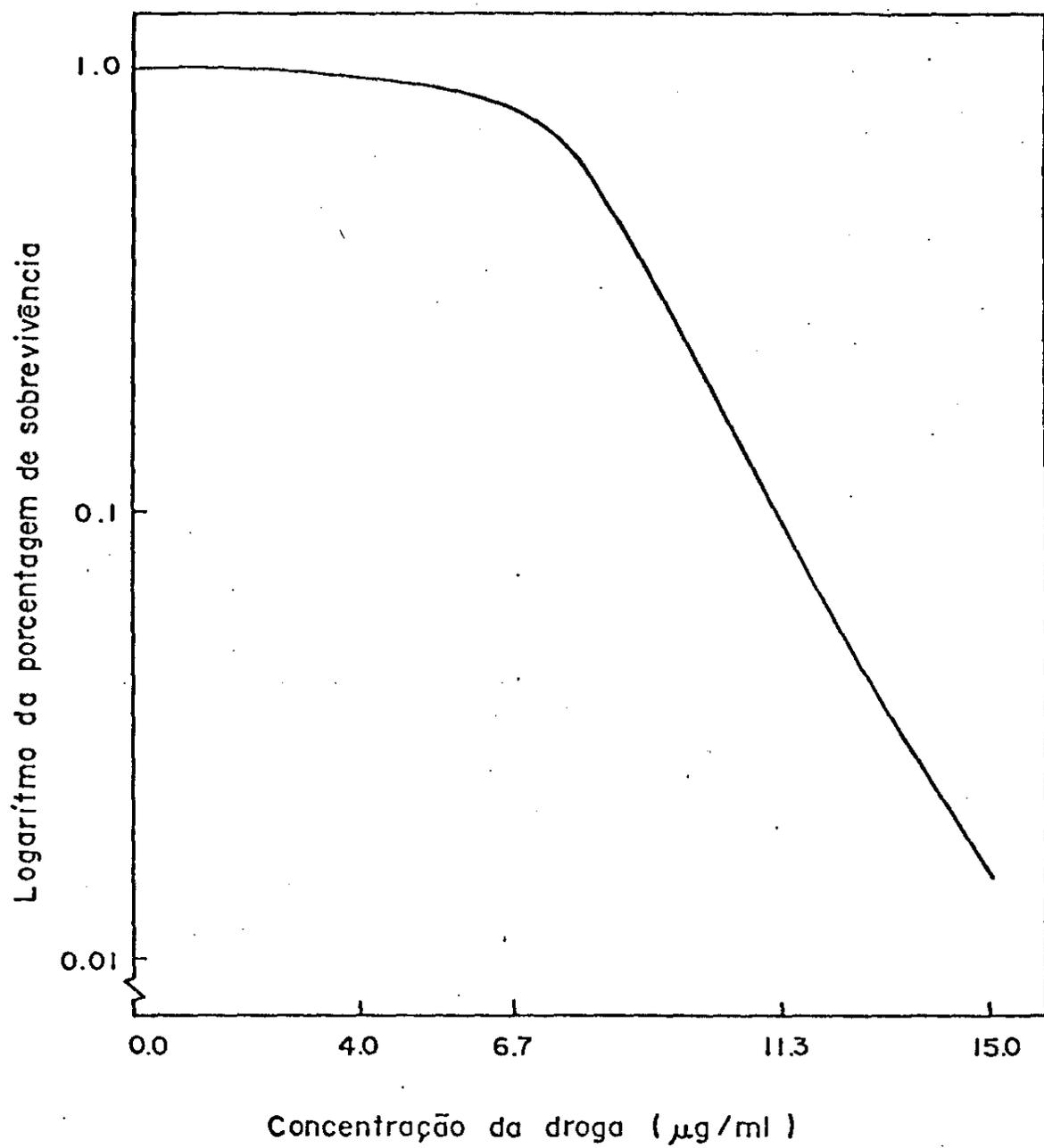


TABELA 36 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> gre<sub>1</sub> ao tratamento com Brometo de Etídio

CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/ml}$ )	MÉDIA DE CONÍDIOS VIÁVEIS/ml	PORCENTAGEM RELATIVA SOBREVIVÊNCIA
0,0	1290,0	100,0
4,0	1213,3	94,1
6,7	1100,0	85,3
11,3	116,7	9,0
15,0	20,0	1,5
19,0	00,0	0,0

Utilizando a dose maior foi observada uma média de 6 colônias por placa, das quais, 10 foram isoladas e testadas. Nenhuma se mostrou resistente.

Foi observado também a presença de dois tipos de colônias. Parte delas apresentou crescimento reduzido enquanto que as demais, eram maiores.

#### 4.12.3. Isolamento de mutantes resistentes induzidos

Mutantes resistentes ao Brometo de Etídio foram obtidos a partir do mutante arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> gre<sub>1</sub>, após tratamento com luz UV, de acordo com o descrito no item 3.18.3..

Desse experimento foram isoladas 15 colônias prováveis mutantes, das quais, 4 se apresentaram mais vigorosas e após terem sido testadas se mostraram resistentes. Uma delas foi selecionada e simbolizada por arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sub>1</sub><sup>r</sup> gre<sub>1</sub>.

As linhagens sensíveis ao Brometo de Etídio foram simbolizadas por etb<sub>1</sub><sup>s</sup>.

#### 4.12.4. Curva de resistência

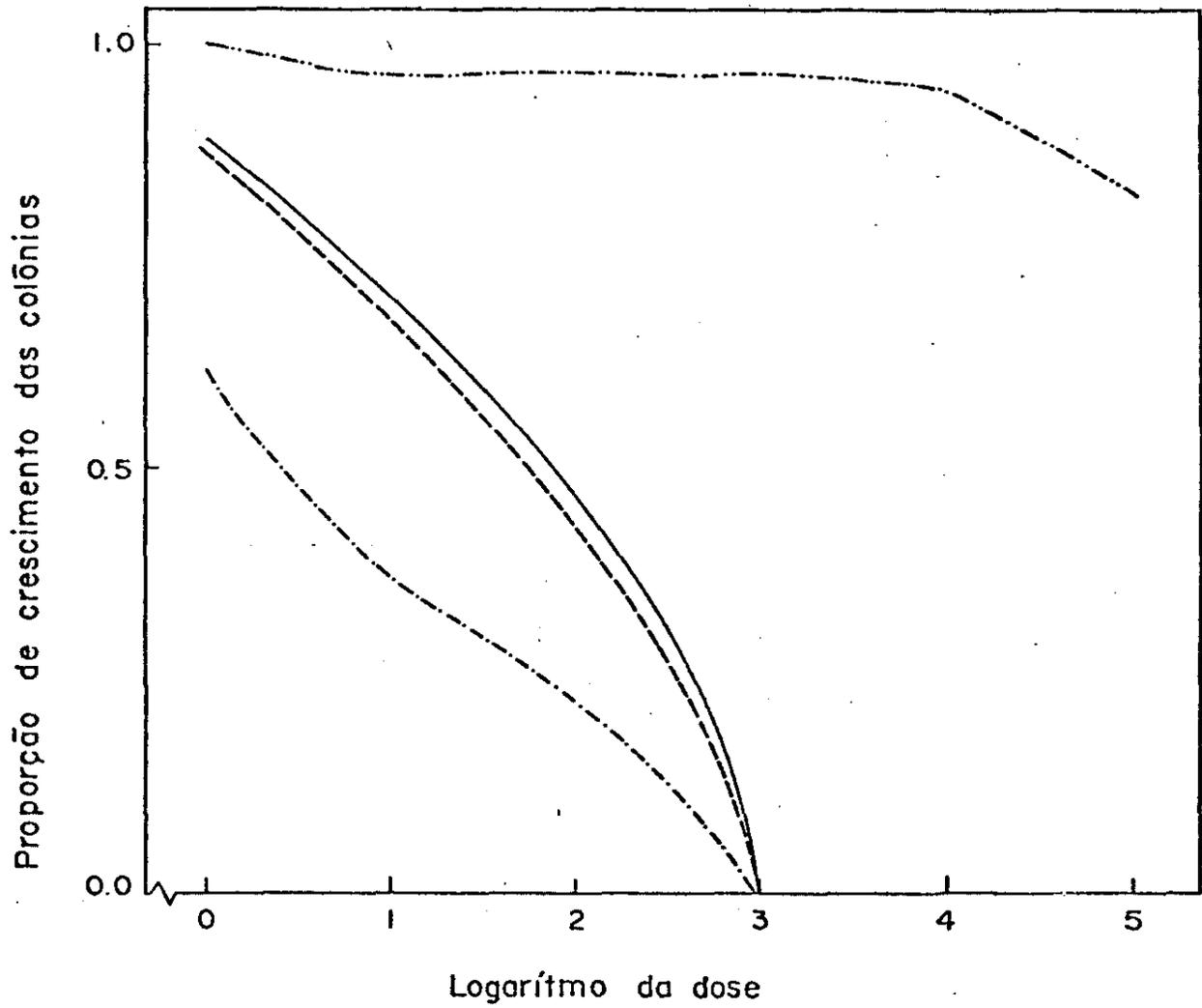
As linhagens representadas na Tabela 37, foram testadas de acordo com o descrito no item 3.18.4.. Os resultados obtidos encontram-se na mesma Tabela, a partir dos quais foram traçadas as curvas de resistência (Figura 08).

TABELA 37 - Médias do diâmetro de colônias dos vários mutantes, submetidos ao tratamento com Brometo de Etídio em várias concentrações

MUTANTES	MC + BROMETO DE ETÍDIO ( $\mu\text{g/ml}$ )						
	0,0	4,0	6,7	11,3	19,0	32,0	53,0
<u>arg/pro</u> <u>pab<sub>1</sub></u> <u>mor<sub>1</sub></u> <u>etb<sup>r</sup></u> <u>gre<sub>1</sub><sup>*</sup></u>	23,00	20,67	20,00	20,00	20,00	19,67	17,00
<u>arg/pro</u> <u>pab<sub>1</sub></u> <u>mor<sub>1</sub></u> <u>etb<sup>s</sup></u> <u>gre<sub>1</sub></u>	24,33	18,33	14,67	9,67	0,00	0,00	0,00
<u>arg/pro</u> <u>leu<sub>1</sub></u> <u>mor<sub>2</sub></u> <u>etb<sup>s</sup></u> <u>bw<sub>1</sub></u>	21,30	18,00	14,00	9,00	0,00	0,00	0,00
<u>pab<sub>1</sub></u> <u>nic<sub>1</sub></u> <u>etb<sup>s</sup></u> <u>olv<sub>2</sub></u>	14,00	12,67	7,67	4,67	0,00	0,00	0,00

\* Para os símbolos das linhagens consultar a Figura 06

Fig.8— Curvas de resistência ao Brometo de Etídio.



- - - - - arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sub>1</sub><sup>r</sup> gre<sub>1</sub>  
 ————— arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sub>1</sub><sup>s</sup> gre<sub>1</sub>  
 - - - - - arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sub>1</sub><sup>s</sup> bwn<sub>1</sub>  
 - - - - - pab<sub>1</sub> nic etb<sub>1</sub><sup>s</sup> olv

4.13. Comparação das frequências da formação de setores entre as linhagens arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sub>1</sub><sup>r</sup> gre<sub>1</sub> e arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sub>1</sub><sup>S</sup> bwn<sub>1</sub> e a NRRL 3112

Este teste foi realizado de acordo com o descrito no item 3.12.1.. Os resultados encontram-se na Tabela 38.

TABELA 38 - Frequência de setores das linhagens tratadas com Benlate

LINHAGENS	Nº DE PLACAS	Nº DE SETORES	FREQÜÊNCIA
NRRL 3112	34	80	2,35
<u>arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sub>1</sub><sup>r</sup> gre<sub>1</sub></u>	23	51	2,22
<u>arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sub>1</sub><sup>S</sup> bwn<sub>1</sub></u>	29	31	1,07

TABELA 39 - Análise de variância dos dados da Tabela 38

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Linhagem	2	1,3426	0,6713	7,8496**
Resíduo	21	1,7959	0,0855	
		CV = 19,31%		

\*\* Significativo ao nível de 1%

Os resultados do teste de Tukey, com diferença mínima significativa de 0,1305, encontram-se na Tabela 40.

TABELA 40 - Comparação das médias dos dados da Tabela 38

LINHAGEM	MÉDIAS
NRRL 3112	1,706 a*
<u>arg/pro</u> <u>pab<sub>1</sub></u> <u>mor<sub>1</sub></u> <u>etb<sub>1</sub><sup>r</sup></u> <u>gre<sub>1</sub></u>	1,655 a
<u>arg/pro</u> <u>leu<sub>1</sub></u> <u>mor<sub>2</sub></u> <u>etb<sup>s</sup></u> <u>bwn<sub>1</sub></u>	1,181 b

\* Médias com letras diferentes diferem significativamente ao nível de 5%

Os números representados na Tabela 40 não se referem às médias de setores produzidos, uma vez que são produtos de transformação ( $\sqrt{x + 0,5}$ ).

#### 4.14. Cruzamentos intra-específicos

##### 4.14.1. Teste de complementação entre linhagens arg/pro

As linhagens Awm 3 e A<sub>3</sub> (Figura 01), foram testadas de acordo com o item 3.19.2.. As evidências obtidas através do teste de heterocário indicaram que não há complementação entre estas linhagens arg/pro, derivadas da NRRL 3112.

##### 4.14.2. Obtenção de heterocários

O mutante arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>s</sup> bwn<sub>1</sub> de *Aspergillus awamori* foi cruzado com os mutantes arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sub>1</sub><sup>r</sup> gre<sub>1</sub>, arg<sub>1</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>s</sup> gre<sub>1</sub> e arg<sub>2</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>s</sup> gre<sub>1</sub> (Figura 06). Seguiu-se a metodologia descrita no item 3.19.1.1., excetuando-se o fato de que nos últimos dois cruzamentos, o período de incubação para a formação das películas foi de 10 dias.

As películas obtidas, quando transferidas para MM contendo pro lina, permitiram a evidenciação de micélio heterocariótico formado como setores de crescimento vigoroso (Figura 09).



FIGURA 9 - Setores heterocarióticos formados nos cruzamentos intra-específicos.

#### 4.14.3. Isolamento e frequência de colônias prototróficas

O isolamento de colônias prototróficas foi realizado de acordo com o descrito no item 3.19.1.2.. A Tabela 41 mostra as frequências de colônias prototróficas obtidas para os três cruzamentos. Pela Figura 10 pode-se observar que as colônias prováveis diplóides apresentam conídios pretos enquanto que as colônias heterocarióticas apresentam, além dos conídios pretos, misturas das cores parentais

A partir dos heterocários, foram estimadas as proporções de conídios dos mutantes envolvidos em cada um dos cruzamentos. Estes experimentos foram conduzidos de acordo com o descrito no último parágrafo do item 3.19.1.2.. Nos três cruzamentos a proporção de conídios arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub> foi maior, ou seja, 58,7, 54,1 e 51,7% respectivamente, para os cruzamentos 1,2 e 3 (Tabela 41).

Colônias heterocarióticas e prováveis diplóides provindas dos três cruzamentos, cresceram em MM, apenas quando este foi suplementado com arginina ou prolina. Quando inoculados nesse meio, os prováveis diplóides exibiram alta instabilidade, motivo pelo qual foram estocados em MC.

Foi isolado um provável diplóide de cada cruzamento. Na Figura 11, podem ser observadas as linhagens parentais com conídios de coloração verde e marrom, a linhagem original e um provável diplóide.

#### 4.15. Caracterização das linhagens prováveis diplóides

##### 4.15.1. Germinação em MM e MC

Estimou-se a germinação de conídios dos prováveis diplóides, em MC e em MM suplementado com prolina, de acordo com o descrito no item 3.20.1.. Os resultados encontram-se na Tabela 42.

TABELA 41 - Frequência de colônias prováveis diplóides e heterocarióticas dos três cruzamentos realizados

MUTANTES CRUZADOS*	TIPO DE LINHAGEM	TOTAL DE CONÍDIOS AMOSTRADOS	TOTAL DE COLÔNIAS CRESCIDAS	FREQUÊNCIA
1. $\frac{\text{arg/pro leu}_1 \text{ mor}_2 \text{ etb}^S \text{ bwn}_1}{\text{X}}$ $\frac{\text{arg/pro pab}_1 \text{ mor}_1 \text{ etb}_1^r \text{ gre}_1}{\text{X}}$	P. diplóide**	$7,77 \times 10^6$	13	$1,67 \times 10^{-6}$
	Heterocário	$7,77 \times 10^6$	508	$6,54 \times 10^{-5}$
2. $\frac{\text{arg/pro leu}_1 \text{ mor}_2 \text{ etb}^S \text{ bwn}_1}{\text{X}}$ $\frac{\text{arg}_1 \text{ pro mor}_1 \text{ etb}^S \text{ gre}_1}{\text{X}}$	P. diplóide	$5,55 \times 10^6$	396	$7,13 \times 10^{-5}$
	Heterocário	$5,55 \times 10^6$	318	$5,73 \times 10^{-5}$
3. $\frac{\text{arg/pro leu}_1 \text{ mor}_2 \text{ etb}^S \text{ bwn}_1}{\text{X}}$ $\frac{\text{arg}_2 \text{ pro mor}_2 \text{ etb}^S \text{ gre}_1}{\text{X}}$	P. diplóide	$5,55 \times 10^6$	177	$3,19 \times 10^{-5}$
	Heterocário	$5,55 \times 10^6$	353	$6,36 \times 10^{-5}$

\* Para os símbolos, consultar a Figura 06

\*\* P. diplóide = Provável diplóide



FIGURA 10 - Características morfológicas das colônias heterocarióticas e prováveis diplóides, crescendo em MM contendo prolina. A colônia indicada pela seta é uma provável diplóide.

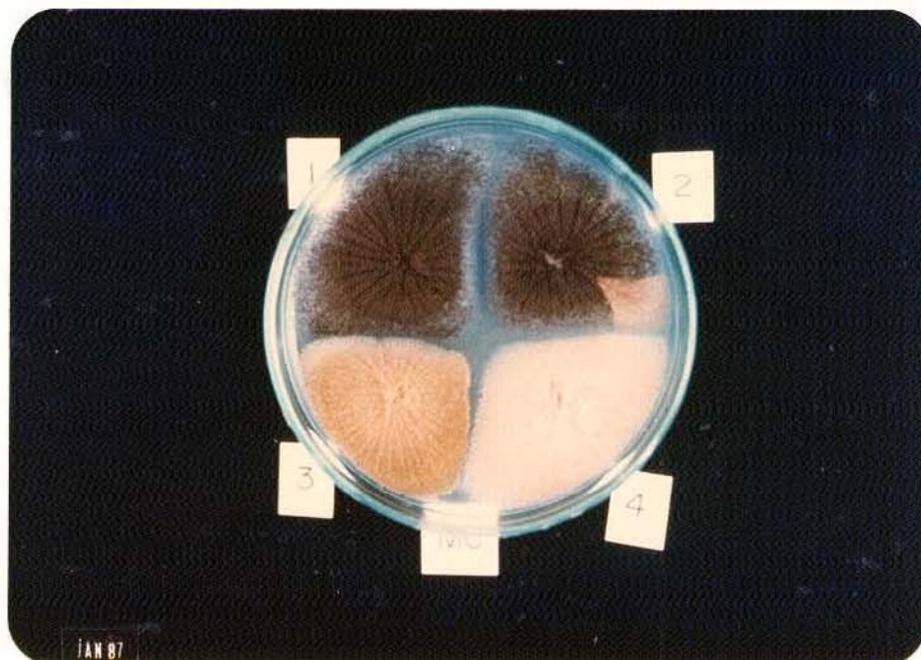


FIGURA 11 - Características morfológicas apresentadas pelas linhagens

1. NRRL 3112
2. Provável diplóide
3. arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sub>1</sub><sup>r</sup> gre<sub>1</sub>
4. arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sub>1</sub><sup>S</sup> bwn<sub>1</sub>

TABELA 42 - Germinação de conídios dos diplóides, em MC e MM suplementado com prolina

PROVÁVEIS DIPLÓIDES*	MÉDIA DO Nº DE COLÔNIAS		ESTIMATIVA EM LÂMINA HEMATIMÉTRICA CONÍDIOS/ml
	MC	MM + PROLINA	
Provável diplóide 1	89,2	90,0	90
Provável diplóide 2	86,8	88,8	100
Provável diplóide 3	106,3	108,8	100

\* Para simbologia, consultar a Tabela 41

#### 4.15.2. Número de núcleos por conídio

Os prováveis diplóides, bem como as linhagens parentais, tiveram o número de núcleos por conídio estimado de acordo com o descrito no item 3.14.3.. Os resultados estão sumarizados na Tabela 43.

Como pode se observar, as linhagens se comportaram de maneira semelhante no que se refere ao número de núcleos por conídio.

TABELA 43 - Porcentagem do número de núcleos por conídio das várias linhagens

LINHAGENS *	NÚMERO DE NÚCLEOS POR CONÍDIO			NÚMERO DE CONÍDIOS AMOSTRADOS
	01	02	03	
1. NRRL 3112	58,0	40,7	1,3	332
2. <u>arg</u> <sub>1</sub> <u>pro</u> <u>leu</u> <sub>1</sub> <u>mor</u> <sub>2</sub> <u>etb</u> <sup>S</sup> <u>bwn</u> <sub>1</sub>	52,6	45,4	2,0	302
3. <u>arg</u> <sub>1</sub> <u>pro</u> <u>pab</u> <sub>1</sub> <u>mor</u> <sub>1</sub> <u>etb</u> <sub>1</sub> <sup>r</sup> <u>gre</u> <sub>1</sub>	59,0	40,0	1,0	322
4. <u>arg</u> <sub>1</sub> <u>pro</u> <u>mor</u> <sub>1</sub> <u>etb</u> <sup>S</sup> <u>gre</u> <sub>1</sub>	59,5	39,6	0,9	336
5. <u>arg</u> <sub>2</sub> <u>pro</u> <u>mor</u> <sub>1</sub> <u>etb</u> <sup>S</sup> <u>gre</u> <sub>1</sub>	56,4	43,1	0,5	369
6. Provável diplóide 2//3	54,5	45,2	0,3	356
7. Provável diplóide 2//4	58,7	40,7	0,6	339
8. Provável diplóide 2//5	56,1	42,7	1,2	335

\* Para os símbolos, consultar a Tabela 41

#### 4.15.3. Diâmetro de conídios

As linhagens parentais e prováveis diplóides, citadas no item anterior, foram também estudadas quanto ao diâmetro de conídios, de acordo com o descrito no item 3.20.2.. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 44, através da qual se pode notar que as linhagens prováveis diplóides apresentam diâmetro 1,20 a 1,30 vezes maior que as parentais.

#### 4.15.4. Crescimento e formação de setores

As linhagens prováveis diplóides apresentaram crescimento reduzido em relação às parentais, quando cultivadas em MC contendo Benlate na concentração de 2,0 µg/ml (item 3.20.3.). Os prováveis diplóides produziram grande quantidade de setores, nos quais, foi verificada a segregação dos tipos parentais para coloração de conídios (Figura 12).

Em MC, as linhagens mostraram comportamento similar em relação ao crescimento. No entanto, apenas os prováveis diplóides produziram setores cujos conídios eram de coloração marrom (Figura 13).

TABELA 44 - Diâmetro de conídios das colônias prováveis diplóides comparadas com as linhagens parentais

LINHAGENS *	DIÂMETRO (µm)	RELAÇÃO DIÂMETRO PROTOTRÓFICAS/PARENTAIS		
1. <u>arg</u> <sub>1</sub> <u>pro</u> <u>leu</u> <sub>1</sub> <u>mor</u> <sub>2</sub> <u>etb</u> <sup>S</sup> <u>bwn</u> <sub>1</sub>	4,98			
2. <u>arg</u> <sub>1</sub> <u>pro</u> <u>pab</u> <sub>1</sub> <u>mor</u> <sub>1</sub> <u>etb</u> <sub>1</sub> <sup>r</sup> <u>gre</u> <sub>1</sub>	4,85			
3. <u>arg</u> <sub>1</sub> <u>pro</u> <u>mor</u> <sub>1</sub> <u>etb</u> <sup>S</sup> <u>gre</u> <sub>1</sub>	4,79			
4. <u>arg</u> <sub>2</sub> <u>pro</u> <u>mor</u> <sub>1</sub> <u>etb</u> <sup>S</sup> <u>gre</u> <sub>1</sub>	4,82			
5. Provável diplóide 1//2	5,97	1,20	-	1,23
6. Provável diplóide 1//3	6,33	1,27	-	1,30
7. Provável diplóide 1//4	6,32	1,27	-	1,30

\* Para os símbolos, consultar a Tabela 41



FIGURA 12 - Setores produzidos pelos prováveis diplóides em MC contendo Benlate (2,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

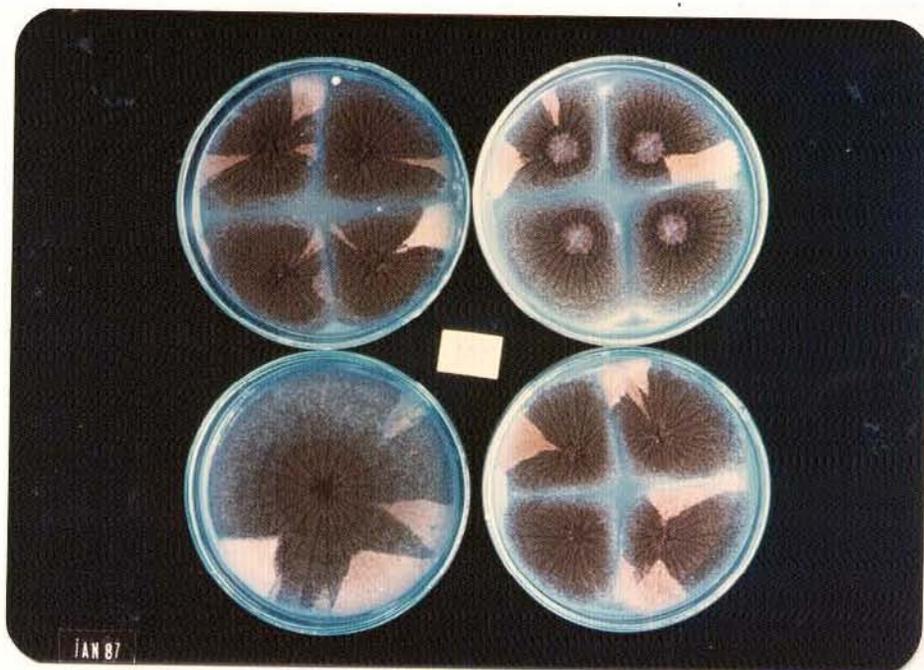


FIGURA 13 - Setores produzidos pelos prováveis diplóides em MC

#### 4.15.5. Curva de resistência ao Brometo de Etídio

As linhagens representadas na Tabela 45, foram testadas de acordo com o descrito no item 3.18.4., excetuando-se o fato de que no presente caso as concentrações da droga variaram de 11,0 a 82,3 µg/ml. Os resultados obtidos estão sumarizados na mesma Tabela, e a partir deles, foram traçadas as curvas de resistência (Figura 14).

Como pode ser observado, o provável diplóide teve um comportamento similar à linhagem parental resistente.

#### 4.15.6. Extração e quantificação do DNA

Conídios das linhagens NRRL 3112, Awm 3, arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub> e uma das prováveis diplóides, foram preparados de acordo com o descrito no item 3.20.5.1.. Foram conduzidos dois experimentos de extração e quantificação do DNA dessas linhagens, conforme metodologias descritas nos itens 3.20.5.2. e 3.20.5.3.. Os resultados obtidos encontram-se sumarizados na Tabela 46. A Tabela 47 contém os resultados da curva padrão, feita de acordo com o descrito no item 3.20.5.4. e apresentada na Figura 15. A partir da curva padrão foi traçada a reta de regressão, cuja equação é  $x = - 1,32 + 59,96 y$ . O coeficiente de correlação foi  $r = 0,9989$  e a significância  $t = 30,126$  ( $P = 5\%$ ).

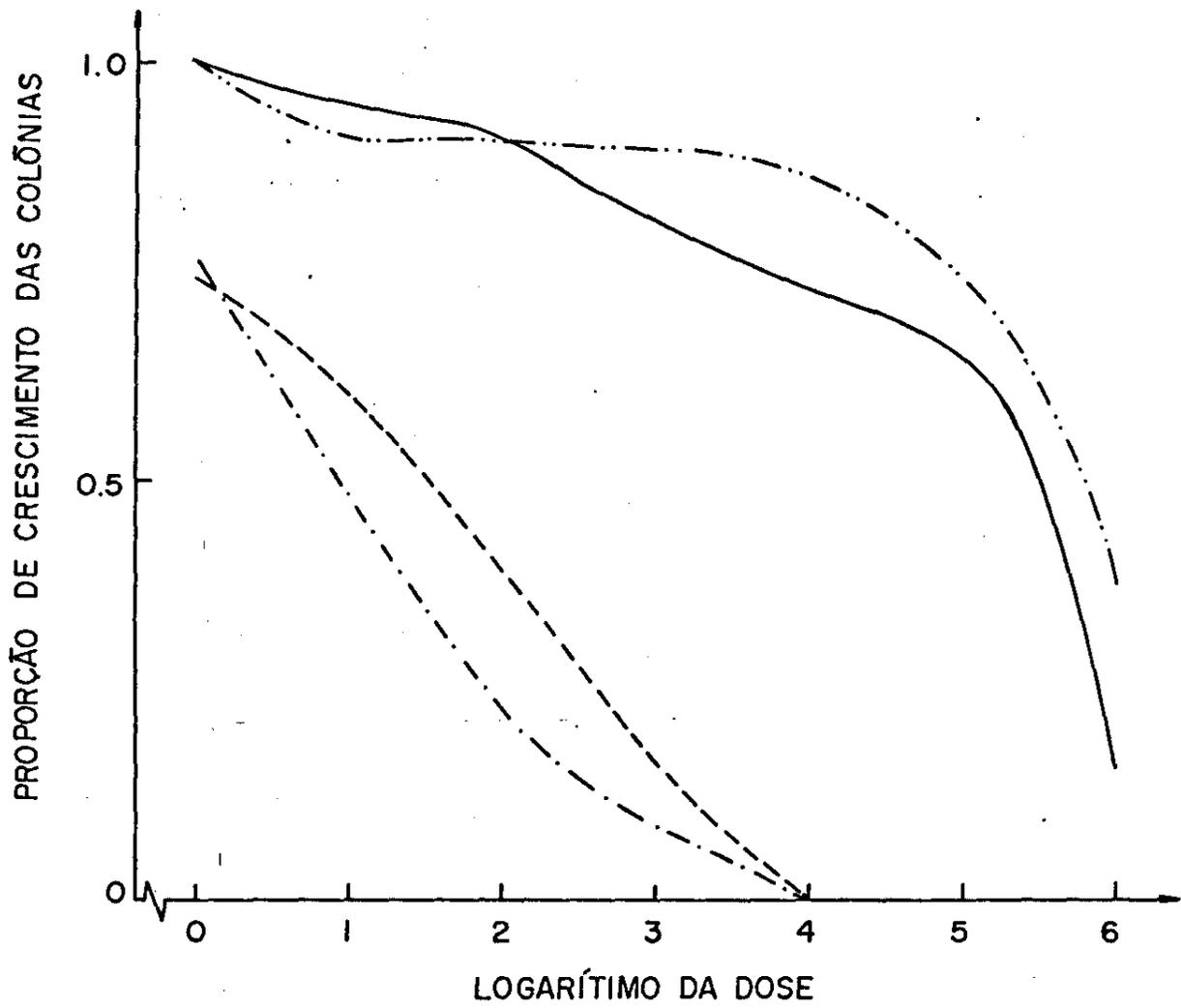
Observa-se na Tabela 46 que a quantidade de DNA apresentada pelo provável diplóide é em média, 1,8 vezes maior que o das linhagens parentais.

TABELA 45 - Média do diâmetro de colônias das linhagens mutantes parentais e diplóides, tratadas com várias concentrações de Brometo de Etídio .

LINHAGENS*	MC + BROMETO DE ETÍDIO ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )									
	0,000	11,00	15,40	21,50	30,00	42,00	59,00	82,30		
1. <u>arg/pro</u> <u>pab<sub>1</sub></u> <u>mor<sub>1</sub></u> <u>etb<sub>1</sub><sup>r</sup></u> <u>gre<sub>1</sub></u>	22,33	22,00	20,00	20,00	19,67	19,00	15,33	8,33		
2. Provável diplóide 1//4	23,67	22,00	20,67	20,33	17,33	16,00	13,67	3,67		
3. <u>arg/pro</u> <u>pab<sub>1</sub></u> <u>mor<sub>1</sub></u> <u>etb<sub>1</sub><sup>S</sup></u> <u>gre<sub>1</sub></u>	24,33	16,33	13,33	8,67	4,67	0,00	0,00	0,00		
4. <u>arg/pro</u> <u>leu<sub>1</sub></u> <u>mor<sub>2</sub></u> <u>etb<sub>1</sub><sup>S</sup></u> <u>bwn<sub>1</sub></u>	21,00	16,67	10,67	5,00	2,33	0,00	0,00	0,00		

\* Para os símbolos, consultar a Figura 6 .

FIGURA 14 - Curvas de resistência ao Brometo de Etídio



- ..... 1. arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sup>r</sup> gre<sub>1</sub>  
 \_\_\_\_\_ 2. Cruzamento 1 x 4  
 - - - - - 3. arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sup>s</sup> gre<sub>1</sub>  
 - . - . - 4. arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>s</sup> bwn<sub>1</sub>

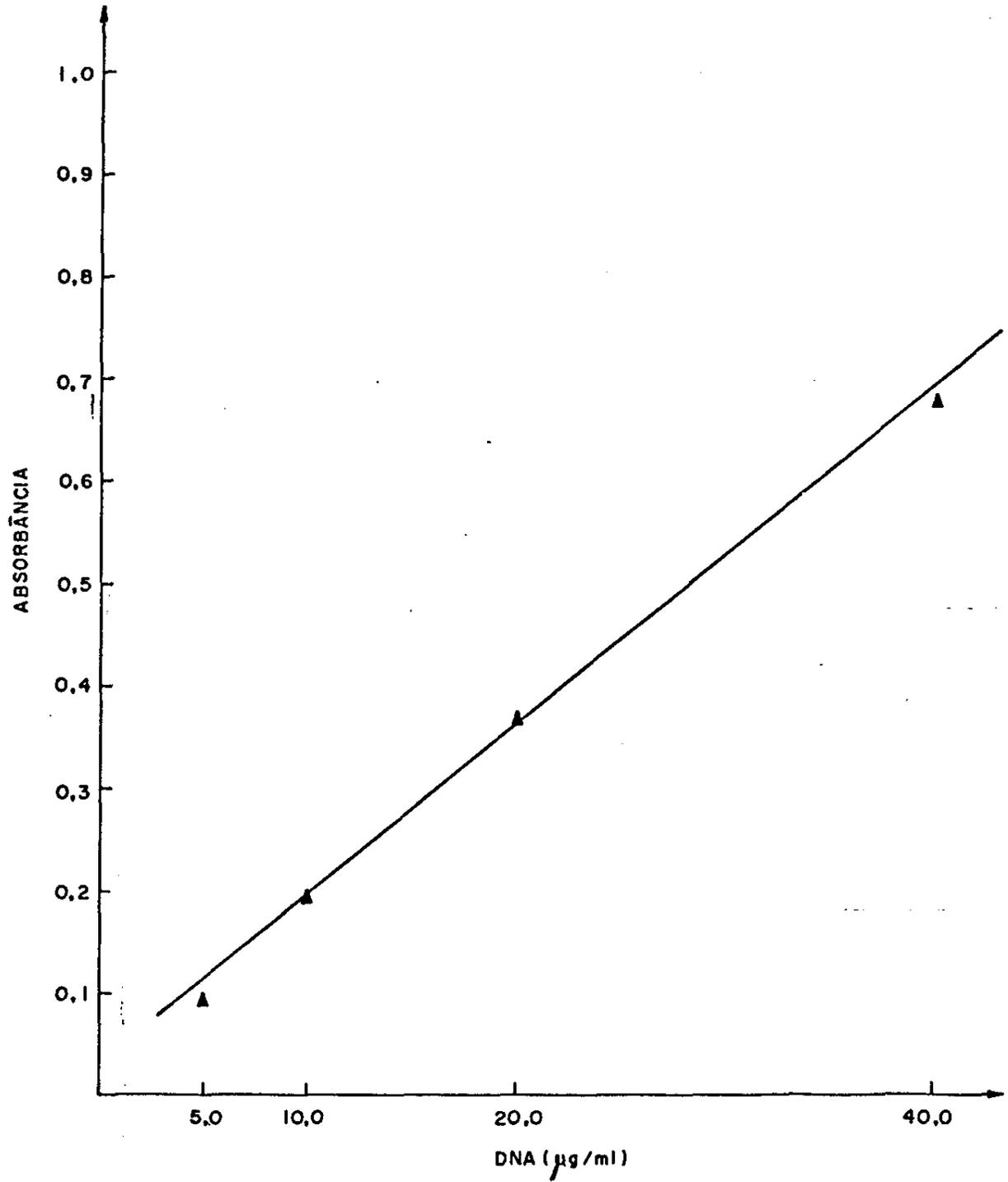
TABELA 46 - Conteúdo médio de DNA por núcleo ( $\mu\text{g DNA} \times 10^{-8}$ ) das várias linhagens nos dois experimentos

LINHAGENS	1º EXPERI- MENTO	2º EXPERI- MENTO	MÉDIA	RELAÇÃO DIPLÓIDE/PARENTAIS
NRRL 3112	3,98	4,56	4,27	1,70
Awm 3	4,42	3,66	4,04	1,80
<u>arg/pro</u> <u>leu<sub>1</sub></u> <u>mor<sub>2</sub></u> <u>etb<sup>S</sup></u> <u>bwn<sub>1</sub></u>	4,09	3,77	3,93	1,80
Diplóide	6,31	8,22	7,26	

TABELA 47 - Absorbâncias observadas em função da concentração de DNA

DNA ( $\mu\text{g/ml}$ )	ABSORBÂNCIAS
5	0,094
10	0,194
20	0,369
40	0,682

FIGURA 15 - CURVA PADRÃO DE ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA



#### 4.16. Segregação das linhagens prováveis diplóides

As linhagens prototróficas prováveis diplóides, que pelos critérios citados nos itens anteriores puderam ser discriminados inequivocamente das linhagens parentais, foram denominadas diplóides. Seguindo metodologia descrita no item 3.19.1.3., a partir dessas colônias, foram obtidos segregantes em MC e em MC contendo Benlate (item 4.15.4.) com o propósito de se estudar a heterozigose das marcas genéticas envolvidas no cruzamento. Os segregantes foram caracterizados de acordo com o descrito nos quatro subitens do item 3.21..

#### 4.17. Caracterização dos segregantes

A Tabela 48 e as Tabelas A1 e A4 do Apêndice de Tabelas, resumem as observações feitas nos segregantes do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub> // arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sub>1</sub><sup>r</sup> gre<sub>1</sub>. Na Tabela A1, estão relacionados os segregantes espontâneos. Observa-se que alguns deles, e todos os segregantes induzidos possuem diâmetros de conídios semelhantes aos constatados para as linhagens parentais. Foi verificada ligações entre os genes gre<sub>1</sub> e etb<sub>1</sub><sup>r</sup>.

Os segregantes do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub> // arg<sub>1</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>S</sup> gre<sub>1</sub> estão discriminados na Tabela 49 e no Apêndice de Tabelas (A5 a A7). Os segregantes têm diâmetros de conídios similares às linhagens parentais. Foi constatada ligação entre os genes mor<sub>1</sub> e arg<sub>1</sub>.

Na Tabela 50 e no Apêndice de Tabelas (A8 e A10), encontram-se relacionados os segregantes do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub> // arg<sub>2</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>S</sup> gre<sub>1</sub>, que também apresentaram diâmetros de conídios semelhantes ao das linhagens parentais. Foi verificada ligação entre os genes arg<sub>2</sub> e mor<sub>1</sub>.

Nenhum dos segregantes induzidos apresentaram setores quando colocados em Benlate. Este fenômeno foi observado apenas nos setores espontâneos (Tabela A1). A setorização, aqui adotada como critério de caracterização dos segregantes, se compara a obtida com as linhagens diplóides, e não com a obtida com as linhagens parentais (Figura 12).

A característica proliferação de conidióforos secundários, foi observada na linhagem parental com conídios verdes (gre<sub>1</sub>) e em segregantes com conídios de coloração verde. Os diplóides não apresentaram tal morfologia.

Na Tabela 51, estão relacionadas as marcas envolvidas nos três cruzamentos. Os resultados indicam ligação entre os genes leu<sub>1</sub> e mor<sub>2</sub>. Os segregantes contendo estes genes foram isolados em menor frequência.

Na Figura 16, pode ser observado graficamente que as médias dos diâmetros de conídios dos segregantes, encontram-se na mesma faixa dos diâmetros das li

nhagens parentais. Esses por sua vez, diferem do grupo formado pelos diplóides e por alguns dos segregantes espontâneos.

TABELA 48 - Análise mitótica do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub>//arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sub>1</sub><sup>r</sup> gre<sub>1</sub> .

	<u>etb<sub>1</sub><sup>r</sup></u>	<u>etb<sup>S</sup></u>		<u>mor<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	<u>mor<sub>1</sub><sup>-</sup></u>		<u>leu<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	<u>leu<sub>1</sub><sup>-</sup></u>
<u>pab<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	16	28	<u>pab<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	24	20	<u>etb<sub>1</sub><sup>r</sup></u>	23	8
<u>pab<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	15	25	<u>pab<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	19	21	<u>etb<sup>S</sup></u>	35	18
	<u>gre<sub>1</sub></u>	<u>bwn<sub>1</sub></u>		<u>mor<sub>2</sub><sup>+</sup></u>	<u>mor<sub>2</sub><sup>-</sup></u>		<u>mor<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	<u>mor<sub>1</sub><sup>-</sup></u>
<u>pab<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	16	28	<u>pab<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	33	11	<u>etb<sub>1</sub><sup>r</sup></u>	17	14
<u>pab<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	15	25	<u>pab<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	25	15	<u>etb<sup>S</sup></u>	26	27
	<u>leu<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	<u>leu<sub>1</sub><sup>-</sup></u>		<u>gre<sub>1</sub></u>	<u>bwn<sub>1</sub></u>		<u>mor<sub>2</sub><sup>+</sup></u>	<u>mor<sub>2</sub><sup>-</sup></u>
<u>pab<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	33	11	<u>etb<sub>1</sub><sup>r</sup></u>	31	0	<u>etb<sub>1</sub><sup>r</sup></u>	23	8
<u>pab<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	25	15	<u>etb<sup>S</sup></u>	0	53	<u>etb<sup>S</sup></u>	35	18

Observação: Os segregantes analisados, num total de 84, estão discriminados no Apêndice de Tabelas (A 01 a A 04).

TABELA 49 - Análise mitótica do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub>//arg<sub>1</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>S</sup> gre<sub>1</sub> .

	<u>gre<sub>1</sub></u>	<u>bwn<sub>1</sub></u>		<u>mor<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	<u>mor<sub>1</sub><sup>-</sup></u>
<u>arg<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	34	39	<u>arg<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	48	0
<u>arg<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	1	4	<u>arg<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	0	0

	<u>leu<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	<u>leu<sub>1</sub><sup>-</sup></u>		<u>mor<sub>2</sub><sup>+</sup></u>	<u>mor<sub>2</sub><sup>-</sup></u>
<u>arg<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	52	21	<u>arg<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	52	21
<u>arg<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	1	4	<u>arg<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	1	4

Observação: Os setores analisados, num total de 78, estão discriminados no Apêndice de Tabelas (A 05 a A 07).

TABELA 50 - Análise mitótica do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub>//arg<sub>2</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>S</sup> gre<sub>1</sub> .

	<u>gre<sub>1</sub></u>	<u>bwn<sub>1</sub></u>		<u>mor<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	<u>mor<sub>1</sub><sup>-</sup></u>
<u>arg<sub>2</sub><sup>+</sup></u>	23	33	<u>arg<sub>2</sub><sup>+</sup></u>	45	0
<u>arg<sub>2</sub><sup>-</sup></u>	11	14	<u>arg<sub>2</sub><sup>-</sup></u>	0	12

	<u>leu<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	<u>leu<sub>1</sub><sup>-</sup></u>		<u>mor<sub>2</sub><sup>+</sup></u>	<u>mor<sub>2</sub><sup>-</sup></u>
<u>arg<sub>2</sub><sup>+</sup></u>	45	11	<u>arg<sub>2</sub><sup>+</sup></u>	45	11
<u>arg<sub>2</sub><sup>-</sup></u>	16	9	<u>arg<sub>2</sub><sup>-</sup></u>	16	9

Observação: Os segregantes analisados, num total de 81, estão discriminados no Apêndice de Tabelas (A 08 a A 10).

TABELA 51 - Análise mitótica das características comuns aos tres cruzamentos.

	<u>gre<sub>1</sub></u>	<u>bwn<sub>1</sub></u>		<u>gre<sub>1</sub></u>	<u>bwn<sub>1</sub></u>	
<u>leu<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	77	95		<u>mor<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	62	73
<u>leu<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	23	48		<u>mor<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	23	31

	<u>mor<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	<u>mor<sub>1</sub><sup>-</sup></u>		<u>mor<sub>2</sub><sup>+</sup></u>	<u>mor<sub>2</sub><sup>-</sup></u>	
<u>leu<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	112	41		<u>mor<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	112	14
<u>leu<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	14	12		<u>mor<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	41	12

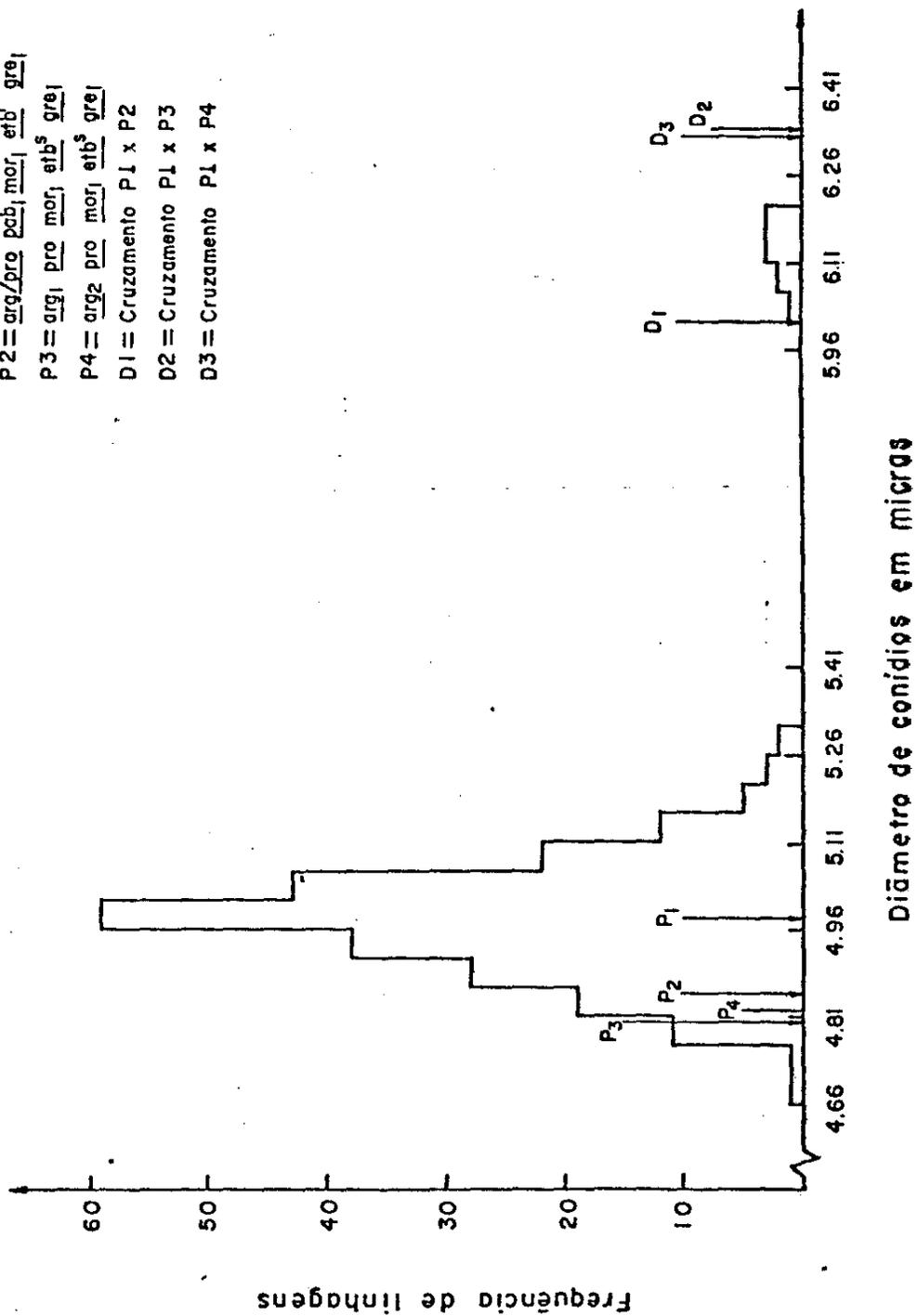
  

	<u>mor<sub>2</sub><sup>+</sup></u>	<u>mor<sub>2</sub><sup>-</sup></u>		<u>gre<sub>1</sub></u>	<u>bwn<sub>1</sub></u>	
<u>leu<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	172	0		<u>mor<sub>2</sub><sup>+</sup></u>	77	95
<u>leu<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	0	71		<u>mor<sub>2</sub><sup>-</sup></u>	23	48

Observação: Os segregantes analisados, num total de 243, estão discriminados no Apêndice de Tabelas (A 01 a A 10).

FIGURA 16 - Representação gráfica do diâmetro médio de conídios das linhagens parentais e diploides e histograma dos diâmetros dos segregantes.

- P1 = arg/pro leu mor<sub>2</sub> etb<sup>s</sup> bwn<sub>1</sub>
- P2 = arg/pro pac<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sup>r</sup> gre<sub>1</sub>
- P3 = arg<sub>1</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>s</sup> gre<sub>1</sub>
- P4 = arg<sub>2</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>s</sup> gre<sub>1</sub>
- D1 = Cruzamento P1 x P2
- D2 = Cruzamento P1 x P3
- D3 = Cruzamento P1 x P4



Diâmetro de conídios em microns

#### 4.18. Produção de amiloglucosidase (AG)

##### 4.18.1. Curva de acúmulo da enzima em função do tempo de incubação

Seguindo metodologia descrita no item 3.22.1., foi traçada a curva de acúmulo da linhagem NRRL 3112. Os resultados obtidos encontram-se esquematizados na Tabela 52 e na Figura 17.

Pode ser observado que já no 3º dia, a quantidade de enzima acumulada era grande (24,4 U/ml), tendo atingido praticamente o patamar. Essa concentração se manteve com leve variações até o 7º dia, a partir do qual, um pequeno decréscimo foi verificado. A medida da atividade enzimática foi feita de acordo com descrito no item 3.22.2.

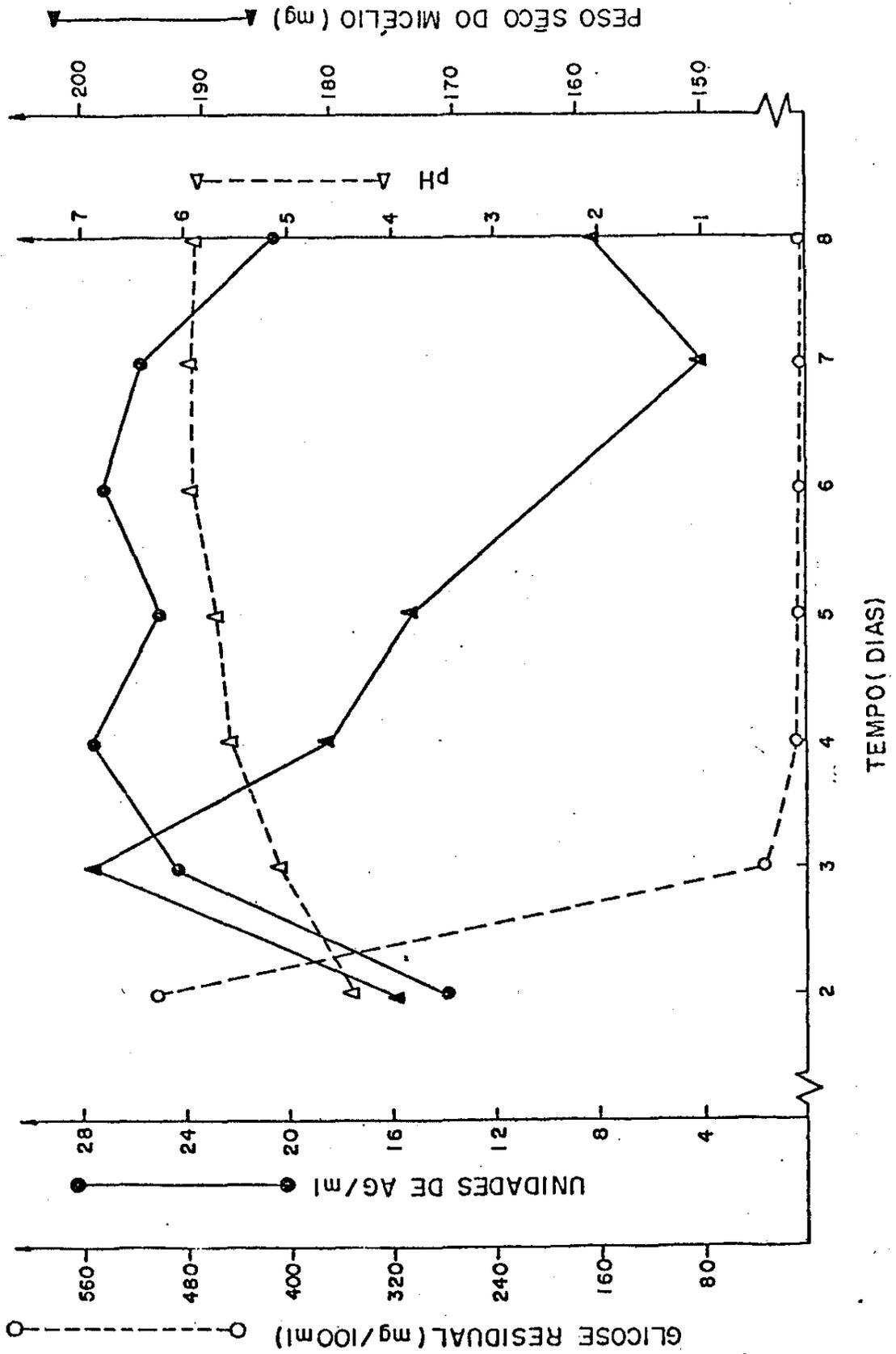
A quantidade de glicose residual, estimada de acordo com o item 3.22.3., decresceu abruptamente do 2º para o 3º dia (505,6 para 33,8 mg/100 ml) e manteve-se praticamente zero a partir do 4º dia.

O pH, que inicialmente era 5,50, baixou para 4,38 no 2º dia. A seguir, ele aumentou até atingir 5,94 no 6º dia, mantendo-se praticamente constante a partir desse ponto. O peso seco do micélio teve seu pico no 3º dia (199 mg) e depois diminuiu até atingir o valor de 150,3 mg no 7º dia. No 8º dia, ele sofreu um pequeno aumento.

TABELA 52 - Dados referentes à curva de acúmulo de AG (U/ml) em função do tempo de incubação.

DIAS DE FERMENTAÇÃO	$\bar{X}$ AG U / ml	GLICOSE RESIDUAL mg/100 ml	PESO SECO DO MICÉLIO	pH
2	13,9	505,6	174,9	4,38
3	24,4	33,8	199,0	5,12
4	27,6	7,5	180,1	5,58
5	25,1	4,2	172,8	5,72
6	27,3	4,3	162,6	5,94
7	25,8	5,6	150,3	5,93
8	20,6	3,9	158,3	5,89

FIGURA 17 — Curva de acúmulo de amiloglucosidase em função do tempo de incubação



#### 4.18.2. Teste utilizando inibidor de AG

Este teste foi realizado de acordo com o descrito no item 3.22.4. e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 53.

TABELA 53 - Atividade das enzimas amilolíticas (em U/ml) nas diferentes concentrações do inibidor de AG e em dois substratos.

INIBIDOR ( $\mu\text{g/ml}$ )	AMIDO		DEXTRINA LIMITE	
	U / ml	% DE INIBIÇÃO	U / ml	% DE INIBIÇÃO
0	22,9		21,1	
10	3,4	85,1	5,8	72,5
20	2,2	90,4	3,7	82,5
30	1,6	93,0	2,6	87,7
40	1,2	94,7	2,2	89,6

Como pode ser observado na Tabela 53, a concentração de 10  $\mu\text{g} / \text{ml}$  do inibidor já é suficiente para causar grande inibição na atividade enzimática, seja utilizando o amido ou a dextrina limite como substrato. Com o aumento da concentração do inibidor, a porcentagem de inibição também vai aumentando, atingindo valores de 94,7% para o amido e 89,6% para a dextrina limite.

#### 4.18.3. Determinação da melhor concentração de aminoácidos para a produção de AG

As linhagens deficientes foram tratadas de acordo com o descrito no item 3.22.5. , e os resultados encontram-se sumarizados nas Tabelas 54 , 55 e 56.

TABELA 54 - Produção de amiloglicosidase (em U/ml) do setor T<sub>10</sub> (arg/pro) em várias concentrações de prolina.

CONCENTRAÇÃO DE PROLINA (µg/ml)	MÉDIA DE AG PRODUZIDA (U/ml)
0	10,6
25	14,8
50	12,8
100	10,3
200	15,4

Como pode ser observado, a produção da enzima se mantém praticamente constante com o aumento da concentração de prolina no meio de cultura.

TABELA 55 - Produção de amiloglicosidase (em U/ml) de um setor (pro leu<sub>1</sub>) em várias concentrações de leucina.

CONCENTRAÇÃO DE LEUCINA (µg/ml)	MÉDIA DE AG PRODUZIDA (U/ml)
0	0,07
25	1,6
50	3,2
100	5,4
200	5,7

Como pode se observar, a quantidade de enzima produzida aumentou com o aumento da concentração de leucina.

TABELA 56 - Produção de amiloglicosidase (em U/ml) de um setor (arg pro) em várias concentrações de arginina

CONCENTRAÇÃO DE ARGININA (µg/ml)	MÉDIA DE AG PRODUZIDA (U/ml)
0	3,6
25	3,3
50	2,9
100	5,0
200	6,3

Verifica-se que nas maiores concentrações de arginina, houve maior produção de enzima.

#### 4.18.4. Produção de AG nas linhagens, setores e mutantes

Dois experimentos foram conduzidos de acordo com o descrito no item 3.22.6. com o objetivo de se quantificar a produção de AG em algumas linhagens, mutantes e setores. Os resultados da análise estatística encontram-se nas Tabelas 57 e 58.

TABELA 57 - Análise de variância dos dados do primeiro experimento

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Tratamento	9	2.270,705	252,300	115,048 **
Resíduo	30	65,795	2,193	
C.V. = 12,6%				

\*\* Significativo ao nível de 1%.

TABELA 58 - Análise de variância dos dados do segundo experimento

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Tratamento	7	1.676,63	239,52	108,87 **
Resíduo	24	52,93	2,20	
C.V. = 15,9%				

\*\* Significativo ao nível de 1%.

Os resultados dos testes de Tukey, com diferenças mínimas significativas de 1,7845 e 1,7354, das médias da produção de AG apresentadas pelas linhagens, mutantes e setores, encontram-se sumarizados nas Tabelas 59 e 60, respectivamente.

TABELA 59 - Comparação das médias de produção de enzima pelo teste de Tukey

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG (U/ml)	
M <sub>26</sub> *	27,4	a**
NRRL 3112	23,7	b
T <sub>10</sub> (pro)	11,7	c
Diplóide I (arg/pro)	11,0	c
arg/pro gre <sub>1</sub>	11,0	c
Diplóide II (arg/pro)	10,3	c d
Diplóide III (arg/pro)	8,7	d
Setor (arg/pro leu <sub>1</sub> mor <sub>2</sub> etb <sup>S</sup> bwn <sub>1</sub> )	5,4	e
Parental (arg/pro leu <sub>1</sub> mor <sub>2</sub> etb <sup>S</sup> bwn <sub>1</sub> )	4,4	e f
Setor (arg/pro pab <sub>1</sub> leu <sub>1</sub> mor <sub>2</sub> etb <sup>r</sup> gre <sub>1</sub> )	3,3	f

\* Para os símbolos, ver Tabelas 1, 3 e 41 e Figura 6.

\*\* Médias com letras diferentes são significativamente diferentes ao nível de 5%.

TABELA 60 - Comparação das médias da produção de enzima, pelo teste de Tukey.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE AG ( U/ml)
P <sub>1</sub> *	23,2 a **
NRRL 3112	19,5 b
T <sub>19</sub> ( <u>arg/pro</u> )	7,2 c
Parental ( <u>arg<sub>2</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>S</sup> gre<sub>1</sub></u> )	7,0 c
Setor ( <u>arg<sub>2</sub> pro gre<sub>1</sub></u> )	6,3 c
S <sub>17</sub> ( <u>arg/pro</u> )	6,2 c
Setor ( <u>arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> bwn<sub>1</sub></u> )	2,9 d
Parental ( <u>arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sub>1</sub><sup>r</sup> gre<sub>1</sub></u> )	2,2 d

\* Para os símbolos, consultar as Tabelas 1, 3 e 41 e a Figura 6 .

\*\* Médias com letras diferentes, são significativamente diferentes ao nível de 5% .

Como pode ser observado, as linhagens M<sub>26</sub> e P<sub>1</sub> , produzem maior quantidade de enzima que a NRRL 3112. Os demais mutantes e setores, produziram menos enzima. Dentro deste grupo não ocorreu homogeneidade, tendo alguns dos mutantes e setores se diferenciado significativamente entre si.

#### 4.19. Cruzamento interespecífico

##### 4.19.1. Por métodos convencionais

Nenhuma película heterocariótica foi obtida entre a linhagem arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> bwn<sub>1</sub> de *A. awamori* e a linhagem pab<sub>1</sub> nic<sub>1</sub> olv<sub>2</sub> de *A. niger*. Este experimento foi realizado de acordo com o descrito no item 3.19.1.1. e foram ensaiados 24 tubos. As películas que se desenvolveram não possuíam crescimento vigoroso e quando transferidas para MM sólido, não se desenvolveram.

Uma outra tentativa de cruzamento foi realizada, colocando-se conídios para crescerem em agitação ( Item 3.23.1. ). Nenhuma dos "pellets" formadas se desenvolveu.

##### 4.19.2. Via fusão de protoplastos

Com o objetivo de se obter híbrido interespecífico, foi utilizada a técnica de isolamento e fusão de protoplastos, visto que, através de cruzamentos pela metodologia clássica não foi possível ( Item 3.23.2. ).

##### 4.19.2.1. Fusão espontânea

Foram obtidos protoplastos das linhagens mutantes conforme o descrito no item 3.23.2.1. Na Tabela 61 pode ser visto o número de colônias crescidas em MC e em MC KCl e também a porcentagem de regeneração dos protoplastos obtidos.

TABELA 61 - Regeneração e número de colônias crescidas em MC e MC KCl.

LINHAGENS	REGENERAÇÃO	Nº DE COLÔNIAS/ml EM MC	Nº DE COLÔNIAS/ml EM MC KCl
<u>arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> bwn<sub>1</sub></u> *	19%	7,15 x 10 <sup>4</sup>	1,28 x 10 <sup>5</sup>
<u>pab<sub>1</sub> nic<sub>1</sub> olv<sub>2</sub></u>	17%	3,45 x 10 <sup>3</sup>	5,80 x 10 <sup>4</sup>

\* Para os símbolos, consultar a Figura 6 .

Não foi observado reversão dos marcadores genéticos nos protoplastos obtidos em nenhuma das linhagens.

A tentativa de fusão espontânea de protoplastos foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 3.23.2.2.1. O número de colônias crescidas em MC, MC KCl e MM KCl, encontram-se na Tabela 62.

TABELA 62 - Média do número de colônias crescidas após fusão espontânea de protoplastos em MC, MC KCl e MM KCl.

CRUZAMENTO	MÉDIA DO Nº DE COLÔNIAS EM MC	MÉDIA DO Nº DE COLÔNIAS EM MC KCl	MÉDIA DO Nº DE COLÔNIAS EM MM KCl
<u>arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> bwn<sub>1</sub></u> x <u>pab<sub>1</sub> nic<sub>1</sub> olv<sub>2</sub></u>	2,65 x 10 <sup>3</sup>	4,50 x 10 <sup>4</sup>	0

#### 4.19.2.2. Fusão induzida

Protoplastos das linhagens mutantes foram obtidos de acordo com o descrito no item 3.23.2.1. Através da Tabela 63 pode ser observado o número de colônias crescidas em MC e MC KCl e, também, a porcentagem de regeneração dos protoplastos obtidos.

TABELA 63 - Regeneração e número de colônias crescidas em MC e MC KCl.

LINHAGENS	REGENERAÇÃO	Nº DE COLÔNIAS/ ml EM MC	Nº DE COLÔNIAS/ml EM MC KCl
<u>arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> bwn<sub>1</sub></u>	7,5%	1,11 x 10 <sup>5</sup>	1,86 x 10 <sup>5</sup>
<u>pab<sub>1</sub> nic<sub>1</sub> olv<sub>2</sub></u>	14,4%	4,08 x 10 <sup>2</sup>	1,44 x 10 <sup>5</sup>

Nesse caso também não foi observado reversão dos marcadores genéticos.

A tentativa de fusão induzida de protoplastos foi feita de acordo com o descrito no item 3.23.2.2.2. O número de colônias crescidas em MC, MC KCl e MM KCl, é apresentado na Tabela 64. Deve ser ressaltado que em placas contendo MM não foram observadas colônias, mesmo após 15 dias de incubação.

Na Figura 18 podem ser observadas as colônias que cresceram em MM KCl.

TABELA 64 - Média do número de colônias crescidas após fusão induzida de protoplastos em MC, MC KCl e MM KCl.

CRUZAMENTO	MÉDIA DO Nº DE COLÔNIAS EM MC	MÉDIA DO Nº DE COLÔNIAS EM MC KCl	MÉDIA DO Nº DE COLÔNIAS EM MM KCl
<u>arg/pro</u> <u>leu<sub>1</sub></u> <u>mor<sub>2</sub></u> <u>bwn<sub>1</sub></u> x <u>pab<sub>1</sub></u> <u>nic<sub>1</sub></u> <u>olv<sub>2</sub></u>	9,80 x 10 <sup>3</sup>	*2,90 x 10 <sup>4</sup>	1,13 x 10 <sup>2</sup>

\* 99,31% das colônias crescidas em MC KCl são da linhagem arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> bwn<sub>1</sub> .

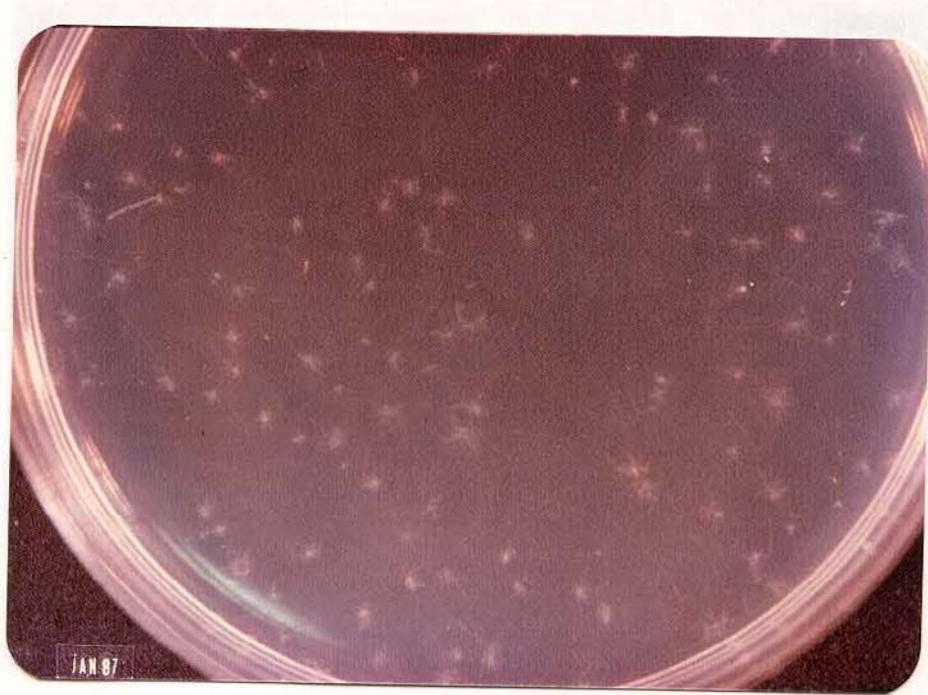


FIGURA 18 - Colônias crescidas em MM KCl .

#### 4.19.3. Caracterização das colônias crescidas em MM KCl .

##### 4.19.3.1. Crescimento em MM e MC .

Essas colônias foram mantidas em MM e MC de acordo com o descrito no item 3.23.3.1. Em MM (Figura 19 ), elas se desenvolveram de maneira lenta e irregular, levando em média 15 dias para tomar toda a placa. As colônias não apresentaram esporulação.

Em MC ( Figura 20 ), as colônias esporularam e se desenvolveram mais rapidamente. Puderam ser notadas regiões morfologicamente semelhantes à linhagem de *A. awamori*, e regiões diferentes de ambas as linhagens utilizadas no cruzamento.

Quando conídios das colônias desenvolvidas em MC foram coletadas das regiões morfologicamente diferentes das parentais e semeados em MM, verificou-se que uma média de 11 em cada  $10^6$ , desenvolveram colônias. Em MC, a maioria das colônias crescidas eram semelhantes à linhagem de *A. awamori* .



FIGURA 19 - Colônia crescida por 15 dias em MM .



FIGURA 20 - Colônia crescida por 15 dias em MC .

#### 4.19.3.2. Morfologia e auxotrofia

A metodologia descrita no item 3.23.3.2. foi utilizada para se verificar a auxotrofia e a morfologia das colônias crescidas em MC. Em 100 colônias amostradas, 98 eram do tipo parental *A. awamori*, e apenas 2 do tipo *A. niger*.

#### 4.19.3.3. Tratamento com Benlate

As colônias que cresceram em MM KCl (Figura 18), foram tratadas com Benlate, de acordo com o descrito no item 3.23.3.3. Um total de 26 setores foram isolados de placas tratadas com Benlate, e após terem sido analisados, revelaram-se parentais.

Alguns setores prototróficos apresentando condições de coloração preta foram isolados de MM, MC e de MC contendo Benlate em todas as concentrações utilizadas. Esses setores, a princípio tidos como prováveis produtos de fusão, juntamente com setores parentais, podem ser visualizados na Figura 21.



FIGURA 21 - Setores parentais e prototróficos produzidos em MC contendo Benlate ( 1,5 µg/ml ).

#### 4.19.4. Setorização dos prováveis produtos de fusão

Seguindo metodologia descrita nos itens 3.19.1.3. e 3.20.4., o provável produto de fusão, isolado como setor a partir de colônias heterocarióticas tratadas com Benlate, foi colocada na presença do mesmo fungicida nas concentrações de 1,0 e 1,5 µg/ml. Numerosos setores foram evidenciados nos dois tratamentos (Figura 22).

#### 4.19.5. Caracterização do provável produto de fusão, linhagens parentais e segregantes

##### 4.19.5.1. Diâmetro de conídios

O provável produto de fusão, as linhagens parentais e vários segregantes, foram tratados de acordo com o descrito no item 3.20.2. O provável produto de fusão apresentou diâmetro de conídios 1,20 a 1,30 vezes maior tendo os valores se situado, em média, em torno de 6,00 µm. Os valores dos diâmetros dos segregantes estudados encontram-se nas Tabelas 65 e 66.

##### 4.19.5.2. Comportamento na presença de Benlate

Todas as linhagens e segregantes descritos no item anterior foram tratados de acordo com o descrito nos itens 3.20.3. e 3.20.4. Somente o provável produto de fusão se mostrou sensível ao Benlate, apresentando crescimento mais reduzido e formação de setores.

##### 4.19.5.3. Produção de enzimas amilolíticas em placa

Todas as linhagens foram também testadas quanto à produção de enzimas amilolíticas, e seus respectivos índices calculados (Item 3.22.7.). A linhagem parental pab<sub>1</sub> nic<sub>1</sub> olv<sub>2</sub> teve índice igual a 1,0, ou seja, não apresentou halo em MM contendo amido. Já o parental arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> bwn<sub>1</sub> apresentou índice de 1,5. O provável produto de fusão mostrou índice 1,2, que é intermediário ao das linhagens parentais. Os índices apresentados pelos segregantes estão apresentados nas Tabelas 65 e 66.

##### 4.19.5.4. Segregação

Além da característica produção de enzimas amilolíticas, marcas auxotróficas e morfológicas também foram analisadas nos segregantes (Tabelas 65, 66 e 67). Nenhum setor deficiente para leucina foi isolado. Foi evidenciada ligação entre os genes que determinam a coloração de conídios e os genes nic<sub>1</sub> amy e pro. Alguns segregantes isolados são apresentados na Figura 23.

TABELA 65 - Características morfológicas, auxotróficas e de produção de enzimas a milolíticas dos segregantes do provável produto de fusão .

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS*	AUXOTROFIA				ENZIMA** HALO+COLÔNIA/HALO	DIÂMETRO DE CONÍDIO(µm)
		<u>pab</u> <sub>1</sub>	<u>nic</u> <sub>1</sub>	<u>pro</u>	<u>leu</u> <sub>1</sub>		
1	bwn	+	+	+	+	1,1	N.D.
2	olv	-	-	+	+	2,3	4,68
3	bwn	+	+	-	+	1,2	N.D.
4	olv	-	-	+	+	1,0	N.D.
5	olv	-	-	+	+	1,0	N.D.
6	bwn	-	+	-	+	1,2	N.D.
7	olv	-	-	+	+	1,0	N.D.
8	olv	+	-	+	+	1,0	N.D.
9	olv	-	-	+	+	1,0	N.D.
10	olv	-	-	+	+	1,0	4,78
11	bwn	-	+	-	+	1,2	N.D.
12	olv	+	-	+	+	1,2	N.D.
13	olv	-	-	+	+	1,0	4,86
14	bwn	-	+	-	+	1,2	4,53
15	olv	-	-	+	+	1,0	N.D.
16	bwn	+	+	+	+	1,2	4,38
17	olv	-	-	+	+	1,0	N.D.
18	bwn	+	+	-	+	1,2	N.D.
19	olv	+	-	+	+	1,0	N.D.
20	olv	-	-	+	+	1,0	N.D.
21	olv	+	+	+	+	1,1	N.D.
22	bwn	-	+	-	+	1,2	N.D.
23	olv	+	-	+	+	1,0	N.D.
24	olv	+	-	+	+	1,0	N.D.

\* Para os símbolos, consultar a Figura 6 e o item 3.1.

\*\* Índices maiores que 1,0 serão considerados amy<sup>+</sup> e índices iguais a 1,0, amy<sup>-</sup>.

N.D. = não determinado .

TABELA 66 - Características morfológicas, auxotróficas e de produção de enzimas a milolíticas dos segregantes do provável produto de fusão .

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS*	AUXOTROFIA				ENZIMA** HALO+COLÔNIA/HALO	DIÂMETRO DE CONÍDIO(µm)
		<u>pab</u> <sub>1</sub>	<u>nic</u> <sub>1</sub>	<u>pro</u>	<u>leu</u> <sub>1</sub>		
25	olv	-	-	-	+	1,0	4,86
26	bwn	-	+	-	+	2,3	3,94
27	olv	+	-	+	+	1,0	4,71
28	bwn	+	+	-	+	1,4	4,63
29	olv	+	-	+	+	1,0	4,77
30	olv	+	-	+	+	1,0	4,46
31	olv	+	-	+	+	1,0	4,78
32	bwn	+	+	+	+	1,3	4,77
33	olv	+	-	-	+	1,0	N.D.
34	bwn	+	+	-	+	1,3	N.D.
35	bwn	+	+	-	+	1,4	N.D.
36	olv	+	-	+	+	1,0	N.D.
37	bwn	+	+	+	+	1,5	4,52
38	olv	+	-	+	+	1,2	5,03
39	olv	+	-	+	+	1,0	4,93
40	bwn	+	+	-	+	1,5	N.D.
41	bwn	+	+	+	+	1,4	N.D.
42	olv	-	-	+	+	1,3	4,87
43	bwn	+	+	-	+	1,5	4,78
44	bwn	-	+	+	+	1,5	4,47
45	olv	+	-	+	+	1,0	4,97
46	bwn	+	+	+	+	2,0	4,63
47	olv	-	-	+	+	1,0	4,90

\* Para os símbolos, consultar a Figura 6 e o item 3.1.

\*\* Índices maiores que 1,0 serão considerados amy<sup>+</sup> e índices iguais a 1,0, amy<sup>-</sup> .

N.D. = não determinado .

TABELA 67 - Análise mitótica do provável produto de fusão.

	<u>nic<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	<u>nic<sub>1</sub><sup>-</sup></u>		<u>amy<sup>+</sup></u>	<u>amy<sup>-</sup></u>		<u>amy<sup>+</sup></u>	<u>amy<sup>-</sup></u>
<u>pab<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	14	14	<u>nic<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	20	0	<u>pro<sup>+</sup></u>	12	21
<u>pab<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	6	13	<u>nic<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	4	23	<u>pro<sup>-</sup></u>	12	2
	<u>pro<sup>+</sup></u>	<u>pro<sup>-</sup></u>		<u>bwn<sub>1</sub></u>	<u>olv<sub>2</sub></u>		<u>bwn<sub>1</sub></u>	<u>olv<sub>2</sub></u>
<u>pab<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	20	8	<u>nic<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	19	1	<u>pro<sup>+</sup></u>	7	26
<u>pab<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	13	6	<u>nic<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	0	27	<u>pro<sup>-</sup></u>	12	2
	<u>leu<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	<u>leu<sub>1</sub><sup>-</sup></u>		<u>pro<sup>+</sup></u>	<u>pro<sup>-</sup></u>		<u>amy<sup>+</sup></u>	<u>amy<sup>-</sup></u>
<u>pab<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	28	0	<u>nic<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	8	12	<u>leu<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	24	23
<u>pab<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	19	0	<u>nic<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	25	2	<u>leu<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	0	0
	<u>amy<sup>+</sup></u>	<u>amy<sup>-</sup></u>		<u>leu<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	<u>leu<sub>1</sub><sup>-</sup></u>		<u>bwn<sub>1</sub></u>	<u>olv<sub>2</sub></u>
<u>pab<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	16	12	<u>nic<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	20	0	<u>leu<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	19	28
<u>pab<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	8	11	<u>nic<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	27	0	<u>leu<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	0	0
	<u>bwn<sub>1</sub></u>	<u>olv<sub>2</sub></u>		<u>leu<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	<u>leu<sub>1</sub><sup>-</sup></u>		<u>bwn<sub>1</sub></u>	<u>olv<sub>2</sub></u>
<u>pab<sub>1</sub><sup>+</sup></u>	13	15	<u>pro<sup>+</sup></u>	33	0	<u>amy<sup>+</sup></u>	19	5
<u>pab<sub>1</sub><sup>-</sup></u>	6	13	<u>pro<sup>-</sup></u>	14	0	<u>amy<sup>-</sup></u>	0	23

Observação: Os segregantes analisados, num total de 47, estão discriminados nas Tabelas 65 e 66.



FIGURA 22 - Setores produzidos pelo provável produto de fusão em MC contendo Benlate (1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

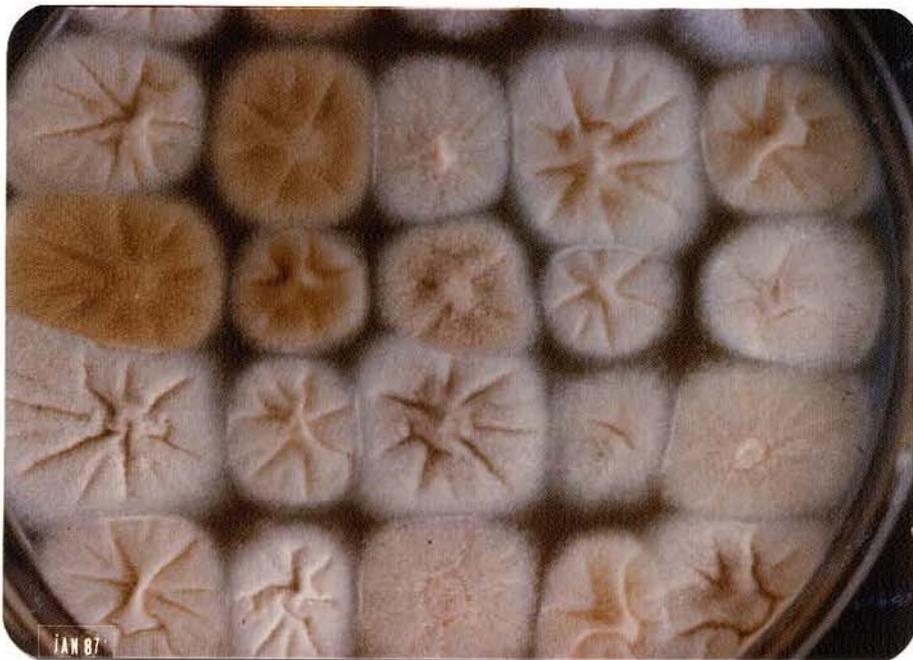


FIGURA 23 - Segregantes isolados do provável produto de fusão.

#### 4.19.5.5. Extração e quantificação do DNA

Conídios do provável produto de fusão, dos dois parentais e de um diplóide de *Aspergillus niger* (PF//NO), foram preparados de acordo com o descrito no item 3.20.5.1. A extração e quantificação foram conduzidas conforme metodologia descrita no item 3.20.5.2. e 3.20.5.3. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 68.

A curva padrão foi feita de acordo com o item 3.20.5.4., a partir da qual se calculou a reta de regressão, cuja equação é  $x = - 0,6621 + (55,384 y)$ . O coeficiente de correlação foi 0,999 e a significância  $t = 31,6$  ( $P = 5\%$ ).

Observa-se na Tabela 68 que a quantidade de DNA apresentada pelo provável produto de fusão é, em média, duas vezes maior que as apresentadas pelas parentais e, semelhante à do diplóide PF//NO.

TABELA 68 - Conteúdo médio de DNA por núcleo ( $\mu\text{g DNA} \times 10^{-8}$ ), das várias linhagens.

LINHAGENS	D N A	RELAÇÃO HÍBRIDO/PARENTAIS
<u>pab</u> <sub>1</sub> <u>nic</u> <sub>1</sub> <u>olv</u> <sub>2</sub>	3,11	2,22
<u>arg/pro</u> <u>leu</u> <sub>1</sub> <u>mor</u> <sub>2</sub> <u>bwn</u> <sub>1</sub>	3,61	1,91
PF//NO	6,39	1,08
Provável produto de fusão	6,90	—

#### 4.19.5.6. Produção de amiloglicosidase (AG).

As linhagens do item anterior e mais o segregante número 46 (Tabela 66), foram testados quanto a produção de AG, de acordo com o descrito no item 3.22.6. Os resultados da análise estatística encontram-se na Tabela 69.

TABELA 69 - Análise de variância dos dados relativos à produção de AG.

FORTE DE VARIACÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Tratamento	4	523,4584	130,8646	70,327**
Resíduo	20	37,2160	1,8608	
C.V. = 13,33%				

\*\* Significativo ao nível de 1% .

Os resultados do teste de Tukey com diferença mínima significativa de 2,58 , das médias da produção de AG apresentadas pelas linhagens, encontram-se sumarizados na Tabela 70.

TABELA 70 - Comparação das médias da produção de AG.

LINHAGENS	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE <u>AG</u> (U/ml)
Segregante nº 46	15,12 a*
Híbrido	12,92 a b
<u>pab<sub>1</sub></u> <u>nic<sub>1</sub></u> <u>olv<sub>2</sub></u>	12,10 b
PF//NO	9,08 c
<u>arg/pro</u> <u>leu<sub>1</sub></u> <u>mor<sub>2</sub></u> <u>bwn<sub>1</sub></u>	1,94 d

\* Médias com letras diferentes são significativamente diferentes ao nível de 5%

Como pode ser observado na Tabela 70, o híbrido não diferiu significativamente do seu parental pab<sub>1</sub> nic<sub>1</sub> olv<sub>2</sub> nem de seu segregante. Por outro lado, produziu mais AG que a PF//NO e o outro parental.

## 5. Discussão

### 5.1. Instabilidade

#### 5.1.1. Segregação espontânea

A linhagem NRRL 3112 de *A. awamori* segrega espontaneamente conídios com deficiência para a síntese de prolina (pro), os quais originam colônias estáveis para tal característica (Figura 1 e Tabela 34). Entretanto, não foi possível isolar colônias prototróficas puras na amostra estudada (Figura 2 e Tabela 1). Na Tabela 1 pode ser observado que a microcolônia  $M_{26}$  apresentou redução da segregação a níveis extremamente baixos e que as porcentagens de segregação observadas nas demais microcolônias sugerem a existência de grande variação com relação a essa característica.

Foi também constatado nessa linhagem, bem como nos derivativos estudados, a formação de setores espontâneos (Figuras 3 e 4). Este fenômeno parece ser independente do acima apresentado, pois segregantes estáveis, com relação à deficiência para prolina, produziram setores secundários. Todos os setores isolados e caracterizados mostraram-se deficientes para prolina, independente da sua origem, isto é, se foram derivados de linhagem que segregava conídios auxotróficos ou de linhagem auxotrófica pura. Como ocorreu no caso da segregação espontânea de conídios auxotróficos, linhagens com frequência de setorização variável também foram isoladas (Tabelas 28 e 40).

CHANG e TUVESON (1975) e FUNGARO (1984), constataram fenômeno similar em outras espécies de *Aspergillus*. No segundo caso, estudos conduzidos em linhagens de *A. awamori* e *A. niger* indicaram que a causa deveria ser a heterocariose, por ter sido possível isolar colônias prototróficas estáveis.

O presente trabalho assemelha-se mais com os relatos de CHANG e TUVESON (1975) em *A. foetidus*, onde a heterocariose foi rejeitada, pois os autores, baseados na taxa de segregação de conídios pro, calcularam que a probabilidade de formação de conídios heterocarióticos situar-se-ia entre 18 e 47% e verificaram que as 35 colônias amostradas segregavam conídios pro<sup>+</sup> e pro. Devido à taxa de segregação similar e à amostragem de 32 microcolônias, o mesmo raciocínio pode ser aplicado à linhagem NRRL 3112 de *A. awamori*. Outra similaridade com o presente trabalho refere-se ao não isolamento de colônias pro<sup>+</sup> estáveis, a partir de conídios. A observação que levou os autores a considerar a hipótese de duplicação cromossômica foi o isolamento de setores pro<sup>+</sup> estáveis, o que sugeriria que a duplicação envolveria um segmento cromossômico contendo o gene relacionado com a biossín-

tese de prolina. Esta é a principal diferença com relação aos resultados constatados no presente trabalho, onde não foi possível, na amostra estudada, isolar tal tipo de setor. Essa diferença poderia ser atribuída à amostragem, ao esquema de seleção ou, ainda, à possibilidade de que a perda do outro segmento duplicado estaria associada à letalidade de conídios (ROBERTS e UPSHALL, 1981; WHELAN e SOLL, 1982).

#### 5.1.2. Efeito do Benlate

As linhagens NRRL 3112 e Awm 3 produziram setores em Benlate diluído em acetona e, também, nos controles com e sem o solvente (Tabelas 4 e 5). Quando os resultados obtidos nos três tratamentos foram comparados entre si, diferenças significativas não foram observadas (Tabelas 6 e 7). Já em Benlate diluído em água, o número de setores produzidos foi significativamente maior do que no controle (Tabelas 10 e 11). Esses resultados indicam que a acetona pode estar agindo antagonicamente ao Benlate, ou seja, reduzindo a frequência de setorização por inibição das linhagens segregantes. O experimento conduzido com o objetivo de verificar o efeito da acetona sobre as linhagens (Tabela 13), mostrou que a concentração de 1,0  $\mu\text{l/ml}$  é suficiente para que as linhagens difiram entre si e que o crescimento em MC seja maior que em MC contendo acetona, o que reforça a sugestão acima exposta. O fato da interação ser também significativa, indica que as linhagens e setores apresentaram comportamento discrepante, ou seja, algumas cresceram menos em MC, outras não. Tendo em vista esses resultados, foi montado um teste, cujos resultados estão sumarizados nas Tabelas 14 e 15, visando estabelecer se os setores obtidos em Benlate eram resistentes ao fungicida ou eram possíveis segregantes. A segunda hipótese parece ser a mais provável, uma vez que nenhum dos setores estudados apresentam discrepância no crescimento, quando comparados com as linhagens que os originaram, mesmo sabendo que a baixa solubilidade apresentada pelo Benlate em água dificulta uma comparação dessa natureza. Considerando o conhecido efeito haploidizante do Benlate (HASTIE, 1970) e sua eficácia na discriminação de linhagens haploides e diplóides de várias espécies de *Aspergillus* obtidas quer em laboratório (UPSHALL e col., 1976; BONATELLI JR. e col., 1983; BRADSHAW e col., 1983), quer na Natureza (UPSHALL, 1981), a diploidia poderia ser apontada como causa da segregação espontânea observada (Item 5.1.1.).

#### 5.1.3. Número de núcleos e diâmetro em conídios

De acordo com YUILL (1950), a espécie *A. awamori* Nakazawa possui 1, 2 e, ocasionalmente, 3 núcleos por conídio. No presente trabalho, resultado si

milar foi constatado na linhagem NRRL 3112 e em todos os seus setores, em seus derivativos  $A_3$  e  $P_1$  e no setor  $S_{16}$  isolado da linhagem Awm 3 (Tabelas 16 e 17). As demais linhagens e setores apresentaram também conídios com 4, 5 e até 6 núcleos.

Pelas Tabelas 20 e 21, pode ser observada a grande variação apresentada pelas linhagens e setores. A linhagem Awm 3, seus mutantes e a maioria de seus setores ocuparam posições opostas na distribuição dessa característica, quando comparados com a linhagem NRRL 3112 e alguns de seus setores e derivativos. De uma maneira geral, este último grupo apresentou menor número de núcleos por conídio.

Excetuando-se a linhagem NRRL 3112, seus derivativos e os setores  $T_{14}$  e  $T_{15}$ , o diâmetro dos conídios aumentou com o aumento do número de núcleos (Tabelas 22 e 23). Esses dados não discordam dos de YUILL (1950), onde essa relação foi verificada em várias espécies do gênero *Aspergillus*. Entretanto, quando as médias do número de núcleos das linhagens e setores, com suas respectivas médias do diâmetro de conídios, foram utilizadas para o cálculo da correlação, esta não resultou significativa (Item 4.6.5.), o que poderia ser atribuído à baixa frequência de conídios com mais de 3 núcleos.

Apesar das diferenças entre os diâmetros mostradas pelas linhagens e setores terem sido significativas (Tabelas 24 e 25), pode ser notado, através das Tabelas 26 e 27, que a variação foi menor que a mostrada para número de núcleos. A linhagem Awm 3 não diferiu de nenhuma das outras, enquanto que a NRRL 3112 diferiu apenas dos setores  $S_4$ ,  $S_9$ ,  $S_{19}$ ,  $S_{24}$  e  $S_{25}$ .

#### 5.1.4. Considerações finais sobre instabilidade e variabilidade

Verifica-se, pelo apresentado acima, que a linhagem NRRL 3112 apresentou comportamento que não seria o esperado para um clone. As observações sugerem a existência de heterozigose para as características estudadas, que poderiam estar contidas numa duplicação parcial ou total do genoma.

O efeito do Benlate pesa favoravelmente em relação à uma duplicação total do genoma, porém vários compostos químicos que aumentam a instabilidade de diplóides também apresentam o mesmo efeito em linhagens duplicadas de *A. nidulans* (AZEVEDO e col., 1977; BONATELLI JR. e AZEVEDO, 1977). O isolamento de mutantes auxotróficos e morfológicos em baixa frequência (Item 4.9.1.) poderia também reforçar a idéia de diploidia, mas o fato das linhagens serem multinucleadas pode estar determinando tal observação. Isto se torna mais evidente quando os valores médios de número de núcleos por conídio das linhagens a partir das quais os mutantes foram obtidos são considerados (Tabelas 16 e 17). A linhagem NRRL 3112 da qual mutantes auxotróficos puderam ser isolados apresenta 1,4 núcleos/conídio, e a Awm

3, da qual foram isolados apenas mutantes morfológicos, tem 2,4 núcleos/conídio.

Outra hipótese a ser considerada seria a da duplicação cromossômica, apesar de não terem sido isolados derivativos pro<sup>+</sup> através de conídios e/ou setores. A variabilidade observada poderia ser explicada pela existência de um segmento cromossômico em duplicata que, ao sofrer deleção, originaria derivativos que apresentariam alterações nas características acima discutidas, de maneira similar ao encontrado em *A. nidulans* (AZEVEDO, 1975). A instabilidade da característica pro poderia ser interpretada como decorrente de deleção do segmento contendo gene pro<sup>+</sup>. E, a ausência de derivativos pro<sup>+</sup> estáveis, pelo possível efeito letal da perda do segmento contendo o gene pro, o que exporia, por exemplo, o gene letal recessivo contido no segmento pro<sup>+</sup> ou acarretaria, ao mesmo tempo, na perda de gene que não seja do tipo letal condicional.

Uma terceira hipótese para explicar a instabilidade observada seria a presença de elementos transponíveis (AZEVEDO e ROPER, 1970; GREER e FINK, 1979).

## 5.2. Isolamento de mutantes.

### 5.2.1. Auxotróficos e morfológicos

Devido à baixa frequência de mutantes auxotróficos verificada para a linhagem NRRL 3112 e a não obtenção desse tipo de mutante na linhagem Awm 3 (Tabela 33), optou-se pela substituição do método de isolamento total, por um método de enriquecimento. No caso, o escolhido foi o da filtração, originalmente descrito por FRIES (1947).

Este método foi utilizado apenas na linhagem NRRL 3112 e num mutante dela obtido (Tabela 33). Mutantes auxotróficos foram isolados apenas com duas filtrações consecutivas. A frequência de mutantes foi 12 vezes maior do que a observada no método de isolamento total. Este aumento é similar ao obtido por SILVEIRA e AZEVEDO (1984); com o fungo *Metarhizium anisopliae*, onde a frequência foi de 7 a 20 vezes maior do que a observada no isolamento total. O método de enriquecimento por filtração foi utilizado também com sucesso para *A. niger* e *A. awamori* (FUNGARO, 1984) e para espécies de outros gêneros (WOODWARD e col., 1954; CATCHESIDE, 1954; DAY e ANDERSON, 1961).

Como o objetivo do presente trabalho era apenas obter mutantes para utilizá-los nos estudos do ciclo parassexual, uma aplicação mais rigorosa do referido método não foi efetuada. O tempo ideal de crescimento em meio líquido, através de um experimento de reconstrução onde crescem conjuntamente um mutante au

xotrófico e a linhagem parental, não foi determinado. É provável que a eficiência do método melhorasse se tais condições fossem obedecidas.

Conforme discutido anteriormente, a ausência ou baixa frequência de mutantes auxotróficos, que são recessivos, poderia ser atribuída a uma possível diploidia ou ao fato das linhagens serem multinucleadas (Tabelas 20 e 21).

Os mutantes auxotróficos obtidos são suficientemente estáveis para serem utilizados nos cruzamentos, pois não foram obtidos revertentes em  $10^7$  conídios testados (Tabela 34).

Apesar da impossibilidade de se isolar mutantes auxotróficos a partir da linhagem Awm 3, oito mutantes morfológicos foram obtidos, dos quais três foram isolados (Figura 6). Todos eles apresentaram coloração de conídios branca ou creme, assim como os setores morfológicos (Tabela 3). Em vista desses resultados, pode ser aventado que foram isolados segregantes espontâneos ou induzidos ao invés de mutantes.

#### 5.2.2. Resistentes ao Brometo de Etídio

De acordo com os resultados apresentados nos itens 4.12.2. e 4.12.3., só foi possível isolar mutantes resistentes ao Brometo de Etídio quando feita a indução com luz ultra-violeta.

A frequência de mutantes resistentes induzidos foi de  $1,36 \times 10^{-6}$ . Este fato, associado com o crescimento de falsos resistentes, poderia explicar o não isolamento de mutantes resistentes espontâneos na amostra ensaiada.

Os mutantes obtidos cresceram em concentrações elevadas de Brometo de Etídio, distinguindo-se bem das linhagens sensíveis (Tabela 37 e Figura 8). Isso demonstra que a marca é apropriada para estudos de segregação.

Nível de resistência elevado a essa droga foi constatado para todos os mutantes isolados, o que não é norma quando se usa outras espécies de *Aspergillus* (SCARAZZATTI e col., 1979; SCARAZZATTI - FRAU, 1985).

#### 5.3. Evidenciação do bloqueio metabólico na via biossintética dos aminoácidos arginina e prolina

Através dos resultados obtidos (Tabela 35), pode-se supor que o bloqueio metabólico das linhagens Awn 3 e arg/pro mor<sub>1</sub> gre<sub>1</sub>, encontram-se na passagem de ácido glutâmico para semialdeído  $\gamma$  glutâmico, uma vez que as linhagens apresentaram crescimento similar ao meio mínimo quando este era suplementado com ácido glutâmico. Assim sendo, os mutantes, linhagens e setores até agora classificados co-

mo deficientes para a síntese de arginina ou prolina, apresentam bloqueio na via biossintética da prolina e, assim, poderiam ser simbolizados por pro ao invés de arg/pro. Como a prolina é produto final da via bloqueada, as linhagens crescem quando esse aminoácido é adicionado. Com a adição de arginina, o crescimento também é verificado, pois a degradação desse aminoácido ocorre via ornitina, resultando em semialdeído  $\gamma$  glutâmico e, este, em prolina. Esta mesma rota biossintética é seguida quando citrulina é adicionada ao meio de cultura, pois ela é transformada em arginina. Por esse motivo, observa-se que as duas linhagens crescem também na presença dessa substância.

Essa sugestão para o bloqueio concorda com a de FUNGARO (1984), que trabalhou com a linhagem ATCC 22342 de *A. awamori*.

Na Figura 24 é apresentado o esquema com os bloqueios sugeridos.

Este esquema metabólico é o estabelecido para *Neurospora crassa*. Um mutante dessa mesma espécie (pro<sup>-3</sup>), incapaz de sintetizar semialdeído  $\gamma$  glutâmico, foi obtido e observou-se que a fonte alternativa para a formação de prolina foi a ornitina. Essa via catabólica normalmente opera apenas na presença de ornitina ou arginina exógena (WEISS e LEE, 1980). Quanto a esse último ponto, foi observado no presente trabalho que essa via catabólica opera também na presença de citrulina exógena, se bem que de maneira pouco eficiente.

Também pode ser observado na Tabela 35 que o mutante arg<sub>1</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>S</sup> gre<sub>1</sub> apresentou crescimento residual em arginina e cresceu bem em meio contendo arginina e prolina. Isso sugere que esse mutante, além de possuir bloqueio na via da prolina, possui também bloqueio na passagem de ácido arginossuccínico à arginina (Figura 24).

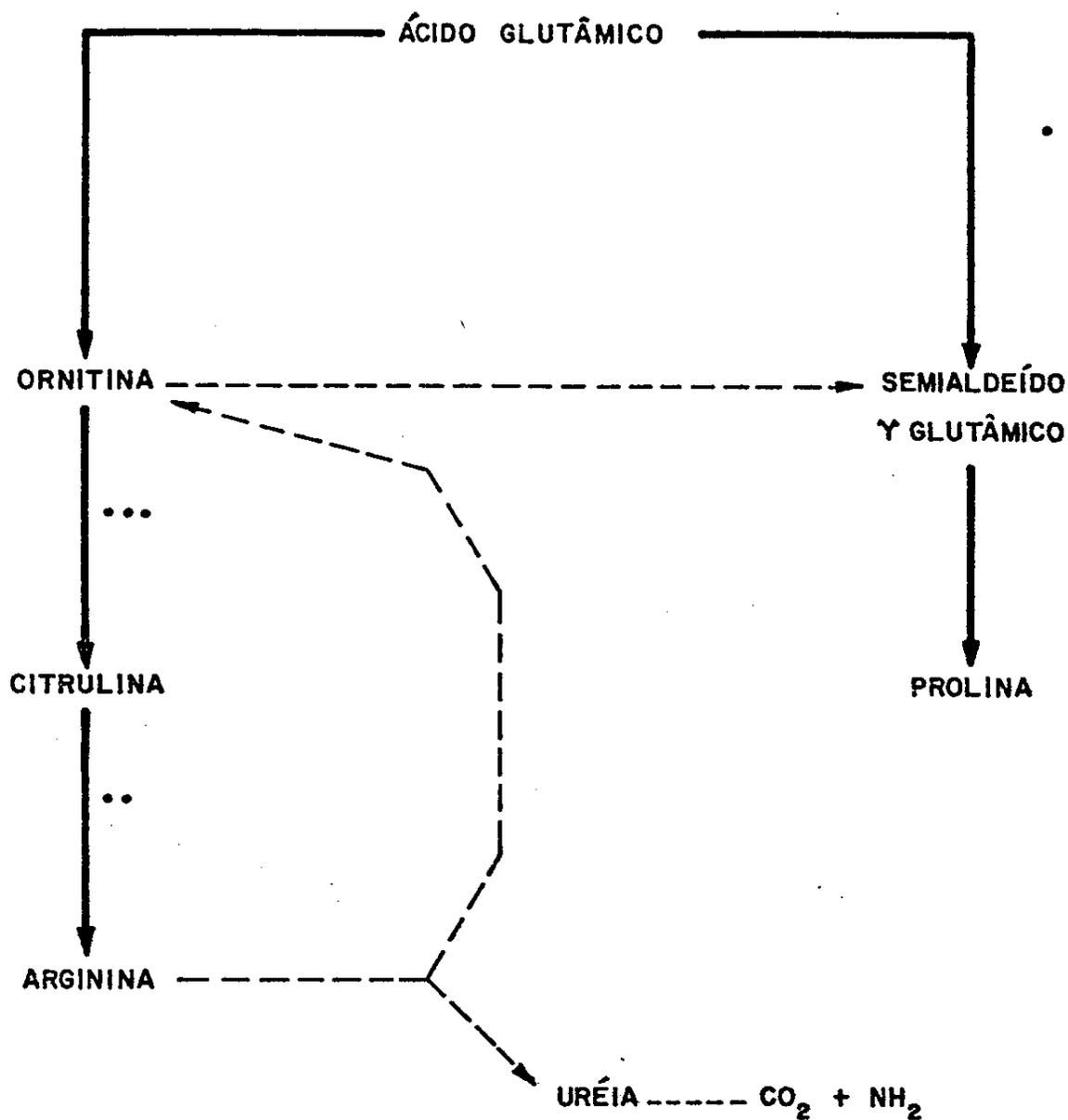
No caso do mutante arg<sub>2</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>S</sup> gre<sub>1</sub>, além de responder para arginina e prolina, ele cresce também em prolina mais citrulina, e apresenta crescimento residual em citrulina. Esses resultados sugerem a existência de um bloqueio na passagem de ornitina a citrulina.

Logicamente, estudos bioquímicos seriam necessários para a confirmação dos bloqueios propostos neste trabalho.

#### 5.4. Cruzamento intra-específico

##### 5.4.1. Obtenção de heterocários e prováveis diplóides

Os resultados obtidos para os três cruzamentos realizados (Tabela 41), indicam o isolamento, a partir de heterocários típicos, de colônias que puderam ser classificadas como: I) prováveis diplóides e II) heterocarióticas. Foi



**BLOQUEIOS SUGERIDOS:**

———— VIA NORMAL

----- VIA ALTERNATIVA

- Para prolina, linhagem Awm 3 e arg/pro gre<sub>1</sub>
- Para arginina, mutante arg<sub>1</sub> pro mar<sub>1</sub> etb<sup>s</sup> gre<sub>1</sub>
- Para arginina, mutante arg<sub>2</sub> pro mar<sub>1</sub> etb<sup>s</sup> gre<sub>1</sub>

evidenciada a não autonomia quanto à coloração de conídios (PONTECORVO e col., 1953) pois, nas colônias heterocarióticas, foram observados conidióforos com conídios pretos, dos quais apenas colônias parentais foram recuperadas.

As colônias prováveis diplóides e heterocarióticas providas dos três cruzamentos não cresceram na ausência de prolina. Isso mostra que não houve complementação e que, portanto, esta marca auxotrófica deve ser determinada pela mesma lesão genética (Item 4.14.3.).

As colônias heterocarióticas apareceram com frequências semelhantes nos três cruzamentos (Tabela 41), porém puderam ser facilmente separadas dos prováveis diplóides pela segregação de conídios similares às parentais e pelo crescimento irregular em MM suplementado com prolina (Figura 10). As frequências relatadas são maiores do que a descrita para *Aspergillus niger* (CHANG e col., 1974).

A frequência de conídios prováveis diplóides, provindos dos setores heterocarióticos, variou de  $1,67 \times 10^{-6}$  a  $3,19 \times 10^{-5}$  (Tabela 41). Essas frequências são maiores que a relatada para *Aspergillus nidulans* (ROPER, 1966) e consideravelmente menores que as encontradas para *A. niger* (BONATELLI Jr. e col., 1983). A maior frequência observada nos dois últimos cruzamentos pode estar relacionada ao fato das películas terem ficado incubadas por um período de tempo maior. Isso poderia permitir uma maior proliferação de hifas que contivessem núcleos diplóides, tendo em vista o rápido esgotamento do MC fornecido no meio.

As colônias prováveis diplóides apresentaram crescimento irregular em MM contendo prolina, o que levou à manutenção dessas linhagens em MC, onde apresentam crescimento regular e produzem menos setores. Essa maior estabilidade em MC difere dos relatos para outros fungos nos quais foi determinado o ciclo parassexual (ROPER, 1966).

#### 5.4.2. Caracterização das linhagens prováveis diplóides

O número de núcleos por conídio, apresentado pelas linhagens parentais e prováveis diplóides foram semelhantes (Tabela 43), não podendo ser adotado como critério de caracterização, ao contrário do que é sugerido para outras espécies de fungos (CHANG e col., 1974; MESSIAS, 1977; MESSIAS e AZEVEDO, 1980; BONATELLI Jr. e col., 1983).

A comparação da germinação dos conídios em MM contendo prolina e em MC (Tabela 42), foi um outro critério usado para a caracterização. Pode ser observado que a média do número de colônias que cresceram nos dois meios foram praticamente iguais nos três cruzamentos, indicando tratar-se de colônias diplóides.

Indicação semelhante foi obtida em relação ao diâmetro de conídios, que se mostrou 1,20 a 1,30 vezes maior que o apresentado pelas linhagens parentais (Tabela 44). Verifica-se, assim, que os conídios prováveis diplóides possuem o dobro do volume das linhagens parentais, o que é similar ao relatado para *A. nidulans* (PONTECORVO e col., 1953), *A. niger* (LHOAS, 1967; BONATELLI Jr. e col., 1983) e difere do constatado para *A. flavus* (PAPA, 1979) e *Metarhizium anisopliae* (MESSIAS e AZEVEDO, 1980).

Uma linhagem provável diplóide e as três linhagens parentais foram tratadas com Brometo de Etídio (Tabela 45 e Figura 14). Pode ser observado que a linhagem provável diplóide se comportou de maneira semelhante à linhagem parental resistente. Esses resultados sugerem que o gene que confere resistência é dominante em relação ao gene normal. SCARAZZATTI-FRAU (1985), estudando 12 mutantes de *A. nidulans*, observou que os genes para resistência a essa droga podem ser dominantes, semi-dominantes e recessivos. Para constatar se tal comportamento é apresentado pelas linhagens em estudo, maior número de mutantes precisaria ser isolado e estudado.

Quando as linhagens prováveis diplóides foram colocadas na presença de Benlate, as colônias apresentaram crescimento reduzido em relação às parentais e produziram setores cujos conídios tinham as cores das linhagens parentais (Figuras 12 e 13), evidenciando comportamento similar aos diplóides de *A. nidulans* e *A. terreus* (UPSHALL e col., 1976; UPSHALL, 1981) e de *A. niger* (BONATELLI Jr. e col., 1983). A existência de setores recombinantes foi detectada tanto nos segregantes induzidos como nos espontâneos. As linhagens prováveis diplóides puderam então ser discriminadas inequivocamente das parentais, podendo-se concluir que ocorreu fusão nuclear nos três cruzamentos, com formação de núcleos heterozigotos.

Outro critério adotado para a caracterização dos prováveis produtos de fusão foi a extração e quantificação do DNA (Tabela 46), cujas etapas são discutidas a seguir.

No primeiro experimento de extração, foi observado que as linhagens utilizadas liberaram um pigmento amarelado nos tubos de reação, fenômeno que foi mais evidente nas linhagens Awm 3 e diplóide. Como havia evidências genéticas indiscutíveis de que a linhagem utilizada como diplóide nesse experimento era realmente diplóide, aventou-se a possibilidade do pigmento estar interferindo na reação de coloração com a difenilamina e causando uma relação 1:1,5 entre as linhagens parentais e diplóides, ao invés do esperado 1:2 (Tabela 46). Por isso, foi

introduzida uma modificação no método por ocasião dos experimentos subseqüentes, ou seja, o número de conídios utilizados foi reduzido de  $1,0 \times 10^9$  para  $5,0 \times 10^8$ . Outra razão para tal mudança foi a ocorrência de uma possível saturação da solução extrativa de PCA 1,5 N.

No segundo experimento, a relação de 1:2 ficou melhor estabelecida, podendo-se observar, no entanto, que a melhor relação é conseguida quando se compara o resultado do diplóide, no segundo experimento, com os resultados obtidos para os parentais no primeiro experimento. Talvez, uma maneira de solucionar esse problema seja utilizar, para o diplóide, a metade do número de núcleos usado para as linhagens parentais. Adotando-se esse procedimento, a quantidade de DNA fica uniformizada, evitando-se possíveis diferenças de solubilização e saturação.

Logicamente, se faz necessária uma otimização dessa técnica, levando-se em conta, principalmente, o problema do pigmento, que talvez pudesse ser extraído antes do início do processo de extração do DNA. Também seria interessante estudar a questão da provável saturação, ensaiando-se números variáveis de conídios, com o objetivo de se estabelecer a melhor faixa de trabalho.

Considerando-se as médias dos resultados dos dois experimentos (Tabela 46), verifica-se que a linhagem diplóide apresentou aproximadamente o dobro (1,8) da quantidade de DNA por núcleo. Esses resultados concordam com os obtidos por HEAGY e ROPER (1952) em *A. nidulans* que, utilizando outro método, verificaram a relação de aproximadamente 1:2 entre o núcleo haplóide e o diplóide. MESSIAS e AZEVEDO (1980) obtiveram resultados semelhantes para *Metarhizium anisopliae*.

#### 5.4.3. Caracterização dos segregantes

Os diâmetros de conídios dos segregantes foram estimados e comparados com as linhagens parentais e diplóides (Figura 16). Pode ser verificado que todos os segregantes isolados a partir de MC contendo Benlate e parte dos obtidos espontaneamente, não diferiram das linhagens parentais em relação a essa característica. Dos 25 setores espontâneos (Tabela A1), 10 apresentaram diâmetro de conídios similares aos das linhagens diplóides e produziram setores na presença de Benlate podendo, portanto, ser classificados como diplóides. O fato de todos os setores espontâneos apresentarem conídios de coloração marrom pode ser devido tanto ao tamanho da amostra, como a algum problema de competição.

Pode ser observado, pelos resultados obtidos nos três cruzamentos, que houve total coincidência entre os dois critérios, podendo-se utilizar qualquer um deles com segurança.

Os segregantes isolados no primeiro cruzamento (Tabela 48), revelaram segregação independente de todos os genes envolvidos no cruzamento, com exceção das marcas relacionadas à coloração de conídios e ao Brometo de Etídio. Verificou-se que todos os setores resistentes à droga (etb<sup>r</sup>) possuíam conídios verdes (gre<sub>1</sub>) e todos os sensíveis (etb<sup>s</sup>), conídios marrons (bwn<sub>1</sub>). Indiretamente, pode-se concluir então que as marcas etb<sub>1</sub><sup>r</sup>, gre<sub>1</sub> e bwn<sub>1</sub> encontram-se no mesmo grupo de ligação.

Os resultados do segundo cruzamento encontram-se na Tabela 49, onde pode ser observado que apenas 5 segregantes arg<sub>1</sub> foram constatados entre os 78 setores estudados. Nesse cruzamento foi também evidenciada uma possível ligação entre arg<sub>1</sub> e a marca morfológica mor<sub>1</sub>. Em alguns casos, não foi possível identificar a presença ou ausência da marca mor<sub>1</sub>.

Para o terceiro cruzamento, foi também verificada menor frequência de recuperação da marca arg<sub>2</sub> (Tabela 50), tendo sido isolados apenas 25 desses setores, num total de 81 amostrados. Ligação entre arg<sub>2</sub> e mor<sub>1</sub> pode ser detectada.

A característica proliferação de conidióforos secundários foi estudada nos dois últimos cruzamentos. Todos os segregantes com conídios verdes e as linhagens parentais de mesma coloração mostraram tal característica que, por sua vez, não se manifestou nos setores marrons, nem nas linhagens diplóides sendo, portanto, considerada recessiva. De acordo com os resultados obtidos, pode ser concluído que a característica proliferação de conidióforos secundários é um efeito pleiotrópico do gene gre<sub>1</sub>, ou que esses genes encontram-se fortemente ligados. Em *A. niger*, situação similar foi evidenciada por BONATELLI Jr. e col. (1985), que concluíram tratar-se de efeito pleiotrópico do gene olv<sub>1</sub>.

Pelos resultados da Tabela 51, fica evidenciado que há forte ligação entre os genes leu<sub>1</sub> e mor<sub>2</sub> ou, então, se trata de pleiotropia. Segregantes portadores das marcas leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> foram isolados em menor número (71 em 172). Como essas marcas conferem menor crescimento radial, conidiação mais tardia e enrugamento na região central das colônias, a menor frequência pode estar ligada à competição. Pode estar havendo, também, influência do agente haploidizante sobre as marcas auxotróficas. Fato semelhante já foi observado para o pFA (BALL, 1971; PAPA, 1976; BRADSHAW e col., 1983).

Em conclusão, pode ser dito que as características estudadas puderam ser ordenadas em dois grupos de ligação: I) com genes etb<sub>1</sub><sup>r</sup> gre<sub>1</sub> bwn<sub>1</sub> e II) com os genes mor<sub>1</sub> arg<sub>1</sub> arg<sub>2</sub>, ficando sem indicação de associação pab<sub>1</sub>, leu<sub>1</sub> e

mor<sub>2</sub>. Como as características leu<sub>1</sub> e mor<sub>2</sub> estão fortemente ligadas ou são efeito pleiotrópico do mesmo gene, podemos supor a existência de pelo menos 4 grupos de ligação para esta espécie.

## 5.5. Produção de amiloglicosidase (AG)

### 5.5.1. Curva de acúmulo

A quantidade de enzima acumulada atinge praticamente o ponto máximo no 30 dia, permanecendo nessa faixa com pequenas alterações até o 80 dia (Figura 17). A glicose residual caiu drasticamente do 20 para o 30 dia, atingindo praticamente o valor zero e permanecendo assim até o 80 dia. Essa correlação negativa entre glicose residual e quantidade de enzima é similar à observada por SINKAR e LEWIS (1982) e BONATELLI Jr. e col. (1984) em *A. niger*.

Os resultados obtidos no presente trabalho revelam que a linhagem NRRL 3112 de *A. awamori* produz mais enzima que o *A. niger* (BONATELLI Jr. e col., 1984) e também acumula mais rapidamente a enzima. Essas características são consideradas de grande importância para linhagens utilizadas industrialmente.

O pH declinou no início do período de fermentação e, depois, voltou a subir até se estabilizar um pouco acima do pH inicial (5,5). Em *A. niger*, (UMBUZEIRO-VALENT, 1985), o declínio é mais acentuado, atingindo pH 2,3 e subindo lentamente até pH 3,1 no 70 dia de fermentação.

Quanto ao peso seco do micélio, ele teve seu pico no 30 dia, coincidindo com o da enzima e, depois, diminuiu até o 70 dia, apresentando um leve aumento no 80 dia.

### 5.5.2. Atividade de AG na presença de inibidor específico com dextrina limite ou amido como substrato

Pela Tabela 53 observa-se que grande inibição da atividade é obtida com a dose de 10µg/ml do inibidor e que a quantidade de enzima medida nos dois substratos é similar. Esses resultados indicam que a enzima que está sendo medida com o método empregado é, em sua maior parte, a amiloglicosidase. Resultados similares foram obtidos por BONATELLI Jr. e col. (1984) e UMBUZEIRO VALENT (1985) em *A. niger*.

As razões para a utilização desses compostos são:

1. A dextrina limite é obtida como produto de digestão exaustiva do amido comum com  $\alpha$  amilase até que açúcares redutores não sejam mais produzidos. O produto final pode ser hidrolizado pela AG em condições normais de reação (UEDA, 1980).

2. O inibidor obtido de *Streptomyces* sp nº 280, por UEDA e KOBA (1973), inibe acentuadamente AG obtida tanto de *Aspergillus* (MEDDA e col., 1981) como de *Rhizopus*. Porém, inibe apenas 8,3% da atividade da  $\alpha$  amilase de *Aspergillus* (UEDA e KOBA, 1973).

#### 5.5.3. Determinação da melhor concentração de aminoácidos

Algumas linhagens com marcas auxotróficas para aminoácidos foram ensaiadas com o propósito de se estabelecer concentrações dessas substâncias, no meio, que proporcionassem a maior produção de AG.

Observa-se pela Tabela 54 que, em relação à prolina, a média de enzima produzida se manteve mais ou menos constante em todas as concentrações ensaiadas. Pode ser que a farinha integral de mandioca, utilizada na preparação do meio de fermentação, já forneça a quantidade de prolina necessária para o desenvolvimento do fungo. A concentração de 50 $\mu$ g/ml foi escolhida nesse caso.

Com relação à leucina (Tabela 55), à medida que a concentração aumentou, a média de produção de AG também aumentou. A concentração de 100 $\mu$ g/ml foi escolhida, uma vez que foi a partir desse ponto que a produção se estabilizou. Com a arginina a situação é similar, exceto que a produção de AG continuou aumentando com o aumento da concentração do aminoácido. Optou-se então pela utilização da concentração de 200 $\mu$ g/ml (Tabela 56).

#### 5.5.4. Produção de AG

Algumas linhagens, mutantes e setores tiveram sua produção de enzima quantificada e os resultados encontram-se descritos nas Tabelas 59 e 60. A linhagem NRRL 3112, que apresenta 10% de conídios pro (Item 4.1.) e cuja produção de AG é relativamente alta, diferiu significativamente das linhagens P<sub>1</sub> e M<sub>26</sub>, as quais segregam, respectivamente, 5,0% e 0,06% de conídios pro.

A linhagem NRRL 3112 produziu significativamente mais AG que os segregantes e diplóides. Esses são auxotróficos puros, ou seja, possuem 100% de conídios pro. A produção nessas linhagens caiu cerca de 50% ou mais. Resultados similares foram relatados por CHANG e TUVESON (1975) em *A. foetidus*. Esses autores isolaram linhagens com taxas variáveis de segregação para pro e verificaram que, quanto maior a proporção desse tipo de conídios, menor é a quantidade de AG produzida.

As demais linhagens e setores que, além da marca pro, possuem outras marcas auxotróficas e morfológicas, produziram ainda menos AG. Talvez isso se deva a um efeito cooperativo das marcas. Como a marca pro está presente em to-

dos os mutantes, diplóides e segregantes obtidos, torna-se impossível estudar o efeito de outras marcas isoladamente. Para tanto, seria necessário obter-se linhagens prototróficas puras, o que não foi conseguido como discutido anteriormente.

#### 5.6. Cruzamento interespecífico

Devido à impossibilidade de se obter híbridos interespecíficos entre *A. awamori* e *A. niger* através de métodos convencionais (Item 4.19.1.), utilizou-se da técnica de fusão de protoplastos.

##### 5.6.1 Fusão espontânea de protoplastos

Um número pequeno de protoplastos foi utilizado nesse experimento: cerca de  $3,0 \times 10^5$  para cada linhagem. Verificou-se que a regeneração foi relativamente baixa para as duas linhagens, situando-se na faixa de 19 a 17% para *A. awamori* e *A. niger*, respectivamente (Tabela 61). Em consequência desses dois fatos, o número de protoplastos total utilizado para a fusão foi muito pequeno.

Os marcadores genéticos se mostraram estáveis, pois nenhum revertente foi obtido.

Após procedimento de fusão, verificou-se que nenhuma colônia se desenvolveu em MM KCl (Tabela 62). O insucesso dessa tentativa provavelmente poderia ser atribuído tanto ao pequeno número de protoplastos utilizados, como ao fato de não se ter utilizado agente fusogênico ou, ainda, a ambos.

##### 5.6.2 Fusão induzida de protoplastos

A regeneração dos protoplastos obtidos nesse experimento foi ainda menor que a obtida para o caso anterior, situando-se na faixa de 7,5 e 14,4% respectivamente para *A. awamori* e *A. niger* (Tabela 63). Com isso, o número de protoplastos utilizados para a fusão foi de  $0,75 \times 10^5$  e  $1,44 \times 10^5$ . Os marcadores genéticos mostraram-se novamente estáveis.

Após procedimento de fusão, a média do número de protoplastos que se desenvolveram em MC KCl foi de  $1,92 \times 10^4$ , sendo na sua maioria colônias típicas de *A. awamori* (Tabela 64). Em MM KCl, desenvolveram-se  $1,13 \times 10^2$  colônias. A frequência de formação dessas colônias prototróficas foi de 0,6%. Essa frequência é bem inferior à obtida por PEBERDY e col. (1977), os quais verificaram que colônias heterocarióticas, entre *Penicillium chrysogenum* e *P. cyaneo-fulvum*, apareceram com frequência da ordem de 10%.

A menor eficiência do método aqui empregado, deve-se provavelmente à influência de alguns fatores no processo. Um deles seria o pequeno número de

protoplastos utilizados para a fusão. Outros fatores a serem considerados são a baixa capacidade de regeneração dos protoplastos e um possível efeito tóxico diferencial do agente fusogênico (FUNGARO, 1984). O PEG estaria matando preferencialmente protoplastos do *A. niger*, tendo em vista a pequena proporção de colônias obtidas para essa espécie em MC KCl (Tabela 64).

As hipóteses aqui levantadas poderiam ser avaliadas melhorando-se o rendimento na obtenção e na regeneração dos protoplastos, e aperfeiçoando-se as técnicas de fusão. Também poderia ser estudado o emprego de outros métodos de fusão, tais como os de eletrofusão (ZIMMERMANN e VIENKEN, 1982).

#### 5.6.3. Caracterização das colônias isoladas de MM KCl

Essas colônias apresentaram crescimento muito lento e irregular em MM, diferindo totalmente das colônias parentais (Figura 19). Tais resultados concordam com os obtidos por PEBERDY e col. (1977).

Além das características já descritas, as colônias não esporulam em MM. Em MC, apresentam regiões morfológicamente semelhantes à linhagem de *A. awamori* e regiões diferentes de ambas as parentais (Figura 20). Regiões com morfologia semelhante à linhagem de *A. niger* não foram encontradas, talvez por um problema de competição, uma vez que anteriormente já se havia observado que as colônias de *A. niger* crescem mais lentamente. Fenômeno semelhante deve ter ocorrido quando conídios dessas colônias desenvolvidas em MC foram semeados em MC, pois 98% deles se mostraram morfológica e auxotroficamente semelhantes à linhagem de *A. awamori* (Item 4.19.3.2.). Dos conídios que foram semeados em MM, apenas alguns germinaram, dando uma frequência de  $1,1 \times 10^{-5}$ . Os dados discutidos no presente item sugerem que as colônias que cresceram em MM.KCl são hererocarióticas.

#### 5.6.4. Isolamento do provável produto de fusão

Quando as colônias heterocarióticas foram submetidas ao tratamento com Benlate, setores prototróficos com conídios de coloração preta surgiram em todos os tratamentos, inclusive em MM e MC sem Benlate (Figura 21). Quando tratados com Benlate, eles se mostraram instáveis e originaram numerosos setores, cujos conídios possuíam as cores das linhagens parentais (Figura 22), sugerindo que eram resultados de fusão nuclear.

#### 5.6.5. Caracterização dos prováveis produtos de fusão e de seus segregantes

Apesar da natureza interespecífica do cruzamento, houve distri-

buição ao acaso dos grupos de ligação, semelhante à esperada para um diplóide intra-específico, sugerindo, assim, um alto grau de homologia entre as espécies. Resultados similares são relatados por KEVEI e PEBERDY (1977, 1979).

Observa-se pela Tabela 67 que nenhum setor leu<sub>1</sub> foi isolado entre os 47 analisados. Esta ocorrência poderia estar ligada à amostragem ou a um problema de competição semelhante ao proposto para os diplóides intra-específicos, onde argumentou-se que as marcas leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub>, por conferirem à colônia menor crescimento radial, conidiação mais tardia e enrugamento na parte central, estariam em desvantagem, sendo assim isoladas em menor número. Uma alternativa que poderia ser testada nesse caso seria adicionar o agente haploidizante ao MM contendo leucina e os demais nutrientes envolvidos no cruzamento, ao invés de MC. Com esse procedimento, os setores leu<sub>1</sub> poderiam ser favorecidos e, provavelmente, isolados.

Com base nos resultados obtidos (Tabela 67) pode ser sugerida ligação entre o gene que confere a cor dos conídios e os genes nic<sub>1</sub> amy e pro. Os genes pab<sub>1</sub> e leu<sub>1</sub> segregaram independentemente. Dessa forma, um esquema indicando a distribuição dos genes é mostrado a seguir:

		GRUPOS DE LIGAÇÃO	
		I	II
<i>A. awamori</i>	<div style="text-align: center;"> <u>nic</u><sup>+</sup><sub>1</sub>  <u>bwn</u><sub>1</sub>  <u>amy</u><sup>+</sup>  <u>pro</u> </div>		<u>pab</u> <sup>+</sup> <sub>1</sub>
		I	II
<i>A. niger</i>	<div style="text-align: center;"> <u>nic</u><sub>1</sub>  <u>olv</u><sub>2</sub>  <u>amy</u>  <u>pro</u><sup>+</sup> </div>		<u>pab</u> <sub>1</sub>

A idéia da proximidade filogenética entre as espécies (RAPER e FENNELL, 1965) é reforçada pela observação de que as relações de ligação estabele-

cidas em cruzamentos intra-específicos é confirmada no cruzamento interespecífico, como relatado no presente trabalho (Item 5.4.3.) e por UMBUZEIRO VALENT (1985) em *A. niger*.

Embora as evidências genéticas sejam consideradas as mais fortes para a demonstração da ocorrência de fusão nuclear, outras características também foram estudadas. Assim, verificou-se que o diâmetro de conídio apresentado pelo provável produto de fusão foi em média 1,20 a 1,30 vezes maior que o diâmetro das linhagens parentais e segregantes (Tabelas 65 e 66). Essa relação de 2:1 no volume é evidência adicional em favor da ocorrência de fusão nuclear. Esta variável foi utilizada por PEBERDY e col. (1977) para separar linhagens haplóides de diplóides no cruzamento entre *P. chrysogenum* e *P. cyaneo-fulvum*.

O comportamento na presença de Benlate é um outro critério adotado para separar linhagens haplóides de diplóides (PEBERDY e col., 1977; BRADSHAW e col., 1983) e, no presente trabalho, a utilização de tal procedimento revelou que todos os segregantes analisados são estáveis na presença do agente haploidizante, indicando serem haplóides. Os resultados demonstram que houve total coincidência entre os critérios diâmetro de conídios e comportamento em Benlate podendo-se, portanto, utilizar qualquer um deles com segurança.

Considerando-se as médias dos resultados da Tabela 68, verificou-se que o provável produto de fusão e o diplóide PF//NO apresentaram aproximadamente o dobro da quantidade de DNA por núcleo, quando comparados com as linhagens parentais, confirmando a hipótese da fusão nuclear. Resultados similares são relatados para outros cruzamentos interespecíficos por PEBERDY (1979b).

Ao final de todo esse processo de caracterização, pode-se afirmar que o provável produto de fusão é realmente um híbrido interespecífico, o qual contém, com grande probabilidade, todos os grupos de ligação das duas espécies.

#### 5.6.6. Produção de AG do híbrido

A estimativa da produção de AG foi feita através de dois critérios: a. presença ou ausência do halo de hidrólise em meio sólido contendo amido e b. acúmulo da enzima em meio líquido.

No caso do critério a, que é menos específico, pois sofre interferência da alfa-amilase, foi observado que o híbrido é intermediário às parentais e que os segregantes têm ampla variação, existindo alguns com halo de hidrólise consideravelmente maior que o parental *A. awamori* (Tabelas 65 e 66). Pelo outro critério, mais preciso, o híbrido não difere do parental *A. niger* e o segregante 46, com índice 2,0 de halo, não difere significativamente do híbrido (Tabela 70),

apesar de acumular 17% a mais.

A verificação da existência ou não de aumento significativo na produção em relação às parentais necessitaria, portanto, da avaliação de maior número de segregantes, o que dependeria de trabalhos posteriores.

## 6. Conclusões

Dos resultados obtidos com o presente trabalho, as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

- a. A segregação espontânea de conídios deficientes para prolina ou arginina e setorização apresentada pela linhagem de *A. awamori* NRRL 3112 e seus derivativos são fenômenos independentes que contribuem para a instabilidade da espécie. A instabilidade pode ser atribuída à duplicação parcial ou total do genoma.
- b. Ficou evidenciado pela auxanografia que o bloqueio metabólico dos segregantes espontâneos deficientes para prolina ou arginina encontra-se na passagem do ácido glutâmico para semialdeído  $\gamma$  glutâmico, na via biossintética da prolina.
- c. O método de enriquecimento por filtração permitiu um aumento de 12 vezes na frequência de isolamento de mutantes auxotróficos, em relação ao método de isolamento total.
- d. A existência do ciclo parassexual em *A. awamori* foi constatada por todos os critérios utilizados, quais sejam: diâmetro de conídios, efeito do Benlate, conteúdo de DNA/núcleo e recombinação entre marcas genéticas das linhagens parentais.
- e. A deficiência para prolina, constatada em *A. awamori*, deve ser resultado da mesma lesão genética, pois não houve complementação nos heterocários e diplóides intra-específicos.
- f. Através da análise dos segregantes dos cruzamentos intra-específicos de *A. awamori* foi evidenciada ligação entre os genes etb<sub>1</sub> gre<sub>1</sub> bwn<sub>1</sub>; mor<sub>1</sub> arg<sub>1</sub> arg<sub>2</sub> e leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub>. Como o gene pab<sub>1</sub> segregou independentemente, o número mínimo de 4 grupos de ligação pode ser proposto para a espécie.
- g. O cruzamento entre *A. awamori* e *A. niger* foi possível através da fusão de protoplastos e sua confirmação foi feita pelos mesmos critérios utilizados no cruzamento intra-específico.
- h. A classificação dos segregantes do cruzamento interespecífico permitiu evidenciar ligação entre os genes nic<sub>1</sub> olv<sub>2</sub> de *A. niger* e bwn<sub>1</sub> amy e pro de *A. awamori*.
- i. Alto grau de homologia cromossômica entre as 2 espécies é sugerido pela segre-

gação observada no híbrido interespecífico.

j. A solubilização do Benlate com acetona reduz a frequência de setorização em *A. awamori* provavelmente por inibição das linhagens segregantes.

k. Foi verificado que linhagens de *A. awamori*, com alta frequência de segregação espontânea para prolina, produzem significativamente menos AG.

## 7. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos principais, verificar a ocorrência do ciclo parassexual em *Aspergillus awamori*, testar a produção de amiloglicosidase dos derivativos, mutantes e diplóides obtidos e realizar o cruzamento interespecífico com *A. niger*.

Além desses, estudos foram desenvolvidos com a instabilidade apresentada por *A. awamori*. A linhagem NRRL 3112 segrega conídios pro e forma setores espontaneamente. Este comportamento não seria o esperado para um clone e sugere a existência de heterozigose para as características estudadas, a qual poderia estar contida numa duplicação parcial ou total de genoma.

Mutantes auxotróficos e morfológicos de *A. awamori* foram conseguidos utilizando-se os métodos de isolamento total e de enriquecimento por filtração. Este último mostrou frequências de isolamento 12 vezes maiores. Mutantes resistentes ao Brometo de Etídio também foram isolados, mas somente após indução com luz ultravioleta.

Os mutantes foram utilizados em cruzamentos que permitiram verificar a ocorrência do ciclo parassexual. Através da análise dos segregantes, pode ser evidenciada a ligação entre os genes etb<sub>1</sub>, gre<sub>1</sub>, bwn<sub>1</sub>; mor<sub>1</sub>, arg<sub>1</sub>, arg<sub>2</sub> e leu<sub>1</sub>, mor<sub>2</sub>. O gene pab<sub>1</sub> segregou independentemente e, assim, foi possível sugerir 4 como o número mínimo de grupos de ligação nessa espécie. Entre os critérios não genéticos utilizados na caracterização, o diâmetro de conídios e o tratamento com Benlate mostraram-se eficientes para separar haplóides de diplóides. O método de extração e quantificação de DNA por núcleo também foi adequado para esse fim.

Com relação à enzima, o primeiro passo foi averiguar se o método empregado estava medindo a atividade da amiloglicosidase, fato que foi confirmado fazendo o teste com o inibidor e a dextrina limite. Foi constatada uma relação inversamente proporcional entre a porcentagem de segregação de conídios pro e a produção de amiloglicosidase.

Só foi possível obter o cruzamento entre *A. awamori* e *A. niger* através de fusão de protoplastos. A frequência de formação de colônias prototróficas foi relativamente baixa, situando-se na faixa de 0,6%, possivelmente devido ao pequeno nú-

mero de protoplastos utilizados para a fusão e a um provável efeito tóxico diferencial do agente fusogênico utilizado. As colônias prototróficas isoladas inicialmente puderam ser classificadas como heterocarióticas. A partir destas, o produto de fusão híbrido foi obtido na forma de setores que exibiam complementação entre as marcas genéticas das parentais. Através da análise do híbrido, pode ser evidenciada ligação entre os genes nic<sub>1</sub>, olv<sub>2</sub>, bwn<sub>1</sub>, amy, pro. Houve distribuição ao acaso dos grupos de ligação, semelhante ao esperado para um diplóide intra-específico, sugerindo alto grau de homologia cromossômica entre as duas espécies.

Os mesmos critérios de caracterização utilizados com sucesso para separar linhagens haplóides de diplóides, nos cruzamentos intra-específicos, foram adotados e, também nesse caso, mostraram resultados satisfatórios.

## 8. SUMMARY

The present work with *Aspergillus awamori* was done aiming to study the following:

1. Occurrence of the parasexual cycle.
2. Occurrence of interspecific hybridization with *A. niger*.
3. Amyloglucosidase production of the parental and derived strains, including auxotrophic mutants, diploids and the interspecific hybrid.

During the first stage of the work, it was observed that the NRRL 3112 strain of *A. awamori* is unstable because it spontaneously segregates pro conidia (deficient for proline synthesis) and produces sectors. The last characteristic is also observed in pro derivatives and it was supposed that it is independent from pro conidia segregation. These characteristics are not expected from a clone and together with other evidences (Benlate segregation, differential susceptibility to acetone, variation in number of nuclei per conidia and conidial diameter), it was suggested that there is a partial or total duplication of the genome.

Auxotrophic and morphological mutants of *A. awamori* were induced by ultraviolet light and selected by using total isolation and filtration enrichment methods. An increase of 12 times in the mutant frequency was observed when the last method was employed. Ethidium bromide resistant mutants were also isolated only after ultraviolet induction.

Diploid strains were readily obtained and could easily be separated from haploid strains by conidia diameter, Benlate segregation and nuclear DNA content.

Segregation analysis indicated linkage between etb<sub>1</sub>, gre<sub>1</sub>, bwn<sub>1</sub>; mor<sub>1</sub>, arg<sub>1</sub>, arg<sub>2</sub> and leu<sub>1</sub>, mor<sub>2</sub>. Because pab<sub>1</sub> marker segregated independently from all others it was suggested at least 4 linkage groups for *A. awamori*.

Only heterokaryotic colonies were detected when *A. awamori* and *A. niger* protoplasts were fused and plated in selective medium. The low frequency (0,6%) and the heterokaryotic nature of the colonies could probably be attributed to: 1) low protoplasts number and 2) toxic effect to the fusogenic agent to *A. niger* proto-

plasts. Hybrid colonies were isolated after several transfers in selective medium. The hybrid nature of these colonies was established by the same criteria used in the intraspecies crossing. Segregation analysis indicated a high level of chromosomal homology between the 2 species and it was possible to suggest linkage between nic<sub>1</sub>, olv<sub>2</sub> genes of *niger* and bwn, amy, pro of *awamori*.

As it was evident from the use of limit dextrin and a specific inhibitor, glucoamylase is the main enzyme activity detected by the usual assay procedure. It has also been detected that high frequency of pro conidia in *A. awamori* is correlated with the low level of enzyme production.

## 9. Bibliografia

- ALIKHANIAN, S. I. e L. N. BORISOVA, 1961. Recombination in *Actinomyces aureofaciens*. *Journal of General Microbiology*, 26: 19-28.
- ALIKHANIAN, S. I.; S. Z. MINDLIN; S. U. GOLDAT e A. V. VLADIMIZOV, 1959. Genetics of organisms producing tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 81: 914.
- ANDERSON, M. R. e C. S. DEPPE, 1977. Selection for conditional lethals: a general negative selection system for *Schizophyllum commune*. *Genetical Research*, 29: 93-96.
- ANNÉ, J. e J. F. PEBERDY, 1975. Conditions for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol solutions. *Archives of Microbiology*, 105: 201-205.
- ANNÉ, J. e J. F. PEBERDY, 1976. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. *Journal of General Microbiology*: 92: 413-417.
- ANNÉ, J.; H. EYSEN; P. DE SOMER, 1976. Somatic hybridisation of *Penicillium roquefortii* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature*, 262: 719-721.
- AZEVEDO, J. L., 1971. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. England. 240 p. Ph. D. Thesis. University of Sheffield.
- AZEVEDO, J. L., 1972. O ciclo parassexual em fungos. *Revista de Microbiologia*, 3: 157-168.
- AZEVEDO, J. L., 1975. Altered instability due to genetic changes in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 26: 55-61.
- AZEVEDO, J. L., 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologia*, 2: 3-15.

- AZEVEDO, J. L. e J. A. ROPER, 1970. Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: successive and transposable genetic changes. *Genetical Research*, 16: 79-93.
- AZEVEDO, J. L.; E. P. SANT'ANA e R. BONATELLI Jr., 1977. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4 oxathin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 48: 163-172.
- BACHMANN, B. J. e D. M. BONNER, 1959. Protoplasts from *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 78: 550-556.
- BAINBRIDGE, B. W. e J. A. ROPER, 1966. Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*: 42: 417-424.
- BALL, C., 1971. Haploidization analysis in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of General Microbiology*, 66: 63-69.
- BALL, C., 1973. Improvement of Penicillin productivity in *Penicillium chrysogenum* by recombination. In: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN, Eds. *Genetics of Industrial microorganisms*, vol. II. Amsterdam, Elsevier Publishing co., p. 227-237.
- BALL, C. e J. L. AZEVEDO, 1976. Genetic instability in parasexual fungi. In: 2<sup>nd</sup> International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisma. New York, Academic Press, 243-251.
- BALL, C. e P. F. HAMLYN, 1978. The genetics of *Acremonium chrysogenum*. *Revista Brasileira de Genética*, 1: 83-96.
- 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.
- BALL, J.; E. BARTNIK; B. GORYLUK e N. J. PIENIAZEK, 1975. An easy way of obtaining *Aspergillus nidulans* haploids in the parasexual cycle using N-glycosyl polifungin. *Genetical Research*, 25: 249-252.

- BANKS, G. T.; F. BINNS e T. L. CUTCLIFFE, 1976. Recent developments in the production and industrial applications of amylolytic enzymes derived from filamentous fungi. *Progress in Industrial Microbiology*, 6: 95-139.
- BARMAN, T. E., 1969. *Enzyme Handbook*. Berlin Springer Verlag. Vol. 2. p. 564-565.
- BARTON, L. L.; D. R. LINEBACK e C. E. GEORGI, 1969. The influence of nitrogen and carbon sources on the production of glucoamylase by aspergilli. *Journal of Applied Microbiology*, 15 (3): 327-344.
- BEGGS, J. D., 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature*, 275: 104-109.
- BEKKER, Z. E.; E. I. BURTSEVA e E. A. DVADTSATOVA, 1980. Carbohydrates of the medium and the nature of ontogenesis in *Aspergillus awamori* in connection with glucoamylase biosynthesis. *Microbiology (Engl. Trasl. Mikrobiologiya)*, 49 (4): 460-5.
- BENDETSKII, K. M. e E. S. PAVLOVA, 1977. Assay of glucoamylase activity in amylolytic preparations. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 13 (4): 615-20.
- BERTOLDI, M. e C. E. CATEN, 1975. Isolation and haploidization of heterozygous diploid strain in a species of *Humicola* sp. *Journal of General Microbiology*, 91: 63-73.
- BIANCO, M.; S. O. P. COSTA; V. D. M. PACE; C. A. BUSKO; M. MELLY e M. BITTAR, 1982. Influência do transposon canamicina na instabilidade de protease em *Proteus mirabilis*. In: IXa. Reunião Anual de Genética de Microorganismos, Brasília, p. 26.
- BINDING, H., 1974. The isolation, regeneration and fusion of *Phycomyces* protoplasts. *Molecular and General Genetics*, 135: 273-276.

- BIRKETT, J. A. e J. A. ROPER, 1975. A temperature sensitive phenotype associated with the TVI-VII translocation. *Aspergillus News Letter*, 13: 7-8.
- BIRKETT, J. A. e J. A. ROPER, 1977. Chromosome aberrations in *Aspergillus nidulans*. In: SMITH, J. E. e J. A. PATEMAN, Ed. *Genetics and physiology of Aspergillus*. London, Academic Press, p. 293-303.
- BONATELLI Jr., R., 1977. Estabilidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba. 126 p. Tese de Mestrado. ESALQ/USP.
- BONATELLI Jr., R., 1978. Melhoramentos de *Aspergillus niger* para produção de ácido cítrico. *Ciência e Cultura, Simpósios II*: 123-127.
- BONATELLI Jr., R. e J. L. AZEVEDO, 1977. Effects of ethidium bromide in diploid and duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Experientia*, 33: 311-312.
- 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*, 6: 399-405.
- BONATELLI Jr., R.; G. U. VALENT; M. MASIERO; A. VIALTA e M. R. CALIL, 1984. Genetics of amyloglucosidase production in *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori*. In: *Japan-Brazil Symposium on Science and Technology*, 4. Rio de Janeiro. Vol. 2, p. 34-41.
- BONATELLI Jr., R.; G. U. VALENT; E. A. LUNA e W. GADELHA, 1985. Abnormal development of phialides in a strain of *Aspergillus niger*. *Experientia*, 41: 1598-1599.
- BONNER, D., 1947. Studies of the biosynthesis of penicillin. *Archives of Biochemistry*, 13: 1-25.
- BOS, C. J. e S. M. SLAKHORST, 1981. Isolation of protoplasts from *Aspergillus nidulans* conidiospores. *Canadian Journal of Microbiology*, 27: 408-416.

- BRADSHAW, R. E.; L. KANG-UP e J. F. PEBERDY, 1983. Aspects of genetic interaction in hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. *Journal of General Microbiology*, 129: 3525-3533.
- BROWN, J. P., 1971. Susceptibility of the cell walls of some yeasts to lysis by enzymes of *Helix pomatia*. *Canadian Journal of Microbiology*, 17: 205-208.
- BURR, K. W.; J. A. ROPER e J. RELTON, 1982. Modification of chromosome instability in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 128: 2899-2907.
- BUXTON, E. W., 1956. Heterocaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Journal of General Microbiology*, 15: 133-139.
- BUXTON, E. W., 1962. Parasexual recombination in the banana-milt *Fusarium*. *Transactions of the British Mycological Society*, 5: 274-279.
- 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: 658-669.
- CALAM, C. T.; L. B. DAGLISH e W. S. GAITSKELL, 1973. Hybridisation experiments with *Penicillium patulum* and *Fusarium moniliforme*. In: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN, Eds. *Genetics of Industrial Microorganisms*, vol. II. Amsterdam, Elsevier Publishing Co., p. 265-282.
- CARRAU, J. L.; J. L. AZEVEDO; P. SUDBERY e D. CAMPBELL, 1982. Methods for recovering fusion products among oenological strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Revista Brasileira de Genética*, V(1): 221-226.
- CASE, B. L. e J. A. ROPER, 1981. Mitotic process which restores genome balance in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 124: 9-16.
- CATCHESIDE, D. G., 1954. Isolation of nutritional mutants of *Neurospora crassa* by filtration enrichment. *Journal of General Microbiology*, 11: 34-36.

- CATEN, C. E. e J. L. JINKS, 1966. Heterokaryosis: Its significance in mild homotalic ascomycetes and fungi imperfecti. *Transactions of the British Mycological Society*, 49: 81-93.
- CHANG, L. T. e C. A. TERRY, 1973. Intergenic complementation of glucoamylase and citric acid production in two species of *Aspergillus*. *Applied Microbiology*, 25: 890-895.
- CHANG, L. T. e R. W. TUVESON, 1975. An unstable strain of *Aspergillus foetidus* segregating proline auxotrophs. *Applied Microbiology*, 30: 140-148.
- CHANG, L. T.; C. TERRY e R. W. TUVESON, 1974. The influence of heterokaryotic conidia on the selective recovery of somatic diploids in *Aspergillus niger*. *Mycologia*, 66: 67-72.
- CHRISTENSEN, B. E., 1979. Somatic hybridization in *Saccharomyces cerevisiae*. Analysis of products of protoplasts fusion. *Carlsberg Research Communication*, 44: 225-227.
- CONSTABEL, F. e K. N. KAO, 1974. Agglutination and fusion of plant protoplasts by polyethyleneglicol. *Canadian Journal of Botany*, 52: 1603-1606.
- COOKE, P.; J. A. ROPER e W. WATMOUGH, 1970. Trypan blue-induced deletions in duplications strains of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 226: 276-277.
- COX, E. C.; G. E. DEGNEN e M. L. SCHEPPE, 1972. Mutator gene studies in *Escherichia coli*: the mut-s gene. *Genetics*, 72: 551-567.
- CUNHA, P. R., 1969. A study of aspects of heterokaryosis in *Aspergillus nidulans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 68: 28-31.
- DAS, A. e P. ROY, 1978. Improved production of citric acid by a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 24: 622-625.

- DAVIS, R. H., 1966. Mechanisms of inheritance. 2 - Heterokaryosis. In: AINSWORTH, G. C. e A. S. SUSSMAN ed. *The Fungi*. New York, Academic Press, vol. 2 805 p.
- DAWSON, G. W. P. e P. F. SMITH-KEARY, 1963. Episomic control of mutation in *Salmonella typhimurium*. *Heredity*, 18: 1-20.
- DAY, P. R. e G. E. ANDERSON, 1961. Two linkage groups in *Coprinus lagopus*. *Genetical Research*, 2: 414-423.
- DEMAIN, A. L., 1973. The marriage of genetics and industrial microbiology after a long engagement, a bright future. In: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN, Eds I. *Genetics of Industrial Microorganisms*, vol. I. Amsterdam, Elsevier Publishing Co., p. 13-32.
- DEUTCH, C. E. e J. M. PARRY, 1974. Sphaeroplasts formation in yeast during the transition from exponential phase to stationary phase. *Journal of General Microbiology*, 80: 259-268.
- DE VRIES, O. M. H. e J. G. H. WESSELS, 1973. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by combined action of purified  $\alpha$ -1,3-glucanase and chitinase derived from *Trichoderma viride*. *Journal of General Microbiology*, 76: 319-330.
- DIATEWA, M.; I. VIARD e A. J. C. STAHL, 1981. Yeast protoplasts gained with various preparations of *Helix pomatia* digestive juice. *Biochimie*, 63: 67-69.
- DIXON, M. e E. C. WEBB, 1962. *Enzymes*. 2<sup>nd</sup> ed., London Ed. Longmans, 193 p.
- DOOIJEWAAARD, A. M. P.; J. H. SIESTMA e J. T. M. WOUTERS, 1973. Formation and regeneration of *Geotrichum candidum* protoplasts. *Journal of General Microbiology*, 74: 205-209.
- EDDY, A. A. e D. H. WILLIAMSON, 1957. A method of isolating protoplasts from yeast. *Nature*, 179: 1252-1253.

- EDDY, A. A. e D. H. WILLIAMSON, 1959. Formation of aberrant cell walls and of spores by the growing yeast protoplast. *Nature*, 183: 1101-1104.
- EGEL, R., 1976. The genetic instabilities of the mating-type locus in fission yeast. *Molecular General Genetics*, 145: 281-286.
- ELANDER, R. P., 1966. Potential applications of concepts of microbial genetics in antibiotic producing microorganisms. Induced mutations and their utilization, Abh. Deutch Akad. Wiss., Berlin. *Apud*: SERMONTI, G., 1969. Genetics of antibiotic-producing microorganisms. John Wiley & Sons, Ltd., London. 389 p.
- EMERSON, S. e M. R. EMERSON, 1958. Production, reproduction and reversion of protoplasts - like structures in the osmotic strain of *Neurospora crassa*. *Proceedings of National Academy of Science, USA*, 44: 668-671.
- FAITH, W. T.; C. E. NEUBECK e E. T. REESE, 1971. Production and application of enzymes. *Advances in Biochemistry Engineering*, 1: 77-111.
- FANTINI, A. A., 1962. Genetics and antibiotic production of *Emericellopsis* species. *Genetics*, 47: 161-177.
- FANTINI, A. A. e L. S. OLIVE, 1960. Sexual recombination in a homothallic, antibiotic producing fungus. *Science*, 132: 1670.
- FAWCETT, P. A.; P. B. LODER; M. J. DUNCAN; T. J. BEESLEY e E. P. ABRAHAM, 1973. Formation and properties of protoplasts from antibiotic producing strains of *Cephalosporium acremonium*. *Journal of General Microbiology*, 79: 293-309.
- FERENCZY, L. e A. MARÁZ, 1977. Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 268: 524-525.
- FERENCZY, L.; F. KEVEI e J. ZSOLT, 1974. Fusion of fungal protoplasts. *Nature*, 238: 793-794.

- FERENCZY, L.; F. KEVEI e M. SZEGEDI, 1975. High-frequency fusion of fungal protoplasts. *Experientia*, 31: 1028-1030.
- FERENCZY, L.; M. SZEGEDI e F. KEVEI, 1977. Interspecific protoplasts fusion and complementation in *Aspergilli*. *Experientia*, 33: 184-186.
- FINCH, P. e P. A. LEONARD, 1978. Comparative studies on glucoamylases isolated from a strain of *Aspergillus*. *Starch*, 30: 341-345.
- FINKELMAN, M. A. J.; J. E. ZAJIC e A. VARDANIS, 1980. New method of producing protoplasts of *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 39: 923-925.
- FLEMING, I. D. e B. A. STONE, 1965. Fractionation of *Aspergillus niger* amylo-glycosidase. *The Biochemical Journal*, 97: 13.
- FOURY, F. e A. GOFFEAU, 1973. Combination of 2-deoxyglucose and snail-gut enzyme treatments for preparing sphaeroplasts of *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of General Microbiology*, 75: 227-229.
- FRIES, N., 1947. Experiments with different methods of isolating physiological mutants of filamentous fungi. *Nature*, 159: 199.
- FUNGARO, M. H. P., 1984. Caracterização Genética e Dados Citológicos em *Aspergillus niger* van Tieghem e *Aspergillus awamori* Nakazawa. Piracicaba. 134 p. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo.
- FUKUDA, H. e A. KIMURA, 1980. Transfer of mitochondria into protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* by miniprotoplasts fusion. *FEBS Letters*, 113: 58-60.
- GABRIELLI, A. C. e J. L. AZEVEDO, 1980. A strain of *Aspergillus nidulans* producing a high frequency of disomics. *Transactions of the British Mycological Society*, 75: 15-20.
- GARDNER, J. F.; L. V. JAMES e S. D. RUBBO, 1956. Production of citric acid by mutants of *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, 14: 228-237.

- GENTHNER, F. J. e P. T. BORGIA, 1978 Spheroplasts fusion and heterokaryon formation in *Mucor racemosus*. *Journal of Bacteriology*, 134: 349-352.
- GODFREY, O.; L. FORD e M. L. B. HUBER, 1978. Interspecies matings of *Streptomyces fradiae* with *Streptomyces bikiniensis* mediated by conventional and protoplast fusion techniques. *Canadian Journal of Microbiology*, 24: 994-997.
- GOLDSTEIN, A. e J. S. SMOOT, 1955. A strain of *Escherichia coli* with an unusually high rate of auxotrophic mutation. *Journal of Bacteriology*, 70: 588-595.
- GREER, H. e G. R. FINK, 1979. Unstable transpositions of *his 4* in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 76: 4006-4010.
- GILES, K. W. e A. MYERS, 1965. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 206: 93.
- HAAS, F. L.; T. A. PUGLISI; A. J. MOSES e J. LEIN, 1956. Heterokaryosis as a cause of culture rundown in *Penicillium*. *Applied Microbiology*, 4: 187-195.
- HAMLIN, P. F.; R. E. BRADSHAW; G. M. MELLON; C. M. SANTIAGO; J. M. WILSON e J. F. PEBERDY, 1981. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 3: 321-325.
- HASTIE, A. C., 1970. Benlate - induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature* 226: 77.
- HAYASHIDA, S., 1975. Selective submerged productions of three types of glucoamylases by a black-koji mold. *Agricultural and Biological Chemistry*, 39(11): 2093-2099.
- HAYASHIDA, S.; S. KUNISAKI; M. NAKAO e P. Q. FLOR, 1982. Evidence of raw starch affinity site on *Aspergillus awamori* glucoamylase I. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46: 83-89.
- HEAGY, F. C. e J. A. ROPER, 1952. Deoxyribonucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus* conidia. *Nature*, 170: 713-714.

- HINNEN, A.; J. B. HICKS e G. R. FINK, 1978. Transformation of yeast. *Proceedings of National Academy of Sciences, U.S.A.*, 75: 1929-1933.
- HOLLIDAY, R., 1961. Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genetical Research*, 2: 231-249.
- HOPWOOD, D. A. e M. J. MERRICK, 1977. Genetics of antibiotic production. *Bacteriological Review*, 41: 595-635.
- HOUSSET, P.; M. NAGY e J. SCHWENCKE, 1975. Protoplasts of *Schizosaccharomyces pombe*: an improved method for their preparation and the study of their guanine uptake. *Journal of General Microbiology*, 90: 260-264.
- HULTMAN, E., 1959. Rapid method for determination of aldoses in body fluids. *Nature (London)*, 183: 108-9.
- IKEDA, Y.; K. NAKAMUKA; K. UCHIDA e G. ISHITANI, 1957. Two attempts upon improving an industrial strain of *Aspergillus oryzae* through somatic recombination and polyploidization. *Journal of General and Applied Microbiology*, 3: 93-101.
- 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, G.; Y. IKEDA e K. SAKAGUCHI, 1956. Hereditary variation and genetic recombination in Koji-moulds (*Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*). VI. Genetic recombination in heterozygous diploids. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2: 401-430.
- ILCZUK, Z., 1968. Genetics of citric acid producing strains of *Aspergillus niger*. I - Citric acid synthesis by morphological mutants induced with UV. *Acta Microbiologica Polonica*, 17: 331-336.
- ILCZUK, Z., 1971. Genetyczne aspekty selekcji szczepów *Aspergillus niger* przydatnych w procesie syntezy kwasu cytrynowego. *Przemysł Fermentacyjny i Rolny*, 7: 15-19.

- JÁRAI, M., 1961. Genetic recombination in *Streptomyces aureofaciens*. *Acad. Sci. Hung.*, 8: 73. Apud: SERMONTI, G., 1969. Genetics of antibiotic-producing microorganisms. John Wiley & Sons Ltd., London. 389 p.
- JINKS, J. L., 1966. Extranuclear inheritance. In: AINSWORTH, G. C. e A. S. SUSSMAN, Ed. *The Fungi - An advanced treatise*. New York, Academic Press, vol. 2, p. 619-660.
- KÄFER, E., 1958. An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 9: 105-145.
- KÄFER, E., 1960. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 186: 619-620.
- KÄFER, E., 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46: 1581-1609.
- KAPPAS, A. e S. G. GEORGOPOLOUS, 1974. Interference of griseofulvin with the segregation of chromosome at mitosis in diploid *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 119: 334-335.
- KAPPAS, A. e S. G. GEORGOPOLOUS, 1975. Fungicides causing mitotic segregation in *Aspergillus* diploids. *Mutation Research*, 5: 29.
- KAPPAS, A.; S. G. GEORGOPOLOUS e A. C. HASTIE, 1973. Genetic instability of *Aspergillus nidulans* diploids induced by benzimidazole and thiophanate fungicides. *Mutation Research*, 21: 190-191.
- KERR, R. W.; F. C. CLEVELAND e W. J. KATZBECK, 1951. The action of amylo-glucosidase on amylose and amylopectin. *Journal of the American Chemical Society*, 73: 3916-3921.
- KEVEI, F. e J. F. PEBERDY, 1977. Interspecies hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplast. *Journal of General Microbiology*, 102: 255-262.

- KEVEI, F. e J. F. PEBERDY, 1979. Induced segregation in interspecific hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. *Molecular and General Genetics*, 170: 213-218.
- KVESITADZE, G. I.; N. N. VORONTSOVA; O. N. GONCHAROVA; V. V. KORIDZE; E. A. DVADTSATOVA e L. L. KVACHADZE, 1981. Exogenous glucoamylase of molds of the genus *Aspergillus*. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 17: 569-574.
- LE MENSE, E. H.; J. CORMAN; J. M. VAN LANEN e A. F. LANGLYKKE, 1947. Production of mold amylases in submerged culture. *Journal of Bacteriology*, 54: 149-159.
- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with p-fluorophenylalanine. *Nature*, 190: 744.
- LHOAS, F., 1967. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in *Aspergillus niger*. *Genetical Research*, 10: 45-61.
- LHOAS, F., 1968. Growth rate and haploidization of *Aspergillus niger* on medium containing p-fluorophenylalanine. *Genetical Research*, 12: 305-315.
- LIEBER, M. M., 1976a. The effects of temperature on genetic instability in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 34: 93-122.
- LIEBER, M. M., 1976b. The genetic instability and mutagenic interaction of chromosomal duplications present together in haploid strains of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 37: 33-66.
- LINEBACK, D. R., 1968. The carbohydrate-polypeptide linkages in a fungal glucoamylase. *Carbohydrate Research*, 7: 106-108.
- LOCKWOOD, L. B., 1975. Organic acid production. In: SMITH, J. E. e D. R. BERRY, Eds. *The Filamentous Fungi*, vol. I. Edward Arnold Ltd., London, p. 140-157.

- LOPEZ-BELMONTE, F.; I. G. ACHA e J. R. VILLANUEVA, 1966. Observations on the protoplasts of *Fusarium culmorum* and on their fusion. *Journal of General Microbiology*, 45: 127-134.
- MacDONALD, K. D., 1966. Differences in diploids synthesized between the same parental strains of *Penicillium chrysogenum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 32: 431-441.
- MacDONALD, K. D., 1968. The selection of auxotrophs of *Penicillium chrysogenum* with nystatin. *Genetical Research*, 11: 327-330.
- MacDONALD, K. D.; J. M. HUTCHINSON e W. A. GILLET, 1963. Isolation of auxotrophs mutants of *Penicillium chrysogenum* and their penicillin yields. *Journal of General Microbiology*, 33: 365-374.
- MAJERFELD, I. H. e J. A. ROPER, 1978. The effects of coumarin on the frequency of deletions in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics*, 159: 203-206.
- MANJUNATH, P. e M. R. R. RAO, 1980. Immunochemical relationship between glucoamylases I and II of *Aspergillus niger*. *Journal of Bioscience*, 2: 163-169.
- MANN, K. e D. MECKE, 1980. Isolation and characterization of nuclei and nuclear membrane from *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts. *FEBS Letters*, 122: 95-99.
- MĀRAZ, A. e J. SUBIK, 1981. Transmission and recombination of mitochondrial genes in *Saccharomyces cerevisiae* after protoplast fusion. *Molecular and General Genetics*, 181: 131-133.
- MAYNE, R. Y.; J. W. BENNET e J. TALLANT, 1971. Instability of an aflatoxin-producing strain of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, 63: 644-646.
- McCLINTOCK, B., 1951. Chromosomes organization and gene expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 16: 13-47.

- McCLINTOCK, B., 1953. Induction of instability at selected loci in maize. *Genetics*, 38: 579-599.
- McCLINTOCK, B., 1956. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 21: 197-216.
- McCLINTOCK, B., 1965. The control of gene action in maize. *Brookhaven Symposia on Biology*, 18: 162-182.
- 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 Engineering*, 4. Japan, p. 211-229.
- MENEZES, E. M., 1974. Análise genética de variantes deteriorados e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba. 114 p. Tese de Mestrado. ESALQ/USP.
- MENEZES, E. M. e J. L. AZEVEDO, 1978. Reversion in variants from a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics*, 164: 255-258.
- MERRICK, M. J., 1975. The inheritance of penicillin titre in crosses between lines of *Aspergillus nidulans* selected for increased productivity. *Journal of General Microbiology*, 91: 287-294.
- MESSIAS, C. L., 1977. Parassexualidade e produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus*, Link. Piracicaba. 75 p. Tese de Mestrado. ESALQ/USP.
- MESSIAS, C. L., 1979. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorocaba. 73 p. Tese de Doutorado. ESALQ/USP.
- MESSIAS, C. L. e J. L. AZEVEDO, 1980. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 75: 473-477.

- MIAH, M. N. N. e S. UEDA, 1977a. Multiplicity of glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. Part I. *Starch*, 29: 191-196.
- MIAH, M. N. N. e S. UEDA, 1977b. Multiplicity of glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. Part II. *Starch*, 29: 235-239.
- MOHN, G. e F. E. WÜRGLER, 1972. Mutator genes in different species. *Humangenetik*, 16: 48-58.
- 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. MORSI, 1979c. Glucoamylase. Part III. Fractionation and kinetics of purified glucoamylase. *Egyptian Journal of Microbiology*, 12: 100-114.
- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregation induced by *p*-fluorophenylalanine. *Aspergillus News Letter*, 2: 10.
- MORRIS, N. R., 1978. Preparation of large molecular weight from the fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 106: 387-389.
- MUSÍLKOVÁ, M. e Z. FENCL, 1968. Some factors affecting the formation of protoplasts in *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica*, 13: 235-239.
- MUSÍLKOVÁ, M. e Z. FENCL, 1970. Isolation of auxotrophic mutants of *Aspergillus niger* by ethylmethanesulphonate treatment. *Folia Microbiologica*, 15: 34-39.
- MUSÍLKOVÁ, M.; Z. FENCL e O. SEICHERTOVÁ, 1969. Release of *Aspergillus niger* protoplasts by *Penicillium purpurogenum* enzymes. *Folia Microbiologica*, 14: 47-50.

- NAKANO, H.; T. TAJIRI; Y. KOBAYASHI e S. UEDA, 1981. Some properties of amylase inhibitor A produced by *Streptomyces* sp nº 280. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45: 1053-1060.
- NEVALAINEN, K. M. H. e E. T. PALVA, 1979. Improvement of amyloglucosidase production of *Aspergillus awamori* by mutagenic treatments. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 29: 390-395.
- NEWMEYER, D., 1965. Somatic instability in *Neurospora* resulting from a pericentric inversion. *Genetics*, 52: 462-463.
- NEWMEYER, D. e C. W. TAYLOR, 1967. A pericentric inversion in *Neurospora* with unstable duplication progeny. *Genetics*, 56: 771-791.
- NEWMEYER, D. e D. R. GALEAZZI, 1977. The instability of *Neurospora* duplication DP (IL → IR) H4250, and its genetic control. *Genetics*, 85: 461-8.
- NEWMEYER, D. e D. R. GALEAZZI, 1978. A meiotic U.V.-sensitive mutant that causes deletion of duplications in *Neurospora*. *Genetics*, 89: 245-70.
- NEWMEYER, D.; A. SCHROEDER e D. R. GALEAZZI, 1978. An apparent connection between histidine, recombination and repair in *Neurospora*. *Genetics*, 89: 271-280.
- NEWTON, S. M. C.; M. BIANCO e S. O. P. COSTA, 1982. Mutaç o em alta frequência do gene da C.P.S. Possível participa o de um transposon em *Proteus mirabilis*. *Ciência e Cultura*, Suplemento, 7: 709.
- NGA, B. H. e J. A. ROPER, 1968. Quantitative introchromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 58: 193-209.
- NGA, B. H. e J. A. ROPER, 1969. A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 14: 63-70.
- NGA, B. H.; SIEW-POH TEO e G. LIM, 1975. The occurrence in nature of a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, 88: 364-366.

- NIFFINEGGER E SOUZA, D. R., 1979. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba. 244 p. Dissertação de Mestrado. ESALQ/USP.
- NOESCH, J.; H. J. TREICHLER e M. LIERSCH, 1973. The biosynthesis of cephalosporin C. In: VANEK, Z., Z. HOSTALEK e J. CUDLIN, Eds. *Genetics of Industrial Microorganisms*, vol. II. Amsterdam, Elsevier Publishing Co., p. 309-334.
- OLIVEIRA, F. M., 1982. Análise genética de setores melhorados de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba. 101 p. Tese de Doutorado. ESALP/USP.
- PAES DE BARROS, J., 1977. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (eidam) Winter. Piracicaba. 8= p. Tese de Mestrado. ESALQ/USP.
- PALMER, H. M. e J. A. ROPER, 1970. Induced deletions in duplication strains of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 11: 20.
- PAPA, K. E., 1973. The parasexual cycle in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 65: 1201-1205.
- PAPA, K. E., 1976. Linkage groups in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 70: 159-165.
- PAPA, K. E., 1978. The parasexual cycle in *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, 70: 766-773.
- PAPA, K. E., 1979. Genetics of *Aspergillus flavus*: complementation and mapping of aflatoxin mutants. *Genetical Research Cambridge*, 34: 1-9.
- PARAG, Y. e J. A. ROPER, 1975. Genetic control of chromosome instability in *Aspergillus nidulans* as a mean for gene amplification in eukaryotic microorganism. *Molecular and General Genetics*, 140: 275-287.
- PARK, Y. K. e R. S. PAPINI, 1970. Produção de xarope de glicose do amido de mandioca pelo método enzima-enzima. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 1. 13-16.
- PARK, Y. K. e D. C. DE 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 amyloglucosidase producing mutant from *Aspergillus awamori*. *Journal of Fermentation Technology*, 55: 193-195.
- PARRY, E. M. e B. S. COX, 1970. The tolerance of aneuploidy in yeast. *Genetical Research*, Cambridge, 16: 333-340.
- PARTRIDGE, B. M. e J. A. DREWE, 1974. *Candida* protoplasts and their ultrastructure. *Sabouradia*, 12: 166-178.
- PAZUR, J. H. e T. ANDO, 1959. The action of an amyloglucosidase of *Aspergillus niger* on starch and malto-oligosaccharides. *The Journal of Biological Chemistry*, 234: 1966-1970.
- PAZUR, J. H. e K. KLEPPE, 1962. The hydrolysis of L-D.glucosides by amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. *The Journal of Biological Chemistry*, 237: 1002-1005.
- PEBERDY, J. F., 1979a. Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. *Annual Review of Microbiology*, 33: 21-39.
- PEBERDY, J. F., 1979b. New approaches to gene transfer in fungi. In: *Genetics of Industrial Microorganisms*. SEBEK, O. K. e A. I. LASKIN, ed. American Society for Microbiology. Washington D.C. P. 192-196.
- PEBERDY, J. F., 1980. Protoplast fusion - A tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. *Enzyme Microbiology and Technology*, 2: 23-29.
- PEBERDY, J. F.; H. EYSEN e J. ANNE, 1977. Interspecific hybridization between *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium cyaneo-fulvum* following protoplast fusion. *Molecular and General Genetics*, 157: 281-284.
- PEBERDY, J. F.; C. E. BUCKLEY; D. C. DALTRY e P. M. MOORE, 1976. Factor affecting protoplasts release in some filamentous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 67: 23-26.

- PETERSON, P. A., 1960. The pale green mutable system in maize. *Genetics*, 45: 115.
- PERZOW, B. M.; I. D. CUNNINGHAM; E. C. CHIARELLO e E. MASCOLL, 1973. The effect of some physical and nutritional factors on saccharifying enzyme production by several species of *Aspergillus*. *Can. Inst. Food Ect. Technol. J.*, 6(1): 26-28.
- PIMENTEL GOMES F., 1984. Curso de Estatística Experimental. Livraria Nobel S.A., São Paulo. 430 p.
- PIZZIRANI-KLEINER e J. L. AZEVEDO, 1986. Characterization and genetical analysis of an *Aspergillus nidulans* strain that produces multinucleate conidia. *Transactions of the British Mycological Society*, 86: 123-130.
- POLSINELLI, M.; A. ALBERTINI; G. CASSANI e O. CIFERRI, 1963. Relation of biochemical mutations to actinomycin synthesis in *Streptomyces antibioticus*. *Journal of General Microbiology*, 33: 238-246.
- PONTECORVO, G., 1952. Non-random distribution of multiple mitotic crossing-over among nuclei of heterozygous diploids *Aspergillus*. *Nature*, 170: 204-205.
- PONTECORVO, G., 1956. The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology*, 10: 393-400.
- PONTECORVO, G. e J. A. ROPER, 1952. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 6: viii.
- PONTECORVO, G. e E. KAFER, 1958. Genetic analysis based on mitotic recombination. *Advances in Genetics*, 9: 71-104.
- 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. HEMMONDS; K. D. McDONALD e W. J. BUFTON, 1953b. The genetic of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5: 141-238.
- PONTECORVO, G.; E. TARR GLOOR e E. FORBES, 1954. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Genetics*, 52: 226-237.
- POULTER, R.; K. JEFFERY; M. J. HUBBARD; M. G. SHEPHERD e P. A. SULLIVAN, 1981. Parasexual genetic analysis of *Candida albicans* by spheroplast fusion. *Journal of Bacteriology*, 146(3): 833-840.
- RAMANESH, N.; K. R. SREEKANTIAH e V. S. MURTHY, 1982. Studies of two forms of amyloglucosidase of *Aspergillus niger* Van Tieghen. *Starch*, 34: 346-351.
- RAPER, K. B. e D. I. FENNELL, 1965. The genus *Aspergillus*. Baltimore, Williams & Wilkens Co. 686 p.
- RAZZAQUE, A. e S. UEDA, 1978. Glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation Technology*, 56: 296-302.
- REUSSER, F.; H. J. KOEPESELL e G. M. SAVAGE, 1961. Degeneration of *Streptomyces niveus* with repeated transfers. *Applied Microbiology*, 9: 342-345.
- RHOADES, M. M., 1941. The genetic control of mutability in maize. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 9: 138-144.
- RIBA, G. e RAVELOJOANA, A. M., 1984. The parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumoso roseus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 30 (7): 922-926.

- ROBERTS, M. D. e A. UPSHALL, 1981. Naturally occurring conditional lethal isolates of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*, 10: 343-347.
- ROPER, J. A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8: 14-15.
- ROPER, J. A., 1966. The parasexual cycle. In: AINSWORTH, G. C. e A. S. SUSSMAN. *The fungi*. New York, Academic Press. Vol. II, p. 589-617.
- ROPER, J. A. e R. H. PRITCHARD, 1955. Recovery of complementary products of mitotic crossing-over. *Nature*, 175: 639.
- ROPER, J. A. e B. H. NGA, 1969. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*; the production of hypodiploid and hypohaploid nuclei. *Genetical Research*, 14: 127-136.
- ROSATO, Y. B. e J. L. AZEVEDO, 1978. Acriflavine and ethyl methanesulfonate-induced mutants of *Aspergillus nidulans* strains with chromosome duplications. *Revista Brasileira de Genética* 1, 4: 247-262.
- 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: 307-314.
- SAVELEV, A. N. e L. M. FIRSOV, 1982. Carboxyl groups in the active site of glucoamylase from *Aspergillus awamori*. *Biokhimiya*, 47(10): 1618-1620.
- SCARAZZATTI - FRAU, M. E., 1985. Resistência ao Brometo de Etídio em *Aspergillus nidulans*. Campinas. 113 p. Tese de Mestrado. UNICAMP.
- SCARAZZATTI, M. E.; R. BONATELLI Jr. e J. L. AZEVEDO, 1979. Resistance to Ethidium Bromide in *Aspergillus nidulans*. *Experientia (Basel)*, 35: 307-308.

- SERMONTI, G., 1969. *Genetics of antibiotic-producing microorganisms*. John Wiley & Sons Ltd., London, 398 p.
- SEXTON, C. E. e J. A. ROPER, 1984. Spontaneous duplications and transpositions of a large chromosome segment in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General microbiology*, 130: 583-95.
- SHAFFER, B.; I. BREARLEY; R. LITTLEWOOD e G. R. FINK, 1971. A stable aneuploid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 67: 483-495.
- SHAHIN, M. M., 1971. Preparation of protoplasts from stationary phase cells of *Schizosaccharomyces pombe*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 13: 714-719.
- SHCHERBAKOVA, E. Ya. e M. N. RESVAYA, 1978. Formation of diploids in *Aspergillus niger* and their biosynthesis of citric acid. *Mikrobiologiya*, 46: 1064-1069.
- SIETSMA, J. H. e W. R. de BOER, 1973. Formation and regeneration of protoplasts from *Pythium* PRL 2142. *Journal of General Microbiology*, 74: 211-217.
- SIETSMA, J. H.; D. E. EVELEIGH; R. H. HASKINS e J. F. T. SPENCER, 1967. "Protoplast" from *Pythium* sp. PRL 2142. *Canadian Journal of Botany*, 13: 1701-1704.
- SILVEIRA, W. D. e J. L. AZEVEDO, 1984. Isolation of auxotrophic mutants of *Metarhizium anisopliae* by the filtration enrichment technique. *Revista Brasileira de Genética VII*, 1: 1-8.
- SILVEIRA, W. D. e J. L. AZEVEDO, 1987. Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarhizium anisopliae*, *Enzyme Microbiology Technology*, 9: 149-152.
- SINKAR, V. P. e N. F. LEWIS, 1982. Glucoamylase production by a newly isolated strain of *Aspergillus niger*. *J. Food Protection*, 45(7): 580-589.
- SKAAR, P. D., 1956. A binary mutability system in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 42: 245-249.

- 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.
- SMITH-KEARY, P. F., 1958. An unstable mutation in *Salmonella typhimurium*. *Nature*, 181: 1672.
- SMITH, J. E. e J. A. PATEMAN, Eds., 1977. *Genetics and Physiology of Aspergillus*. London, Academic Press, Inc. Ltd. 522 p.
- STEPHEN, E. R. e A. NASIM, 1981. Production of protoplasts in different yeasts by mutanase. *Canadian Journal of Microbiology*, 27: 550-553.
- STERN, C., 1936. Somatic crossing-over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 21: 625-730.
- 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: 55-59.
- SVOBODA, A., 1978. Fusion of yeast protoplasts induced by polyethylene glycol. *Journal of General Microbiology*, 109: 169-175.
- 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: 1183-1194.
- TAVARES, F. C. A. e J. L. AZEVEDO, 1974. Genetical improvement of *Aspergillus niger* for citric acid production. 2<sup>nd</sup> *International Symposium in Genetics of Industrial Microorganisms*, 2: 86 (Abstract).
- TINLINE, R. D., 1962. *Cochliobolus sativus*. V. Heterocaryosis and parasexuality. *Canadian Journal of Botany*, 40: 425-437.

- TINLINE, R. D. e B. H. McNEILL, 1969. Parasexuality in plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 7: 147-170.
- TREFFERS, H. P.; V. SPINELLI e N. O. BELSER, 1954. A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 40: 1064-1071.
- UEDA, S., 1980. Raw starch digestion by mold glucoamylases and debranching enzymes. In: MARSHALL, J. J., Ed. *Mechanisms of saccharide polymerization and depolymerization*. Miami, Academic Press, p. 55-72.
- UEDA, S. e Y. KOBA, 1973. Some properties of amylase inhibitor produced by *Streptomyces* sp nº 280. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37: 2025-2030.
- UPSHALL, A., 1981. Naturally occurring diploid isolates of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 122: 7-10.
- 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: 413-418.
- UMBUZEIRO VALENT, G., 1985. Isolamento e análise genética de mutantes com alteração na produção de amiloglicosidase em *Aspergillus niger*. Campinas. 107 p. Tese de Mestrado. UNICAMP.
- VAN TUYLL, J. M., 1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. *Netherland Mededelingen Landbouwhogeshool Wageningen*, 136 p.
- VON BORSTEL, R. C.; S. K. QUAH; C. M. STEINBERG; F. FLURY e D. J. C. GOTTLIEB, 1973. Mutants of yeast with enhanced spontaneous mutation rates. *Genetics*, Supplement, 73: 141-151.
- WEBER, H.; W. FORSTER; H. BERG e H. E. JACOB, 1981. Parasexual hybridization of yeasts by electric field stimulated fusion of protoplasts. *Current Genetics*, 4: 165.

- WEISS, R. L. e C. A. LEE, 1980. Isolation and characterization of *Neurospora crassa* mutants impaired in feedback control of ornithine synthesis. *Journal of Bacteriology*, 141: 1305-1311.
- WHELAN, W. L. e P. T. MAGEE, 1981. Natural heterozygosity in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 145: 896-903.
- WHELAN, W. L. e D. R. SOLL, 1982. Mitotic recombination in *Candida albicans*: Recessive lethal alleles linked to a gene required for methionine biosynthesis. *Molecular General Genetics*, 187: 477-485.
- WOODWARD, D. O.; J. R. DEZEEUW e A. M. SRB, 1954. The separation and isolation of particular biochemical mutants of *Neurospora* by differential germination of conidia followed by filtration and selective plating. *Proceedings of National Academy of Science*, 40: 192-200.
- YAMAMURA, M.; Y. THERANISHI; A. TANAKA e S. FUKUI, 1975. Preparation of protoplasts of hydrocarbon - utilizing yeast cells and their respiratory activities. *Agricultural and Biological Chemistry*, 39: 13-20.
- YAMASHITA, I. e S. FUKUI, 1984. Isolation of glucoamylase non-producing mutants in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48: 131-135.
- YAMASHITA, K.; H. FUKUDA; K. MARATA e A. KIMURA, 1981. Transfer of mitochondria of *Hansenula wingei* into protoplast of *Saccharomyces cerevisiae* by mini-protoplast fusion. *FEBS Letters*, 132: 305-307.
- YUILL, E., 1950. The numbers of nuclei in conidia of *Aspergilli*. *Transactions of the British Mycological Society*, 33: 324-331.
- YUILL, J. L., 1953. Culture study of an unstable strain of *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, 8: a.
- ZIMMERMANN, V. e J. VIENKEN, 1982. Electric field-induced cell to cell fusion. *The Journal of Membrane Biology*, 67: 165-182.

ZUCCHI, T. M. A. D., 1975. Instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Ribeirão Preto. 96 p. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina/USP.

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

## A P E N D I C E

TABELA A 01 - Características morfológicas, auxotróficas e de resistência ou sensibilidade ao Brometo de Etídio dos segregantes espontâneos isolados do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub>//arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sub>1</sub><sup>r</sup> gre<sub>1</sub> .

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS*	AUXOTROFIA		<u>etb</u> R / S	MORFOLOGIA		DIÂMETRO DE CONÍDIO(µm)	MC + BENLATE**
		<u>pab<sub>1</sub></u>	<u>leu<sub>1</sub></u>		<u>mor<sub>1</sub></u>	<u>mor<sub>2</sub></u>		
1	bwn	+	+	S	+	+	6,02	PS
2	bwn	+	+	S	+	+	4,83	AS
3	bwn	+	+	S	+	+	6,09	PS
4	bwn	-	+	S	-	+	4,89	AS
5	bwn	+	+	S	+	+	6,15	PS
6	bwn	+	+	S	-	+	4,84	AS
7	bwn	+	+	S	+	+	4,87	AS
8	bwn	+	+	S	+	+	4,93	AS
9	bwn	+	+	S	+	+	4,87	AS
10	bwn	+	+	S	+	+	6,06	PS
11	bwn	+	+	S	+	+	6,16	PS
12	bwn	+	+	S	+	+	5,95	PS
13	bwn	-	+	S	-	+	4,92	AS
14	bwn	+	+	S	+	+	6,13	PS
15	bwn	+	+	S	+	+	6,15	PS
16	bwn	+	+	S	+	+	6,19	PS
17	bwn	-	+	S	-	+	4,85	AS
18	bwn	-	+	S	+	+	4,87	AS
19	bwn	+	+	S	+	+	6,11	PS
20	bwn	-	+	S	+	+	5,03	AS
21	bwn	+	+	S	-	+	4,84	AS
22	bwn	+	-	S	+	-	4,95	AS
23	bwn	-	-	S	+	-	4,80	AS
24	bwn	-	-	S	+	-	4,84	AS
25	bwn	+	-	S	-	-	4,87	AS

\* Para os símbolos, consultar a Figura 6 .

\*\* PS = presença de setor e AS = ausência de setor .

TABELA A 02 - Características morfológicas, auxotróficas e de resistência ou sensibilidade ao Brometo de Etídio dos segregantes isolados do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub>//arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sup>R</sup> gre<sub>1</sub> .

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS*	AUXOTROFIA		etb R / S	MORFOLOGIA		DIÂMETRO DE CONÍDIO (µm)
		<u>pab<sub>1</sub></u>	<u>leu<sub>1</sub></u>		<u>mor<sub>1</sub></u>	<u>mor<sub>2</sub></u>	
1	gre	+	+	R	+	+	5,01
2	gre	+	+	R	-	+	4,91
3	gre	-	+	R	-	+	4,84
4	gre	+	+	R	+	+	5,00
5	gre	+	+	R	+	+	4,98
6	gre	-	+	R	-	+	5,03
7	gre	+	+	R	+	+	5,03
8	gre	-	+	R	-	+	4,96
9	gre	+	+	R	+	+	4,98
10	gre	-	+	R	+	+	4,96
11	gre	+	+	R	+	+	4,89
12	gre	+	+	R	-	+	5,04
13	gre	-	+	R	+	+	5,04
14	gre	+	+	R	-	+	5,00
15	gre	+	+	R	+	+	4,97
16	gre	-	+	R	-	+	5,00
17	gre	+	+	R	-	+	5,00
18	gre	+	+	R	-	+	5,06
19	gre	-	+	R	+	+	5,05
20	gre	+	+	R	-	+	5,04
21	gre	+	+	R	+	+	4,91
22	gre	-	+	R	+	+	5,01
23	gre	-	+	R	+	+	5,03

\* Para os símbolos, consultar a Figura 6 .

TABELA A 03 - Características morfológicas, auxotróficas e de resistência ou sensibilidade ao Brometo de Etídio dos segregantes isolados do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub> // arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub>etb<sub>1</sub><sup>R</sup> gre<sub>1</sub> .

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS*	AUXOTROFIA		etb R / S	MORFOLOGIA		DIÂMETRO DE CONÍDIO(µm)
		pab <sub>1</sub>	leu <sub>1</sub>		mor <sub>1</sub>	mor <sub>2</sub>	
24	gre	-	-	R	+	-	5,12
25	gre	-	-	R	-	-	4,97
26	gre	-	-	R	+	-	4,88
27	gre	-	-	R	+	-	5,09
28	gre	+	-	R	+	-	5,18
29	gre	-	-	R	-	-	5,16
30	gre	-	-	R	-	-	5,22
31	gre	+	-	R	-	-	5,05
32	bwn	+	-	S	-	-	4,95
33	bwn	-	-	S	-	-	5,04
34	bwn	-	-	S	+	-	5,01
35	bwn	+	-	S	+	-	4,93
36	bwn	-	-	S	-	-	4,93
37	bwn	+	-	S	+	-	4,81
38	bwn	-	-	S	-	-	5,24
39	bwn	-	-	S	-	-	5,09
40	bwn	-	-	S	-	-	5,13
41	bwn	+	-	S	+	-	4,69
42	bwn	+	-	S	-	-	4,92
43	bwn	+	-	S	+	-	5,05
44	bwn	+	-	S	+	-	5,07
45	bwn	-	-	S	+	-	5,11
46	bwn	-	+	S	+	+	5,02

\* Para os símbolos, consultar a Figura 6 .

TABELA A 04 - Características morfológicas, auxotróficas e de resistência ou sensibilidade ao Brometo de Etídio dos segregantes isolados do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub>//arg/pro pab<sub>1</sub> mor<sub>1</sub> etb<sup>R</sup> gre<sub>1</sub> .

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS*	AUXOTROFIA		etb R / S	MORFOLOGIA		DIÂMETRO DE CONÍDIO(µm)
		<u>pab<sub>1</sub></u>	<u>leu<sub>1</sub></u>		<u>mor<sub>1</sub></u>	<u>mor<sub>2</sub></u>	
47	bwn	-	+	S	-	+	5,21
48	bwn	-	+	S	-	+	5,26
49	bwn	-	+	S	+	+	5,06
50	bwn	+	+	S	+	+	5,10
51	bwn	+	+	S	-	+	5,12
52	bwn	-	+	S	-	+	5,19
53	bwn	+	+	S	+	+	5,01
54	bwn	-	+	S	-	+	5,04
55	bwn	+	+	S	+	+	4,93
56	bwn	+	+	S	-	+	4,84
57	bwn	+	+	S	-	+	5,26
58	bwn	+	+	S	-	+	4,97
59	bwn	-	+	S	-	+	5,01
60	bwn	+	+	S	+	+	4,80
61	bwn	+	+	S	+	+	5,07
62	bwn	-	+	S	+	+	5,07
63	bwn	+	+	S	-	+	4,76
64	bwn	-	+	S	-	+	4,83
65	bwn	+	+	S	-	+	4,97
66	bwn	-	+	S	+	+	4,98
67	bwn	+	+	S	-	+	5,06
68	bwn	-	+	S	+	+	4,94.
69	bwn	+	+	S	-	+	5,02

\* Para os símbolos, consultar a Figura 6 .

TABELA A 05 - Características morfológicas e auxotróficas dos segregantes isolados do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub> // arg<sub>1</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>S</sup> gre<sub>1</sub> .

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS*	AUXOTROFIA		MORFOLOGIA		DIÂMETRO DE CONÍDIO(µm)	CONIDIÓFOROS SECUNDÁRIOS**
		<u>arg<sub>1</sub></u>	<u>leu<sub>1</sub></u>	<u>mor<sub>1</sub></u>	<u>mor<sub>2</sub></u>		
1	gre	+	+	+	+	4,95	P
2	gre	+	+	+	+	4,98	P
3	gre	+	+	+	+	5,03	P
4	gre	+	+	+	+	4,88	P
5	gre	+	+	+	+	5,01	P
6	gre	+	+	+	+	4,90	P
7	gre	+	+	+	+	4,92	P
8	gre	+	+	+	+	5,05	P
9	gre	+	+	+	+	5,07	P
10	gre	+	+	+	+	4,89	P
11	gre	+	+	+	+	5,00	P
12	gre	+	+	+	+	4,99	P
13	gre	+	+	+	+	4,89	P
14	gre	+	+	+	+	4,97	P
15	gre	+	+	+	+	5,03	P
16	gre	+	+	+	+	4,87	P
17	gre	+	+	+	+	5,09	P
18	gre	+	+	+	+	5,00	P
19	gre	+	+	+	+	4,96	P
20	gre	+	+	+	+	4,80	P
21	gre	+	+	+	+	5,11	P
22	gre	+	+	+	+	5,04	P
23	gre	+	+	+	+	4,97	P
24	gre	+	+	+	+	4,95	P
25	gre	+	+	+	+	4,87	P
26	gre	+	+	+	+	4,97	P

\* Para os símbolos, consultar a Figura 6 .

\*\* P = presença de conidióforos secundários ,

A = ausência de conidióforos secundários .

TABELA A 06 - Características morfológicas e auxotróficas dos segregantes isolados do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub>//arg<sub>1</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>S</sup> gre<sub>1</sub> .

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS*	AUXOTROFIA		MORFOLOGIA		DIÂMETRO DE CONÍDIO(µm)	CONIDIÓFOROS SECUNDÁRIOS**
		<u>arg<sub>1</sub></u>	<u>leu<sub>1</sub></u>	<u>mor<sub>1</sub></u>	<u>mor<sub>2</sub></u>		
27	gre	+	-	/	-	4,97	P
28	gre	+	-	/	-	5,03	P
29	gre	+	-	/	-	5,10	P
30	gre	+	-	/	-	4,88	P
31	gre	+	-	/	-	5,03	P
32	gre	+	-	/	-	5,00	P
33	gre	+	-	/	-	4,96	P
34	gre	-	-	/	-	4,91	P
35	gre	+	-	/	-	4,94	P
36	bwn	+	-	/	-	5,02	A
37	bwn	-	-	/	-	4,95	A
38	bwn	+	-	/	-	4,94	A
39	bwn	+	-	/	-	5,10	A
40	bwn	+	-	/	-	4,97	A
41	bwn	+	-	/	-	5,00	A
42	bwn	+	-	/	-	5,00	A
43	bwn	+	-	/	-	4,98	A
44	bwn	+	-	/	-	4,83	A
45	bwn	+	-	/	-	4,86	A
46	bwn	-	-	/	-	4,84	A
47	bwn	+	-	/	-	4,91	A
48	bwn	-	-	/	-	5,06	A
49	bwn	+	-	/	-	5,05	A
50	bwn	+	-	/	-	4,99	A
51	bwn	+	-	/	-	4,98	A
52	bwn	-	+	/	+	5,04	A

\* Para os símbolos, consultar a Figura 6 .

\*\* P = presença de conidióforos secundários ,

A = ausência de conidióforos secundários .

/ = não foi possível classificar .

TABELA A 07 - Características morfológicas e auxotróficas dos segregantes isolados do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub>//arg<sub>1</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>S</sup> gre<sub>1</sub> .

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS*	AUXOTROFIA		MORFOLOGIA		DIÂMETRO DE CONÍDIO(µm)	CONIDIÓFOROS SECUNDÁRIOS**
		<u>arg<sub>1</sub></u>	<u>leu<sub>1</sub></u>	<u>mor<sub>1</sub></u>	<u>mor<sub>2</sub></u>		
53	bwn	+	+	+	+	5,00	A
54	bwn	+	+	+	+	5,09	A
55	bwn	+	+	/	+	5,12	A
56	bwn	+	+	+	+	5,14	A
57	bwn	+	+	+	+	4,92	A
58	bwn	+	+	+	+	4,89	A
59	bwn	+	+	+	+	4,96	A
60	bwn	+	+	+	+	5,01	A
61	bwn	+	+	/	+	4,95	A
62	bwn	+	+	+	+	5,03	A
63	bwn	+	+	+	+	4,93	A
64	bwn	+	+	+	+	4,98	A
65	bwn	+	+	+	+	5,07	A
66	bwn	+	+	+	+	4,95	A
67	bwn	+	+	+	+	5,00	A
68	bwn	+	+	+	+	4,81	A
69	bwn	+	+	+	+	5,12	A
70	bwn	+	+	+	+	5,11	A
71	bwn	+	+	+	+	5,08	A
72	bwn	+	+	/	+	4,99	A
73	bwn	+	+	+	+	4,75	A
74	bwn	+	+	+	+	5,19	A
75	bwn	+	+	/	+	4,96	A
76	bwn	+	+	+	+	4,79	A
77	bwn	+	+	+	+	4,79	A
78	bwn	+	+	+	+	5,07	A

\* Para os símbolos, consultar a Figura 6 .

\*\* P = presença de conidióforos secundários ,

A = ausência de conidióforos secundários .

/ = não foi possível classificar .

TABELA A 08 - Características morfológicas e auxotróficas dos segregantes isolados do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub>//arg<sub>2</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>S</sup> gre<sub>1</sub> .

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS*	AUXOTROFIA		MORFOLOGIA		DIÂMETRO DE CONÍDIO(µm)	CONIDIÓFOROS SECUNDÁRIOS**
		<u>arg<sub>2</sub></u>	<u>leu<sub>1</sub></u>	<u>mor<sub>1</sub></u>	<u>mor<sub>2</sub></u>		
1	gre	+	+	+	+	4,78	P
2	gre	-	+	-	+	4,91	P
3	gre	+	+	+	+	4,80	P
4	gre	+	+	+	+	4,96	P
5	gre	+	+	+	+	4,92	P
6	gre	+	+	+	+	5,01	P
7	gre	-	+	-	+	4,88	P
8	gre	-	+	-	+	4,99	P
9	gre	-	+	-	+	4,95	P
10	gre	+	+	+	+	5,02	P
11	gre	-	+	-	+	5,07	P
12	gre	+	+	+	+	4,79	P
13	gre	+	+	+	+	4,84	P
14	gre	+	+	+	+	4,93	P
15	gre	+	+	+	+	4,94	P
16	gre	-	+	-	+	4,88	P
17	gre	-	+	-	+	5,13	P
18	gre	+	+	+	+	4,83	P
19	gre	+	+	+	+	4,97	P
20	gre	+	+	+	+	4,89	P
21	gre	+	+	+	+	5,06	P
22	gre	+	+	+	+	5,05	P
23	gre	+	+	+	+	5,05	P
24	gre	+	+	+	+	4,93	P
25	gre	-	+	-	+	4,89	P
26	gre	+	+	+	+	4,80	P
27	gre	+	+	+	+	4,95	P

\* Para os símbolos, consultar a Figura 6 .

\*\* P = presença de conidióforos secundários ,

A = ausência de conidióforos secundários .

TABELA A 09 - Características morfológicas e auxotróficas dos segregantes isolados do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub>//arg<sub>2</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>S</sup> gre<sub>1</sub> .

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS*	AUXOTROFIA		MORFOLOGIA		DIÂMETRO DE CONÍDIO(µm)	CONIDIÓFOROS SECUNDÁRIOS**
		<u>arg<sub>2</sub></u>	<u>leu<sub>2</sub></u>	<u>mor<sub>1</sub></u>	<u>mor<sub>2</sub></u>		
28	gre	-	+	-	+	4,96	P
29	gre	-	-	/	-	4,89	P
30	gre	-	-	/	-	5,08	P
31	gre	+	-	/	-	4,79	P
32	gre	+	-	/	-	5,00	P
33	gre	+	-	/	-	4,98	P
34	gre	+	-	/	-	4,87	P
35	bwn	-	-	/	-	4,81	A
36	bwn	-	-	/	-	4,90	A
37	bwn	+	-	/	-	4,97	A
38	bwn	-	-	/	-	4,86	A
39	bwn	+	-	/	-	4,93	A
40	bwn	+	-	/	-	5,02	A
41	bwn	+	-	/	-	5,04	A
42	bwn	-	-	/	-	4,79	A
43	bwn	+	-	/	-	4,97	A
44	bwn	+	-	/	-	4,93	A
45	bwn	-	-	/	-	4,89	A
46	bwn	-	-	/	-	5,08	A
47	bwn	-	-	/	-	4,91	A
48	bwn	+	-	/	-	4,97	A
49	bwn	-	+	/	+	4,82	A
50	bwn	-	+	/	+	5,12	A
51	bwn	-	+	/	+	4,92	A
52	bwn	-	+	/	+	4,95	A
53	bwn	-	+	-	+	4,90	A
54	bwn	-	+	-	+	4,99	A

\* Para os símbolos, consultar a Figura 6 .

\*\* P = presença de conidióforos secundários ,

A = ausência de conidióforos secundários .

/ = não foi possível classificar .

TABELA A 10 - Características morfológicas, auxotróficas dos segregantes isolados do diplóide arg/pro leu<sub>1</sub> mor<sub>2</sub> etb<sup>S</sup> bwn<sub>1</sub>//arg<sub>2</sub> pro mor<sub>1</sub> etb<sup>S</sup> gre<sub>1</sub> .

SEGREGANTE Nº	COLORAÇÃO CONÍDIOS*	AUXOTROFIA		MORFOLOGIA		DIÂMETRO DE CONÍDIO(µm)	CONIDIÓFOROS SECUNDÁRIOS**
		<u>arg<sub>1</sub></u>	<u>leu<sub>2</sub></u>	<u>mor<sub>1</sub></u>	<u>mor<sub>2</sub></u>		
55	bwn	-	+	-	+	5,04	A
56	bwn	+	+	+	+	5,11	A
57	bwn	+	+	+	+	4,90	A
58	bwn	+	+	+	+	4,99	A
59	bwn	+	+	+	+	4,87	A
60	bwn	+	+	+	+	5,05	A
61	bwn	+	+	+	+	5,01	A
62	bwn	+	+	+	+	4,83	A
63	bwn	+	+	+	+	4,97	A
64	bwn	+	+	+	+	5,01	A
65	bwn	+	+	+	+	4,96	A
66	bwn	+	+	+	+	4,99	A
67	bwn	+	+	+	+	4,98	A
68	bwn	+	+	+	+	4,84	A
69	bwn	+	+	+	+	4,92	A
70	bwn	+	+	+	+	4,92	A
71	bwn	+	+	+	+	4,98	A
72	bwn	+	+	+	+	5,03	A
73	bwn	+	+	+	+	5,16	A
74	bwn	+	+	+	+	4,89	A
75	bwn	+	+	+	+	4,98	A
76	bwn	+	+	+	+	4,96	A
77	bwn	+	+	+	+	5,02	A
78	bwn	+	+	+	+	5,04	A
79	bwn	+	+	+	+	4,99	A
80	bwn	+	+	+	+	5,00	A
81	bwn	+	+	+	+	5,00	A

\* Para os símbolos, consultar a Figura 6 .

\*\* P = presença de conidióforos secundários ,

A = ausência de conidióforos secundários .