

IVANHOÉ RODRIGUES BARACHO

Eng. Agrônomo - Magister Scientiae - Professor
Assistente de Genética do Instituto Central de
Biologia da Universidade de Brasília

Contribuição ao Estudo da Sexualidade em
Aspergillus nidulans (EIDAM) WINTER

Tese apresentada à Universidade de Campinas
para obtenção do título de Doutor

CAMPINAS — Estado de S. Paulo

1969



AGRADECIMENTOS

O autor deseja apresentar seus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para realização d^este trabalho. E de maneira especial quer agradecer:

Ao Dr. João Lúcio de Azevedo, Professor de Disciplina da Cadeira nº 19, Citologia e Genética, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", e responsável pelo Sector de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética da Universidade de São Paulo, pela orientação, estímulo e criticismo.

Ao Prof. F.G. Brieger, DD. Coordenador Geral dos Institutos da Universidade de Campinas, que orientou este trabalho, em sua fase final, em virtude de viagem do Prof. João Lúcio de Azevedo ao exterior, também pela orientação, estímulo e criticismo.

Ao Professor Wladimir Lobato Paraense, DD. Coordenador do Instituto Central de Biologia da Universidade de Brasília, pela leitura do texto e sugestões, bem como pelas facilidades concedidas.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2 - <u>REVISÃO DA LITERATURA</u>	3
2.1 - Formação de cleistotécios	3
2.1.1 - Cleistotécios em <u>Aspergillus</u>	3
2.1.2 - Cleistotécios em <u>A. nidulans</u>	5
2.1.3 - Estudos genéticos sôbre produção de cleistotécios em <u>A. nidulans</u>	6
2.2 - Sexualidade do micélio	9
2.2.1 - Homotalismo e Heterotalismo em <u>Aspergillus</u> ..	9
2.2.2 - Homotalismo e Heterotalismo em <u>A. nidulans</u> ..	10
3 - <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	12
3.1 - Símbolos usados	12
3.2 - Linhagens usadas	13
3.3 - Meios de cultura e soluções usadas	17
3.3.1 - Meio mínimo líquido	17
3.3.2 - Meio mínimo sólido	17
3.3.3 - Meio completo líquido	17
3.3.4 - Meio completo sólido	18
3.3.5 - Ácido nucleico de levedura hidrolisado	18
3.3.6 - Solução de vitaminas	19
3.3.7 - Solução salina	19
3.3.8 - Solução de tween	19
3.3.9 - Suplementos adicionados ao meio mínimo	19
3.4 - Métodos usados	20
3.4.1 - Técnica geral de semeadura e incubação	20
3.4.2 - Verificação da produção de cleistotécios	20
3.4.3 - Cruzamentos	22
3.4.4 - Análise de cleistotécios	23
3.4.5 - Teste de heterocário	23
3.4.6 - Auxanografia	27

	<u>Página</u>
4 - <u>RESULTADOS</u>	25
4.1 - Produção de cleistotécios	25
4.1.1 - Linhagem <u>y; nic 2, ribo 5</u>	26
4.1.2 - Linhagem <u>an 1, bi 1</u>	27
4.1.3 - Linhagem <u>pro 1, paba 6, y; w 3</u>	28
4.1.4 - Linhagem <u>y, ad 14; co</u>	29
4.1.5 - Linhagem <u>su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1;</u> <u>Acr 1; lys 5; cha</u>	29
4.1.6 - Linhagem <u>y; w 2; s 12; pyro 4</u>	30
4.2 - Verificação de efeitos citoplasmáticos	33
4.2.1 - Transferência de citoplasma	33
4.2.2 - Análise de cleistotécios	35
4.2.3 - Verificação de efeitos de substâncias difundidas no meio de cultura	36
4.2.4 - Outros experimentos	37
4.3 - Análise estatística	38
5 - <u>DISCUSSÃO</u>	46
6 - <u>RESUMO E CONCLUSÕES</u>	55
7 - <u>SUMMARY</u>	58
8 - <u>BIBLIOGRAFIA CITADA</u>	59

1 - INTRODUÇÃO

O estudo da sexualidade, em fungos, que é bastante complexo, desempenha um papel de importância na pesquisa genética. Os fungos apresentam diversos sistemas reprodutivos sexuais, e, do ponto de vista da Genética, é importante saber como são esses sistemas e que controles genéticos neles atuam.

De uma maneira geral os fungos, com exceção dos Deuteromicetos, apresentam um ciclo biológico em que se processa a união dos gametas ou de seus equivalentes. Esse ciclo sexual que é conhecido em alguns fungos, e, em outros, se supõe existir, abrange, tal como em outras plantas, dois processos distintos: a plasmogamia e a cariogamia.

Em alguns casos a cariogamia ocorre nas células que resultam da plasmogamia. Noutros casos, após a plasmogamia, ocorre uma seqüência de gerações celulares binucleadas, com núcleos de sexos opostos, de onde se origina uma célula especial, onde a cariogamia vai se processar.

Os esporos sexuais surgem, portanto, dos mais diversos processos de fecundação, e os elementos sexuais que interferem, nesses processos, podem estar no mesmo micélio ou em micélios separados, e podem apresentar ou não diferenciação morfológica.

A sexualidade do micélio, descoberta por BLAKESLEE (1904), é sem dúvida, parte importante do processo. A esse respeito BLAKESLEE dividiu os fungos em homotáticos, aqueles com micélios bissexuais e heterotáticos, aqueles com micélios unissexuais, e criou os símbolos + (mais) e - (menos) para indicar a sexualidade dos micélios.

Depois dessa descoberta o problema da sexualidade dos micélios cresceu em complexidade, e descobriram-se

tipos diversos de homotalismo e heterotalismo.

O estudo da sexualidade, em fungos, atingiu assim uma complexidade maior. E a investigação da determinação do sexo e do processo de desenvolvimento sexual, nos fungos, ampliou-se, nos objetivos da Genética.

O presente trabalho teve por finalidade estudar, geneticamente, alguns aspectos da formação de cleistotécios, no fungo filamentoso Aspergillus nidulans (Eidam) Winter. Sob o ponto de vista genético os corpos de frutificação desse Ascomiceto têm sido objeto de preocupação de alguns autores. Entretanto, apesar dos trabalhos de MAHONEY e WILKIE (1958, 1962), de ARLETT (1960), de CLUTTERBUCK (1963), BAINBRIDGE (1964), CROFT (1966) e BARACHO (1967, 1968), pouco se sabe sobre o fenômeno de produção de cleistotécio pelo A. nidulans. O A. nidulans apresenta a esse respeito um comportamento complexo. Fungo homotálico ele é capaz de completar seu ciclo sexual sem cariogamia entre núcleos de diferentes origens. Mas a produção de cleistotécio apresenta uma certa variação. Tem-se mostrado irregular e incerta. As observações sobre produção de cleistotécios em A. nidulans vieram mostrar que, enquanto algumas linhagens são puramente conidiais, outras produzem cleistotécios regularmente e ainda outros podem permanecer produzindo somente conídios durante uma série de culturas e, de repente, começar a produzir cleistotécios.

A que se deve esse comportamento? Que fatores genéticos estão aí envolvidos? Há fatores citoplasmáticos interferindo nesse processo? O presente trabalho visou ao estudo dessas questões. Contudo, não é mais do que uma ligeira contribuição para solução de um problema que se apresenta bastante complexo.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

Na revisão da literatura há dois pontos principais a serem considerados: A formação de cleistotécios e a sexualidade dos micélios.

2.1 - FORMAÇÃO DE CLEISTOTÉCIOS

2.1.1 - CLEISTOTÉCIOS EM Aspergillus

De BARY (1854) foi o primeiro a se referir a um estágio ascógeno em fungos do gênero Aspergillus. Em seu clássico trabalho, êle demonstrou claramente que o Eurotium herbariorum (Wiggers) Link não era senão cleistotécios produzidos pelo Aspergillus glaucus.

Desde 1883 vêm sendo descritos estágios ascógenos para todos os membros do grupo A. glaucus, com exceção de um, para todos os membros da série A. fischeri do grupo A. fumigatus, e para muitas espécies do grupo A. nidulans.

Hoje, sabe-se que também produzem cleistotécios, algumas espécies do grupo A. ornatus, A. cremeus, e A. ochraceus. (RAPER e FENNELL, 1965).

No gênero Aspergillus, o processo sexual se desenvolve pela produção de anterídio e de ascogônios, morfológicamente diferenciados. Em vários casos o anterídio pode não estar presente e, às vezes, mesmo presente êle não aparenta fundir-se com o ascogônio, dando uma idéia de inatividade, no processo de fertilização.

Os cleistotécios, em seu aspecto exterior, diferem bastante de um grupo para o outro. No grupo A. glaucus êles são pequenos, e amarelos, e não apresentam envoltório. No grupo A. nidulans, êles são púrpuros escuros, e completamente envolvidos em células denominadas "células de hülle".

Na série A. fischeri êles variam de branco a creme e se desenvolvem dentro de micélios cotonosos, cujos fragmentos permanecem ligados a êles, na maturidade. No grupo A. cremeus os cleistotécios, de início, se assemelham aos da série A. fischeri, mas, depois, na maturidade, passam a apresentar certas diferenças peculiares. Em A. ornatus e A. citrisporus êles são purpuros, na maturidade, e são rodeados por uma capa livre de muitas hifas ramificadas. Em A. alliaceus, cleistotécios múltiplos se desenvolvem dentro de corpos de paredes escuras e endurecidas, semelhantes a esclerócios.

Alguns autores procuraram estudar, em detalhes o início e o desenvolvimento de cleistotécios, no gênero Aspergillus.

DANGEARD (1907), estudou detalhadamente o início e o desenvolvimento de ascocarpos, em fungos do grupo A. glaucus, descreveu e ilustrou o ciclo vital do A. fischeri, e também descreveu e ilustrou o desenvolvimento de ascocarpos, dentro de esclerócios de uma linhagem identificada, como A. flavus.

FRAZER e CHAMBERS (1907), DALE (1909), GUPTA (1951) e MOREAU e MOREAU (1953) também estudaram, em detalhes o início e o desenvolvimento de cleistotécios em membros do grupo A. glaucus.

OLIVE (1944), descreveu e ilustrou estágios do ciclo vital do A. fischeri.

FENNELL e WARCUP (1959) descobriram que em A. alliaceus, cleistotécios múltiplos se desenvolviam dentro de corpos de paredes endurecidas e escuras, semelhantes a esclerócios.

2.1.2 - CLEISTOTÉCIOS EM A. nidulans

No que diz respeito à formação de cleistotécios, em A. nidulans a única descrição detalhada é a de EIDAM (1883). DANGEARD (1907) e BENJAMIN (1955) estudando a formação de cleistotécios em A. nidulans acharam impossível determinar o método de iniciação de ascocarpos, nesse fungo.

POTECORVO, ROPER, HEMMONS, MACDONALD e BUFTON (1953), fizeram uma descrição do ciclo vital do A. nidulans, a qual vem servindo de base aos estudos genéticos desse fungo. Segundo êsses autores, o A. nidulans apresenta um ciclo sexual que se realiza concomitantemente com o ciclo vegetativo. A germinação de um esporo vegetativo haplóide (conídio), dá origem a um micélio constituído por células multinucleadas. Algumas dessas células se diferenciam (células podais) e delas emergem os conidióforos. Êstes terminam por uma vesícula globosa e multinucleada da superfície da qual saem os esterigmas primários. Por sua vez cada esterigma primário vai dar origem a dois ou mais esterigmas secundários e cada um desses esterigmas secundários produz, então, uma cadeia de conídios uninucleados. Tanto os esterigmas primários como os secundários são também uninucleados. E todos os conídios de uma cadeia, tendo seus núcleos derivados do núcleo do esterigma, possuem apenas uma espécie de núcleo. Os cleistotécios maduros surgem depois de 8 a 10 dias de incubação da cultura a 37°C. Êles são redondos, têm coloração escura, e contêm, no seu interior, cerca de 10^5 ascos. No interior de cada asco estão os ascosporos em número de 8. Os ascosporos são binucleados e têm coloração avermelhada. Êles surgem de um processo cariogâmico, com formação do zigoto e posterior divisão meiótica, que produz quatro células haplóides. Cada uma dessas células, por sua vez, sofre divisão mitótica e disso resulta a formação de 8 células dentro de cada asco.

Posteriormente ELLIOTT (1960) estudou a formação de ascos em linhagem haplóide e linhagens diplóides de A. nidulans.

Sexo
Homos-
gálico!

2.1.3 - ESTUDOS GENÉTICOS SOBRE PRODUÇÃO DE CLEISTOTÉCIOS EM *A. nidulans*.

Tem sido observado em *A. nidulans* uma certa variação na produção de cleistotécios. SMITH (1957) assinalou que ocasionalmente aparecem linhagens puramente conidiais ou que podem permanecer assim durante uma série de culturas e, de repente, começar a produzir cleistotécios. Esse comportamento do *A. nidulans* deve estar, na dependência de algum mecanismo genético. Mas até o momento são poucos os trabalhos buscando esclarecer esse fenômeno.

HENRARD (1934) estudando a sexualidade desse fungo, teve oportunidade de observar que linhagens que não formavam cleistotécios, em certo meio de cultura, puderam formar em outro meio, que êle considerou mais favorável. Êle também constatou que ligeiras diferenças do meio de cultura, influíam na formação de cleistotécios. Segundo êle, essas ligeiras diferenças poderiam influir para que os cleistotécios aparecessem mais cedo ou mais tarde e em menor ou maior número.

JINKS (1954) notou que depois de algumas transferências, por meio de conídio, a formação de cleistotécio ia se tornando progressivamente para, até que depois de certo número de transferências nenhum cleistotécio era produzido, e que êsse estado não-cleistotecial permanecia por mais de um ano. Quando se usava a propagação por meio de ascósporos, a formação de cleistotécio ia aumentando até atingir o nível da cultura normal, mas havia um decréscimo na produção de conídios.

MAHONEY e WILKIE (1958) observaram que linhagens selvagens segregavam linhagens cleistoteciais e não-cleistoteciais e que a freqüência de colônias não-cleistoteciais era mais alta a 37° do que a 25°C. Verificaram também que a linhagem assexual, que denominaram linhagem alba, apresentava

uma certa taxa de reversão para formas cleistoteciais. Estudando o fenômeno do ponto de vista genético, tais autores consideraram que o fator que atuava, nesse caso, não estava diretamente associado com o núcleo da linhagem cleistotecial mas com o seu citoplasma.

ARLETT (1960) assinalou, apoiado em outros autores, que a produção de cleistotécios pelo A. nidulans era irregular e incerta, e que havia linhagens puramente conidiais e linhagens regularmente sexuais, e ainda outras que só davam formas imperfeitas, durante uma série de culturas, mas que, de repente, produziam abundantes cleistotécios. Aplicando pressão de seleção para modificar a densidade de cleistotécios, não conseguiu, através de propagação por conídio diminuir a produção, e considerou não ser possível estabelecer desse modo, a assexualidade. Cruzando uma linhagem estéril, deficiente em arginina, com uma linhagem fértil, deficiente em ácido p-aminobenzóico, verificou que o grau de esterilidade variou na descendência, proveniente de conídios, e concluiu que a expressão do gene mutante responsável pela esterilidade, na linhagem deficiente, em arginina, era capaz de ser modificada pelo citoplasma.

MAHONEY e WILKIE (1962) desenvolvendo os estudos sobre 4 linhagens selvagens que segregavam o mutante esportâneo e não-cleistotecial alba, concluíram que a frequência de alba era controlada por um gene f. Como esse mutante alba apresentava uma taxa de reversão para formas cleistoteciais e a análise desse mutante demonstrava, claramente, uma herança não mendeliana, sugeriram que a produção de cleistotécio poderia depender de unidades ou partículas citoplasmáticas interagindo com o gene f. A perda dessas partículas determinaria o aparecimento do mutante alba estável, enquanto um número baixo de partículas, produziria os mutantes alba capazes de reverter às formas cleistoteciais, e essas formas cleistoteciais somente seriam possíveis quando o número de partículas estivesse acima de determinado limite.

Em outra interpretação êsses autores consideraram que essa herança citoplasmática poderia ser explicada também por um ciclo de reações, no qual a ação heterocatalítica de cada membro do ciclo, permitisse a reprodução de cada um deles, num sistema pseudo-autocatalítico. A perda de uma unidade constituinte poderia causar a quebra do sistema e isso refletiria na produção do mutante alba.

CLUTTERBUCK, em 1963 (em trabalho não publicado, citado por BAINBRIDGE, 1964) observou que, em meio completo, ao qual não fôsse adicionado suplementarmente arginina grandes cleistotécios se desenvolviam na junção de colônias com requerimento em arginina, com colônias de outras linhagens, e que os cleistotécios produzidos, nessa junção, eram predominantemente híbridos.

BAINBRIDGE (1964) partindo das observações de CLUTTERBUCK, para desenvolver uma técnica de obter cleistotécios híbridos, chegou à conclusão preliminar de que o efeito cleistotecial era devido à presença do alelo arginina ou a efeitos muito associados com êle, e que a ausência do efeito quando se adicionava suplementarmente arginina, ao meio completo, sugeria que isso podia ser devido a uma inibição parcial da linhagem com deficiência em arginina, em meio contendo arginina e lisina balanceados em certos limites.

CLOFT (1966) constatou que linhagens selvagens se gregavam linhagens cleistoteciais e não-cleistoteciais, e que essa segregação ocorria em proporções não mendelianas. Admitiu que a variação de formas cleistoteciais até não-cleistoteciais, que apareciam, nessa segregação, estava sob um contrôle multifatorial, e que testes de heterocários indicaram a participação de um fator extracromossômico, no contrôle da diferença entre o estado cleistotecial e não-cleistotecial.

AZEVÊDO (1966) assinalando que o procedimento de

vedar com fita celulósica as placas de petri, favorecia a produção de cleistotécios, considerou que isso provavelmente era devido a uma anaerobiose parcial. Segundo informações pessoais, apoiou-se em trabalho não publicado de BALL e BAINBRIDGE.

BARACHO (1968) assinalou a existência de uma correlação entre o tamanho dos cleistotécios e a sua condição de híbrido ou não-híbrido, e sugeriu que a produção de cleistotécios talvez, estivesse na dependência de fatores citoplasmáticos complementares, que poderiam se dispersar quando do desenvolvimento do micélio, e desse modo impedir a formação de cleistotécios.

2.2 - SEXUALIDADE DO MICÉLIO

2.2.1 - HOMOTALISMO E HETEROTALISMO EM Aspergillus

A sexualidade dos micélios, em fungos do gênero Aspergillus tem sido estudada por vários autores.

KNIEP (1928) estudando o A. repens considerou ser essa uma espécie homotática.

SCHWARTZ (1928) estudou A. ruber, A. repens, quatro outras linhagens de A. glaucus e quatro linhagens de A. nidulans, e concluiu serem todas homotáticas.

BLOCHWITZ (1932) considerou serem homotáticas, 6 linhagens do grupo A. glaucus por ele estudadas.

GREENE (1933) estudou o A. fischeri admitindo tratar-se, também, de uma espécie homotática.

HENRARD (1934) trabalhando com 15 "espécies" de Aspergillus, verificou serem todas homotáticas.

RAPER e FENNELL (1965), em sua revisão do gênero Aspergillus, consideraram que todos os fungos desse gênero, são homotáticos, com exceção do A. heterothallicus, que foi assim denominado por ser o primeiro do gênero Aspergillus em que o fenômeno de verdadeiro heterotalismo foi relatado.

2.2.2 - HOMOTALISMO E HETEROTALISMO EM A. nidulans.

SCHWARTZ (1928), assinalou ser o A. nidulans um fungo homotático. Posteriormente HENRARD (1934) demonstrou, de maneira concludente, o homotalismo desse fungo.

Mas apesar de ser um fungo homotático, em A. nidulans foi verificado um fenômeno que apresenta uma certa relação com o heterotalismo.

HENRARD (1934) descobriu entre seu material duas diferentes linhagens que, quando juntas, produziam um pigmento vermelho, ao longo da linha de contato. Apesar das linhagens serem autoférteis, os cleistotécios colhidos nessa zona de contacto era híbridos. A esse fenômeno ele chamou de "heterotalismo fisiológico".

PONTECORVO, FORBES e ADAM (1949), fazendo experiência com mutantes nutricionais e morfológicos, conseguiram a formação de heterocários de culturas que diferiam em inúmeros caracteres. A análise dos cleistotécios revelou que uns eram híbridos e outros não.

HEMMONS, PONTECORVO e BUFTON (1952) estudando 22 diferentes linhagens mutantes de A. nidulans não só confirmaram a experiência de PONTECORVO, FORBES e ADAM (1949), mas descobriram que em 10 dos 22 cruzamentos as proporções mostravam cruzamento cariogâmico de aproximadamente

100%. Como as linhagens usadas eram autoférteis, verificava-se assim um cruzamento cariogâmico preferencial, que êsses autores denominaram de "heterotalismo relativo", definido como o aparecimento de ascos híbridos, numa proporção acima de 50% em certas combinações de linhagens.

PONTECORVO e col. (1953) analisando 27 cruzamentos de 21 linhagens diferentes, observaram que em 16 dêsses cruzamentos, a proporção de cleistotécios híbridos era superior a 50%, e em determinado cruzamento, a análise de 30 cleistotécios mostrou que todos êles continham ascos híbridos.

OLIVE (1954) assinalando que o comportamento que indica a existência de uma tendência homotática e heterotática numa mesma espécie, não é própria apenas de Aspergillaceae, mas foi descrita também em certos fermentos, em Hypomyces solani, Glomerella cingulata, Ophiostoma fimbriata, Sordaria fimicola e outros, considerou que, talvez, a definição do termo "anfitalismo", proposto por LANQUE para certos Basidiomicetos, pudesse ser ampliada para incluir também êsses fungos.

OLIVE (1958) considerou ser o termo "heterotalismo relativo" de valor duvidoso, na ausência de informações mais detalhadas sôbre a natureza dos fatores genéticos envolvidos.

BAINBRIDGE (1964) usando linhagens com deficiência em arginina, em cruzamento em meio completo, obteve 6 cruzamentos que apresentaram cleistotécios híbridos, numa proporção de 100%, e a mais baixa frequência de cleistotécio híbrido que encontrou foi de 25%.

BARACHO (1968) em 17 cruzamentos examinados encontrou 7 cruzamentos que apresentavam proporções de cleistotécios híbridos superior a 50%.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - SÍMBOLOS USADOS

Para facilitar a exposição, os fenótipos dos mutantes referidos, no presente trabalho, serão indicados pelos símbolos seguintes, comumente utilizados em trabalhos de Genética de fungos:

<u>Acr 1</u>	resistência à acriflavina
<u>ad 1, ad 2, ad 14, ad 20</u>	requerimento para adenina
<u>an 1</u>	requerimento para aneurina
<u>bi 1</u>	requerimento para biotina
<u>cha</u>	conídio chartreuse (verde-limão)
<u>cho</u>	requerimento para colina
<u>co</u>	colônia compacta
<u>lys 5</u>	requerimento para lisina
<u>nic 2</u>	requerimento para ácido nicotínico
<u>paba 1 e paba 6</u>	requerimento para ácido p-aminobenzóico
<u>phen 2</u>	requerimento para fenilalanina
<u>pro 1</u>	requerimento para prolina
<u>pyro 4</u>	requerimento para piridoxina
<u>ribo 1, ribo 2, ribo 5</u>	requerimento para riboflavina
<u>s 3 e s 12</u>	requerimento para tiosulfato
<u>sul ad 20</u>	supressor do mutante <u>ad 20</u>
<u>w 2 e w 3</u>	conídios brancos
<u>y</u>	conídios amarelos
<u>ve</u>	forma conidial aveludada (velvet)
<u>(ve+)</u>	forma selvagem de <u>ve</u>

3.2 - LINHAGENS USADAS

No presente trabalho foram utilizadas linhagens haplóides de A. nidulans, do Departamento de Genética da Universidade de Brasília. Essas linhagens foram derivadas do estoque de Glasgow, Grã-Bretanha, e gentilmente cedidas à Universidade de Brasília, pelo Professor João Lúcio de Azevêdo, do Instituto de Genética da Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

Depois de purificadas e caracterizadas, essas linhagens foram mantidas em estoque, em meio completo, em agar inclinado, à temperatura ambiente.

As linhagens utilizadas foram as seguintes:

- (1) y; nic 2, ribo 5
- (2) y; w 2; s 12; pyro 4
- (3) an 1, bi 1
- (4) y, ad 14; co
- (5) su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5, cha
- (6) pro 1, paba 6, y; w 3

Essas linhagens foram escolhidas com base, em seus fenótipos, uma vez que elas apresentam características visuais que permitiriam distinguir uma das outras, nos casos em que fôsse necessário fazer cruzamentos.

As linhas de ascendência dessas linhagens podem ser encontradas nas figuras 1, 2, 3, 4 e 5. Essas linhas de ascendência foram estabelecidas com base nos trabalhos de KAFER (1965) e de BARRATT, JOHNSON e OGATA (1965).

Não é dada a linha de ascendência da linhagem y; nic 2, ribo 5, por não se dispor de informação, quer publicada ou pessoal.

FIGURA 1

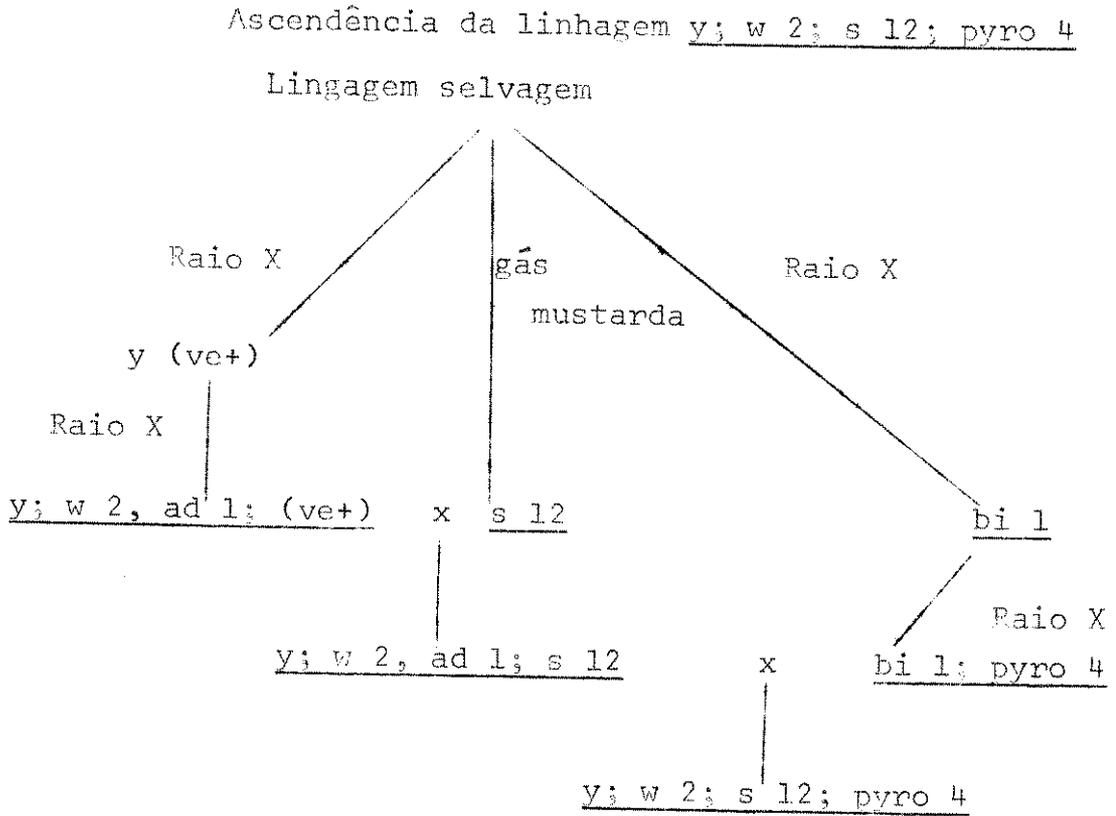


FIGURA 2

Ascendência da linhagem bi 1, an 1

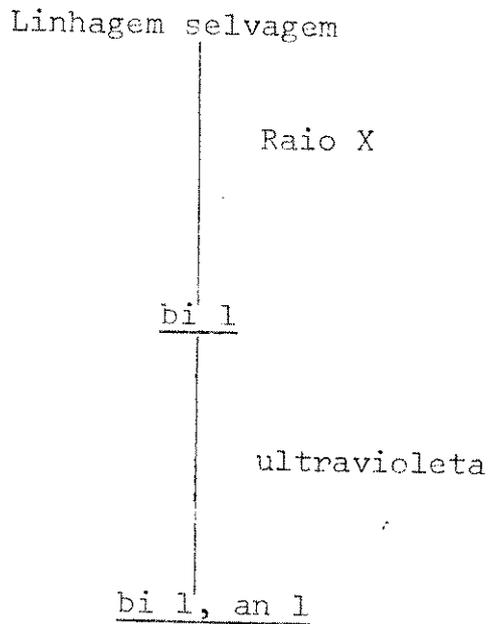


FIGURA 3

Ascendência da linhagem y; ad 14; co

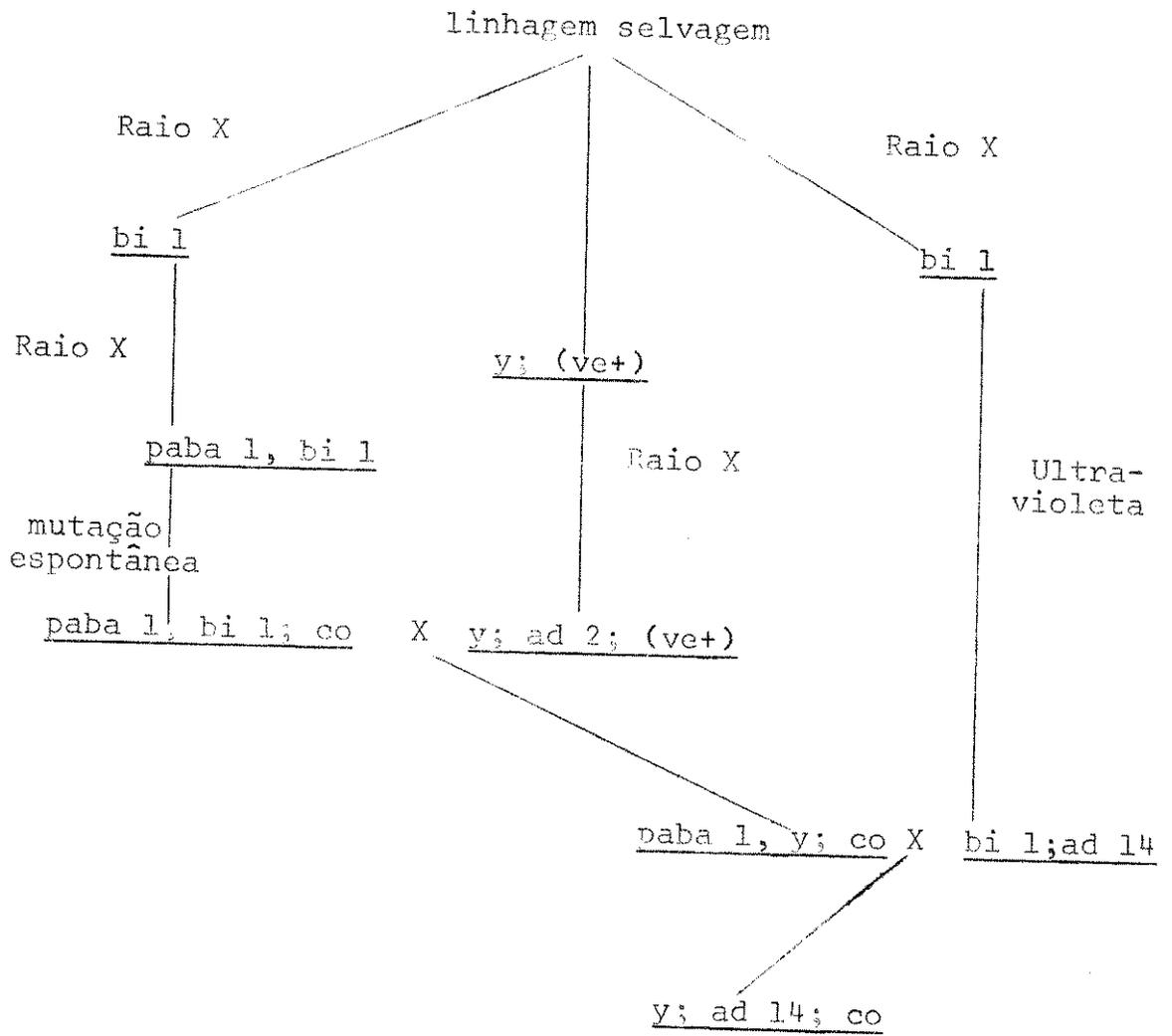


FIGURA 4

Ascendência da linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1;
Acr 1; lys 5; cha

A linha de ascendência dessa linhagem poderá ser vista com detalhe em KÄFER (1965) e BARRATT e col. (1965).

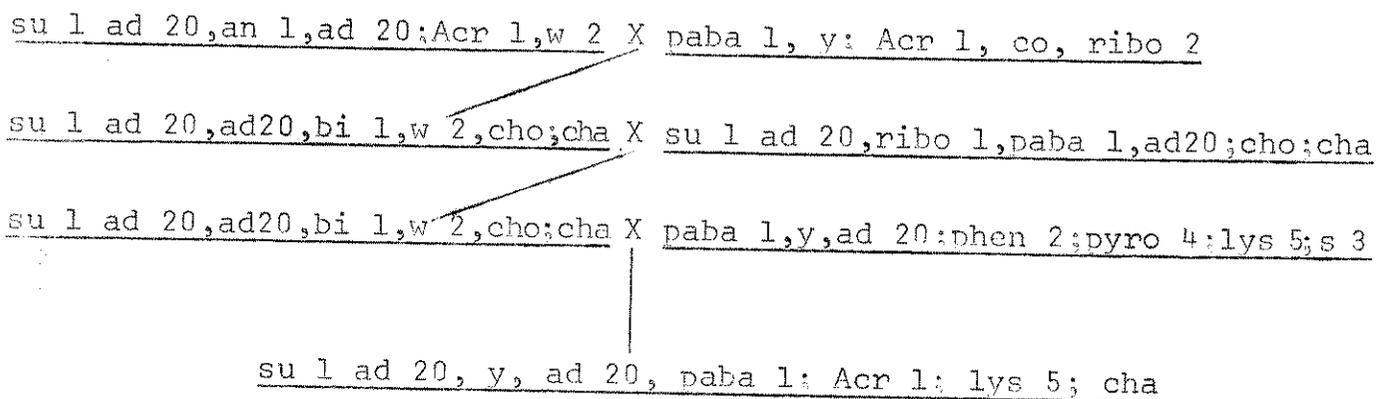
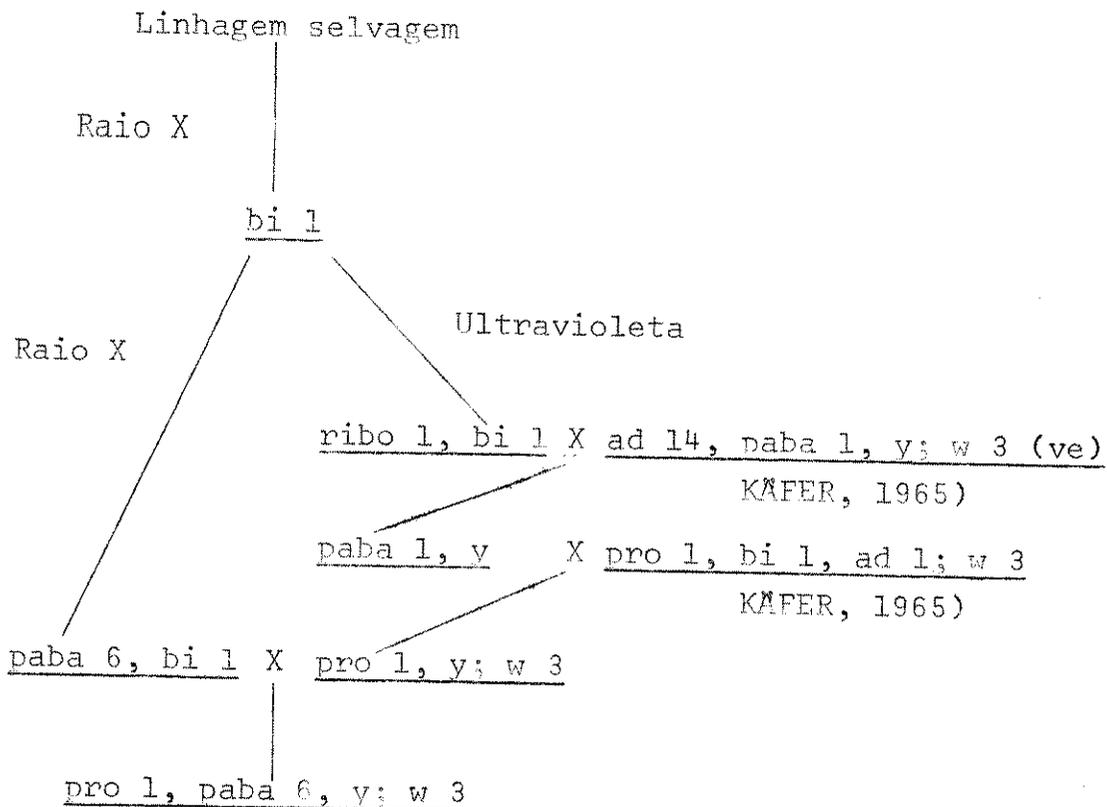


FIGURA 5

Ascendência da linhagem pro 1, paba 6, y; w 3



3.3 - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES USADAS

3.3.1 - MEIO MÍNIMO LÍQUIDO (PONTECORVO e col., 1953)

Nitrato de sódio	30 g
Cloreto de potássio	2,6 g
Sulfato de magnésio + 7H ₂ O	2,6 g
Fosfato dihidrogenado de potássio	7,6 g
Sulfato de ferro e sulfato de zinco	traços
Glicose	50 g

Água destilada completando 5 litros. O pH foi ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio.

3.3.2 - MEIO MÍNIMO SÓLIDO (PONTECORVO e col., 1953)

Foi preparado da mesma forma que o meio mínimo líquido mais adição do agar Oxoid nº 3 (1,5%).

3.3.3 - MEIO COMPLETO LÍQUIDO (PONTECORVO e col., 1953)

5 litros de meio mínimo líquido duas vezes forte foi preparado, a seguir adicionou-se:

Peptona (Oxoid)	20 g
Extrato de levedura (Oxoid)	5 g
Casseína hidrolisada (Oxoid)	15 g
Ácido nucléico de levedura hidrolisado ...	25ml
Solução de vitaminas	10ml

completou-se até 10 litros com água de torneira; o pH foi ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico, e o meio foi, finalmente, filtrado.

3.3.4 - MEIO COMPLETO SÓLIDO (PONTECORVO e col., 1953)

Foi preparado da mesma forma que o meio completo líquido, com adição no final, de ágar "Oxoid" número 3, (1,5%).

Todos os meios foram autoclavados a uma atmosfera, por dez minutos e guardados à temperatura ambiente, em lugar escuro.

3.3.5 - ÁCIDO NUCLÉICO DE LEVEDURA HIDROLISADO

Ácido nucléico de levedura (Oxoid)..... 2 gramas
em 15 ml
de solu-
ção nor-
mal de
ácido clo-
rídrico.

Ácido nucléico de levedura (Oxoid)..... 2 gramas
em 15 ml
de solu-
ção nor-
mal de
hidróxi-
do de sô-
dio.

Ambas as soluções foram aquecidas a 100°C por 20 minutos, misturadas, o pH ajustado para 6,0 e a solução resultante foi filtrado a quente. O volume foi ajustado para 40 ml e a preparação foi guardada no refrigerador sobre clorofórmio.

3.3.6 - SOLUÇÃO DE VITAMINAS

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

A solução foi esterilizada em banho-maria por 15 minutos, repetindo-se a operação durante 3 dias, após os quais a solução foi guardada em frasco escuro, no refrigerador.

3.3.7 - SOLUÇÃO SALINA 0,15 M

Cloreto de sódio foi dissolvido em água destilada para dar uma solução 0,89%, a qual foi, em seguida, autoclavada.

3.3.8 - SOLUÇÃO DE TWEEN

Twcen 80 (procedência NBC-USA) foi distribuído em água destilada para dar uma concentração final de 0,1% (v/v) e a solução foi autoclavada.

3.3.9 - SUPLEMENTOS ADICIONADOS AO MEIO MÍNIMO

<u>SUBSTÂNCIA</u>	<u>CONCENTRAÇÃO</u>
Sulfito de sódio	(200 µg/ml)
Piridoxina-HCl	(0,5 µg/ml)

3.4 - MÉTODOS USADOS

3.4.1 - TÉCNICA GERAL DE SEMEADURA E INCUBAÇÃO

Por meio de uma alça de platina flambada, conídios foram transferidos para uma solução esterilizada de Tween.

As cadeias de conídios foram desagregadas por agitação, primeiramente com um agitador mecânico e, em seguida, com pipeta "Pasteur".

Em um homocitômetro estimou-se a densidade da suspensão de conídios. E sempre que necessário foram feitas diluições pipetando-se volumes conhecidos das suspensões em 9 ml de solução salina.

Em cada placa de petri de 9 cm de diâmetro na base, foi sempre semeado 0,1 ml da suspensão de conídio. Com o fim de absorver o excesso de umidade colocou-se na tampa dessas placas de petri, um papel de filtro esterilizado. Um espalhador de vidro, esterilizado em álcool e flambado, foi usado para espalhar a suspensão sobre a superfície do meio de cultura.

Em geral, 20 ml de meio de cultura foi usado em cada placa. A temperatura usual de incubação foi de 37°C. Mas em alguns casos, foram feitas incubações a 25°C, e nesses casos serão indicados.

3.4.2 - VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CLEISTOTÉCIOS

Procurou-se verificar o comportamento, quando à formação de cleistotécios, das 6 linhagens utilizadas, nesse trabalho.

Essa verificação foi feita da seguinte maneira:

Semeou-se uma suspensão, de conídio, em 2 placas de petri com meio completo-sólido, de tal maneira diluída que permitiu o crescimento de aproximadamente, 20 colônias por placa. Essas placas assim semeadas, foram incubadas a 37°C, por 2 dias.

As colônias que cresceram foram transferidas, por meio de fio de platina, para placas com meio completo sólido e incubadas por 10 dias a 37°C. Em cada placa colocaram-se 4 colônias de uma mesma linhagem. E depois de 10 dias de incubação, as colônias de cada placa foram examinadas verificando-se as que produziram cleistotécios e as que não produziram.

De tôdas as linhagens utilizadas nesse trabalho, tomou-se ao acaso, nessas placas, uma colônia que não produziu cleistotécio, e essa colônia foi reexaminada por 2 métodos de inoculação.

No primeiro método, que chamaremos de "Transferência por picada", se fez a transferência de conídio e micélios do fungo, por meio de um fio de platina, colocando-se 4 colônias em cada placa, com meio completo.

No segundo método, que chamaremos "Transferência monoclonial", semeou-se, em placas com meio completo sólido, uma suspensão de conídios, de tal modo diluída, que permitiu crescer aproximadamente 6 colônias por placa. Essas colônias depois de 2 a 3 dias de crescidas foram transferidas para placas também com meio completo, sendo uma colônia para cada placa. A transferência foi feita em pequenos blocos de meio de cultura. Procurou-se transferir sempre a colônia inteira e desprezar aquelas colônias que não estivessem bem isoladas.

Essas placas inoculadas por êsses 2 métodos foram incubadas por 10 dias, ao fim dos quais se contavam as colônias que produziram cleistotécios e as que não produziram.

Em alguns casos a incubação foi feita a 37°C, e em outros a 25°C. Usou-se também placas vedadas com fita celulósica (AZEVEDO, 1966) e placas sem vedação.

Para alguns casos procurou-se partir também de colônias que haviam produzido cleistotécios. Também, em casos limitados, usou-se meio mínimo sólido suplementado com 2% de meio completo sólido, ou meio mínimo sólido suplementado com os requerimentos nutricionais da linhagem usada.

3.4.3 - CRUZAMENTOS

Em certos casos foram feitos cruzamentos entre algumas linhagens. Êsses cruzamentos foram feitos com fundamento no fenômeno de heterocariose que ocorre em A.nidulans (PONTECORVO e col., 1953). A formação de heterocários balanceados foi possível desde que as linhagens cruzadas, tinham requerimentos nutricionais. A técnica usada foi a seguinte: Conídios transferidos para solução Tween, por meio de alça de platina, foram desagregados, por agitação. A densidade da suspensão de conídios foi estimada em um hemocitômetro. Quando necessário foram feitas diluições pipetando-se volumes conhecidos da suspensão em 9 ml de solução salina. Conhecida a densidade da suspensão foi possível colocar quantidades, aproximadamente iguais, de conídios das linhagens cruzadas em tubos contendo 2 ml de meio mínimo líquido suplementado com 2% de meio completo líquido. A quantidade aproximada de conídios colocados foi de 500 mil conídios de cada linhagem. Êsses conídios, em tubos de ensaio, com meio mínimo líquido suplementado, foram em seguida levados à estufa por 2 a 3 dias, onde permaneceram à temperatura de

37°C. Durante êsse período formou-se uma película, na superfície do meio. Para cada cruzamento, a película foi retirada e cortada em quatro pedaços, de tamanho aproximadamente igual, na superfície do meio mínimo sólido, em placas de petri, cada placa contendo 20 ml de meio mínimo sólido. Em seguida as placas foram incubadas a 37°C. Nos casos em que se pretendeu obter cleistotécios, verificado o aparecimento de setores heterocarióticos, as placas foram vedadas com fita celulósica.

3.4.4 - ANÁLISE DE CLEISTOTÉCIOS

O método de análise de cleistotécios, usado, no presente trabalho, foi o mesmo descrito por PONTECORVO e col., (1953). Por meio de um fio de platina, cleistotécios foram transferidos para uma placa de petri, com ágar (3%) e em seguida rolados na superfície do ágar, para remover as células "hülle", que são viáveis (SCHWARTZ, 1928), e também remover os conídios a êles aderidos. Depois de limpos, os cleistotécios foram transferidos para placas de petri com 20 ml de meio completo. Na parede das placas êles foram esmagados, com fio de platina, e os ascosporos espalhados no meio de cultura, em linha dirigida para o centro da placa. Em cada placa foram colocados quatro cleistotécios. As placas foram incubadas a 37°C. A verificação dos resultados se fez depois de 2 a 3 dias de incubação.

3.4.5 - TESTE DE HETEROCÁRIO

Como os conídios de A. nidulans são uninucleados (YUILL, 1950) uma sementeira de conídios a partir de uma heterocário corresponde a uma amostra dos núcleos dêsse heterocário. Êsse método foi denominado por JINKS (1954) de "heterokaryon test" e pode ser usado como evidência preliminar, sugerindo se o caráter estudado está ou não associado

com o núcleo. E pode-se também usar êsse método para transferir citoplasma de uma linhagem para outra.

No presente trabalho, utilizou-se uma linhagem para doar citoplasma e outra linhagem para receber, e se fez entre essas linhagens diversos testes de heterocário sucessivos, em que a linhagem receptora era isolada, com base em suas características nutricionais e morfológicas, genêti^camente conhecidas, e novamente cruzada com a linhagem doadora inicial, mantida em estoque.

3.4.6 - AUXANOGRÁFIA

Sempre que necessário as linhagens foram caracterizadas pela técnica de auxanografia descrita por PONTECORVO (1949).

4 - RESULTADOS OBTIDOS

4.1- PRODUÇÃO DE CLEISTOTÉCIOS

A fim de verificar a variação na produção de cleistotécios, e poder escolher linhagens produtoras e não produtoras, e também para observar alguns fatores que pudessem interferir nessa variação, as 6 linhagens de A. nidulans, utilizadas, no presente trabalho, foram inoculadas em várias placas de petri.

Essa inoculação foi feita por 2 métodos que se acham descritos, no item 3.4.2, na página 20, métodos esses que foram denominados, um de "transferência por picada", outro de "transferência monoclonial".

Para cada linhagem tomou-se, ao acaso, uma colônia que não havia produzido cleistotécios. E em alguns casos, que serão relatados, foram tomadas também colônias que haviam produzido cleistotécios. Essas colônias, produtoras ou não produtoras, de cleistotécios, foram obtidas da maneira referida no item 3.4.2, na página 20.

Partindo dessas colônias, as linhagens foram inoculadas, em várias placas de petri, com 20 ml de meio, sendo utilizados o meio completo sólido ou o meio mínimo sólido, suplementado com 2% de meio completo sólido, ou suplementado com as substâncias que constituíam requerimento nutricional do fungo.

Essas linhagens em placas de petri, foram incubadas por 10 dias, à temperatura de 37°C e em alguns casos à temperatura de 25°C.

Ao fim desses 10 dias de incubação foram contadas as colônias que produziram e as que não produziram cleistotécios.

Como o tratamento não foi idêntico para todas as

linhagens preferimos, na apresentação dos resultados obtidos, considerar o caso de cada linhagem isoladamente.

4.1.1 - LINHAGEM y; nic 2, ribo 5

Foram examinadas 510 colônias dessa linhagem, sendo 243 colônias em placas vedadas com fita celulósica, e 276 colônias em placas sem vedação. Todas essas foram originadas de uma colônia que não havia produzido cleistotécio, e foram incubadas a 37°C, por 10 dias, em placas de petri com meio completo sólido. 288 colônias foram inoculadas pelo método de "transferência por picada" e 222 pelo método de "transferência monoclonial". Os resultados obtidos são dados nos quadros I e II.

QUADRO I

Número de colônias da linhagem y; nic 2, ribo 5 que produziram e que não produziram cleistotécios, em placas vedadas com fita celulósica.

Método de inoculação	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias examinadas
<u>Transferência por picada</u>	14	122	136
<u>monoclonial</u>	0	107	107
T o t a l	14	229	243

QUADRO II

Número de colônias da linhagem y; nic 2, ribo 5 que produziram e que não produziram cleistotécios em placas não vedadas com fita celulósica.

Método de inoculação	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias examinadas
Transferência:			
<u>por picada</u>	0	152	152
<u>monocolonial</u>	0	115	115
T o t a l	0	267	267

4.1.2 - LINHAGEM an 1, bi 1

Foram examinadas 188 colônias dessa linhagem, sendo 96 em placas vedadas com fita celulósica e 92 em placas sem vedação. Todas essas colônias foram originadas de uma colônia que não produziu cleistotécio e foram incubadas a 37°C por 10 dias.

A inoculação foi feita unicamente pelo método de "transferência por picada" e em placas contendo meio completo sólido. Os resultados obtidos são dados no Quadro III.

QUADRO III

Número de colônias da linhagem an 1, bi 1 que produziram e que não produziram cleistotécios, em placas inoculadas pelo método de "transferência por picada".

Placas	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias examinadas
Vedadas	43	53	96
Não vedadas	0	92	92
T o t a l	43	145	188

4.1.3 - LINHAGEM pro 1, paba 6, y; w 3

Foram examinadas 684 colônias dessa linhagem, sendo 404 em placas vedadas com fita celulósica e 280 em placas que não foram vedadas. Essas colônias foram originadas de uma colônia que não produziu cleistotécio e foram incubadas a 37°C por 10 dias, em placas de petri, contendo meio completo sólido. 348 colônias foram inoculadas pelo método de "transferência por picada" e 336 pelo método de "transferência monoclonial". Não se obteve nenhuma colônia que produzisse cleistotécios, tendo sido observado em todas elas uma pequena produção de conídios. Para que se possa visualizar melhor, os resultados obtidos são dados nos quadros IV e V.

QUADRO IV

Número de colônias da linhagem pro 1, paba 6, y; w 3 que produziram e que não produziram cleistotécios, em placas vedadas com fita celulósica.

Método de inoculação	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias examinadas
Transferência:			
<u>por picada</u>	0	232	232
<u>monoclonial</u>	0	172	172
T o t a l	0	404	404

QUADRO V

Número de colônias da linhagem pro 1, paba 6, y:w 3 que produziram e que não produziram cleistotécios em placas não vedadas com fita celulósica.

Método de inoculação	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias examinadas
Transferência:			
<u>por picada</u>	0	116	116
<u>monocolonial</u>	0	164	164
T o t a l	0	280	280

4.1.4 - LINHAGEM y, ad 14; co

Foram examinadas 80 colônias dessa linhagem, todas em placas de petri que tinham sido vedadas com fita celulósica. Essas colônias também foram originadas de uma colônia que não havia produzido cleistotécio. Elas foram inoculadas pelo método de "transferência por picada", em placas de petri, com meio completo sólido, e incubadas a 37°C. Após 10 dias de incubação as colônias foram examinadas, constatando-se então, que 11 colônias produziram cleistotécios e 69 colônias não produziram (Quadro XI).

4.1.5 - LINHAGEM su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha

Foram examinadas 80 colônias dessa linhagem, todas em placas que tinham sido vedadas com fita celulósica.

Essas colônias, originadas de uma colônia que não produziu cleistotécio, foram inoculadas pelo método de "transferência por picada" em placas de petri com meio completo sólido e incubadas a 37°C por 10 dias.

O resultado obtido foi o seguinte: 74 colônias produziram cleistotécios, e 6 colônias não produziram cleistotécios (Quadro XI).

4.1.6 - LINHAGEM y; w 2; s 12; pyro 4

Foram examinadas várias colônias dessa linhagem. Essas colônias foram examinadas, em placas que tinham sido vedadas com fita celulósica e em placas que não tinham sido vedadas. Algumas colônias foram originadas de uma colônia que havia produzido cleistotécio e outras originadas de uma colônia que não havia produzido cleistotécio. Algumas foram inoculadas pelo método de "transferência por picada" e outras pelo método de "transferência monoclonal". Algumas foram incubadas a 37°C, outras a 25°C. Umhas foram inoculadas em meio completo sólido, outras em meio mínimo sólido suplementado. Mas tôdas foram incubadas por 10 dias.

Os resultados obtidos são dados nos Quadros VI, VII, VIII, IX e X.

QUADRO VI

Número de colônias da linhagem y; w 2; s 12; pyro 4 que produziram e que não produziram cleistotécios, em placas vedadas, com fita celulósica.

Temperatura de incubação: 37°C

Meio de cultura: completo sólido

Origem da colônia: originada de uma colônia que não produziu cleistotécios.

Método de inoculação	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias examinadas
Transferência: <u>por picada</u>	10	62	72
<u>monoclonal</u>	0	95	95
T o t a l	10	157	167

QUADRO VII

Número de colônias da linhagem y:w 2; s 12;pyro 4 que produziu e que não produziu cleistotécio, em placas não vedadas com fita celulósica.

Temperatura de incubação: 37°C

Meio de cultura: completo sólido

Origem da colônia: originada de uma colônia que não produziu cleistotécio.

Método de inoculação	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias examinadas
<u>Transferência:</u> <u>por picada</u>	4	76	80
<u>monocolonial</u>	0	86	86
<u>T o t a l</u>	4	162	166

QUADRO VIII

Número de colônias da linhagem y:w 2; s 12;pyro 4 que produziu e que não produziu cleistotécio, em placas vedadas, com fita celulósica, e que foram originadas de uma colônia que havia produzido cleistotécio.

Temperatura de incubação: 37°C

Meio de cultura: completo sólido

Método de inoculação	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias examinadas
<u>Transferência:</u> <u>por picada</u>	48	32	80
<u>monocolonial</u>	0	82	82
<u>T o t a l</u>	48	114	162

QUADRO IX

Número de colônias da linhagem y; w 2;s 12;pyro 4 que produziram e que não produziram cleistotécios, em placas vedadas.

Temperatura de incubação: 37°C

Meio de cultura: mínimo sólido, suplementado com sulfito e piridoxina

Método de inoculação: transferência por picada

Origem da colônia	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias examinadas
De colônia: <u>cleistotecial</u>	42	38	80
<u>acleistotecial</u>	37	43	80
T o t a l	79	81	160

QUADRO X

Número de colônias da linhagem y;w 2;s 12;pyro 4 que produziram e que não produziram cleistotécios, a 25°C.

Meio de cultura: completo sólido

Método de inoculação: transferência por picada

Origem da colônia: originadas de uma colônia que não produziu cleistotécios.

Placas	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias examinadas
<u>Vedadas</u>	0	80	80
<u>Não-vedadas</u>	0	80	80
T o t a l	0	160	160

QUADRO XI

Número de colônias das linhagens y; ad 14; co e da linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha que produziram e que não produziram cleistotécios.

Temperatura de incubação: 37°C

Meio de cultura: completo sólido

Método de inoculação: transferência por picada

Placas vedadas

Origem da colônia: originadas de uma colônia que não produziu cleistotécios.

Linhagem	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias examinadas
1) <u>y, ad 14; co</u>	11	69	80
2) <u>su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha</u>	74	6	80
T o t a l	85	75	160

4.2 - VERIFICAÇÃO DE EFEITOS CITOPLASMÁTICOS

4.2.1 - TRANSFERÊNCIA DE CITOPLASMA

Com base nos resultados dos experimentos anteriores escolheu-se a linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha e a linhagem pro 1, paba 6, y; w 3, para serem cruzadas.

A escolha decorreu do seguinte critério: A linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha foi a que proporcionalmente, apresentou maior número de colônias que produziram cleistotécios (74 colônias em 80). Por outro lado a linhagem pro 1, paba 6, y; w 3, foi a única que não

apresentou colônias que tenham produzido cleistotécios (em 684 colônias examinadas). Além disso a linhagem pro 1, paba 6, y; w 3, mostrou certas características que pareciam indicar sua incapacidade de produzir cleistotécios. Essa linhagem, em incubação a 37°C, em meio completo sólido, apresenta inicialmente, micélios aéreos de aparência cotonosa (fluffy), que desaparecem com 10 a 15 dias de incubação, dando aparência de morte do fungo, o qual também produz quantidade muito reduzida de conídios.

Como base nos resultados relatados no item 4.1 e nessas características da linhagem pro 1, paba 6, y; w 3: escolheu-se essa linhagem, que tudo indica ser acleistotecial, para receber citoplasma da linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha.

A transferência do citoplasma foi feita pelo método descrito no item 3.4.5, na página 23.

O cruzamento inicial foi feito partindo-se da mesma colônia que deu origem às 684 colônias da linhagem pro 1, paba 6, y; w 3 examinadas, e da mesma colônia que deu origem às 80 colônias da linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha examinadas.

Foram feitos 3 cruzamentos entre essas linhagens. E nos 2 cruzamentos subseqüentes utilizou-se a linhagem pro 1, paba 6, y; w 3 reisolada do cruzamento anterior e a linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha sempre da mesma colônia que deu origem às 80 colônias da linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha examinadas.

A linhagem pro 1, paba 6, y; w 3 isolada de cada cruzamento, depois de testada pela técnica de auxanografia (PONTECORVO, 1949), era inoculada, pelo método de "transferência por picada", em placas com meio completo sólido. As

placas eram vedadas com fita celulósica e incubadas por 10 dias a 37°C. Em cada placa eram colocadas 4 colônias. E, ao fim de 10 dias de incubação, as placas eram examinadas, e contadas as colônias que produziram e as que não produziram cleistotécios.

Os resultados obtidos são dados no Quadro XII.

QUADRO XII

Número de colônias da linhagem pro 1, paba 6; y; w 3 que produziram e que não produziram cleistotécios, de pois de reisoladas de heterocários formada com a linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha.

Isolado do	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias examinadas
1º heterocário	0	80	80
2º heterocário	7	85	92
3º heterocário	32	8	40

4.2.2 - ANÁLISE DE CLEISTOTÉCIOS

Procurou-se analisar, pela técnica descrita no item 3.4.4 na página 23, cleistotécios produzidos pela linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha. Procurou-se também analisar, pela mesma técnica cleistotécios obtidos no heterocário formado entre a linhagem pro 1, paba 6, y; w 3 e a linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha e ainda cleistotécios obtidos nas colônias da linhagem pro 1, paba 6, y; w 3 reisolada do 2º heterocário e do 3º heterocário referidos no Quadro XII.

Quanto à linhagem su 1 ad 20, y, paba 1; Acr 1; lys 5; cha, 4 cleistotécios foram analisados e todos eram inférteis.

No que diz respeito ao heterocário formado entre a linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha e a pro 1, paba 6, y; w 3 foram analisados 12 cleistotécios, todos êles férteis, e não-híbridos, do tipo da linhagem pro 1, paba 6, y; w 3.

Quanto à linhagem pro 1, paba 6, y; w 3 isolada do 2º heterocário referido no Quadro XII, os cleistotécios, eram amarelados, como se não tivessem atingido à maturidade, e 4 dêles analisados revelaram-se inférteis. Já a linhagem pro 1, paba 6, y; w 3 isolado do 3º heterocário, referido no Quadro III, apresentava cleistotécios amarelos, como se não tivessem atingido a maturidade e outros escuros, aparentando serem normais, porém 4 dêles analisados também se mostraram inférteis.

4.2.3 - VERIFICAÇÃO DE EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS DIFUNDIDAS NO MEIO DE CULTURA.

Procurou-se verificar também se alguma substância difundida no meio de cultura, induzia a formação de cleistotécios. Para isso deixou-se crescer a linhagem su 1 ad 20, y ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha, em um balão contendo 50 ml de meio completo líquido. Depois de 5 dias de incubação a 37°C, filtrou-se êsse meio, com fungo, em um filtro Seitz.

Dêsse meio filtrado foi colado 0,3 ml em cada placa de petri, com meio completo sólido, e espalhou-se com o espalhador de vidro esterilizado em álcool e flambado. Depois inoculou-se, nessas placas, a linhagem pro 1, paba 6, y; w 3. Partiu-se da mesma colônia que deu origem às 684 colônias referidas no item 4.1.3, na página 28. O método de ino

culação foi o de "transferência por picada". As placas foram vedadas com fita celulósica e incubadas a 37°C, por 10 dias. Colocaram-se 4 colônias por placa, e utilizaram-se apenas 5 placas.

Depois de 10 dias de incubação, as placas foram examinadas. Não foram notados cleistotécios, em nenhuma das 20 colônias examinadas.

4.2.4 - OUTROS EXPERIMENTOS

a) A linhagem y; w 2; s 12; pyro 4, proveniente da mesma colônia que não produziu cleistotécio, e referida no item 4.1.6 foi inoculada, pelo método de "transferência por picada" em placas de petri contendo uma camada de meio completo sólido, no centro, e meio mínimo sólido, suplementado com 2% de meio completo sólido, na periferia.

A linhagem foi inoculada no limite entre êsses 2 meios. As placas foram vedadas com fita celulósica e incubadas a 37°C, por 10 dias.

Os resultados obtidos: 36 colônias examinadas, todas produziram cleistotécios.

b) Em placas de petri, contendo meio completo sólido foram inoculadas, em linhas próximas, a linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha e a linhagem pro 1, paba 6, v; w 3. As placas foram vedadas com fita celulósica e incubadas a 37°C.

Ao fim de 10 dias de incubação as placas foram abertas e observadas.

Resultados obtidos: Em quatro placas examinadas

notaram-se cleistotécios apenas na linhagem su 1 ad 20, y₂ ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha. Dos cleistotécios encontrados no limite, entre as duas linhagens, 8 deles foram analisados e todos eram viáveis e híbridos.

4.3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

O comportamento de algumas linhagens quanto à formação de cleistotécios, variou, em relação à temperatura de incubação, em relação ao meio de cultura usado, em relação ao método de inoculação, em relação à procedência da colônia e também em relação à vedação ou não vedação das placas com fita celulósica.

Com o fim de verificar até que ponto essa variação pode ser considerada devido ao acaso, procurou-se analisar estatisticamente os dados obtidos. Essa análise foi feita aplicadndo o teste de χ^2 .

As freqüências observadas e as freqüências esperadas, bem como os valores de χ^2 são dados nos Quadros XIII, XIV, XV, XVI, XVII e XVIII, para os casos que se considerou importante analisar estatisticamente.

O teste de χ^2 foi aplicado às tabelas de contingência 2 x 2 observando-se as restrições estabelecidas por COCHRAN (1954) e fazendo-se a correção de continuidade ou de Yates, sempre que a freqüência esperada mínima era inferior a 20 (F. PIMENTEL GOMES, 1966).

Nas tabelas de contingência as freqüências esperadas são dadas entre parênteses.

QUADRO XIII

Frequência observada e frequência esperada, bem como valores de X^2 , considerando dados, de diversas linhagens, sobre produção de cleistotécios, obtidos em placas vedadas e não vedadas.

Método de inoculação: transferência por picada
 Temperatura de incubação: 37°C
 Origem das colônias: originárias de uma colônia que não produziu cleistotécios
 Meio de cultura: completo sólido.

a) linhagem y; nic 2, ribo 5

Placas	Colônias que produziram cleistotécios	Colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias
Vedadas	14 (6,61)	122 (129,39)	136
Não-vedadas	0 (7,39)	152 (144,61)	152
	14	274	288

$$X^2(G.L.=1)=14,30***$$

b) linhagem an 1, bi 1

Placas	Colônias que produziram cleistotécios	Colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias
Vedadas	43 (21,96)	53 (74,04)	96
Não-vedadas	0 (21,04)	92 (70,96)	92
	43	145	188

$$X^2(G.L.=1)=53,42***$$

(continua.....)

(continuação.....)

c) linhagem v; w 2; s 12; pyro 4

Placas	Colônias que produziram cleistotécios	Colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias
Vedadas	10 (6,63)	62 (65,37)	72
Não-vedadas	4 (7,37)	76 (72,63)	80
	14	138	152

$$\chi^2(G.L.=1)=2,60 \text{ n.s.}$$

QUADRO XIV

Frequências observadas e esperadas, bem como valores de χ^2 considerando os dados da linhagem y; w 2; s 12, pyro 4 sobre produção de cleistotécios, obtidos pelos métodos de "transferência por picada" e de "transferência mono colonial".

Temperatura de incubação: 37°C
 Meio de cultura: completo sólido
 Placas vedadas
 Origem das colônias: originadas de uma colônia que produziu cleistotécios.

Método de inoculação	Colônias que produziram cleistotécios	Colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias
<u>Transferência:</u> <u>por picada</u>	48 (23,70)	32 (56,30)	80
<u>monocolonial</u>	0 (24,30)	82 (57,70)	82
	48	114	162

$$\chi^2(G.L.=1)=69,92***$$

QUADRO XV

Frequências observadas e frequências esperadas, bem como valores de X^2 , considerando os dados de diversas linhagens, sobre produção de cleistotécios, obtidos pelos métodos de "transferência por picada" e de "transferência monoclonal".

Temperatura de incubação: 37°C
 Origem das colônias: originadas de uma colônia que não produziu cleistotécios
 Meio de cultura: completo sólido
 Placas vedadas.

a) linhagem y; nic 2, ribo 5

Método de inoculação	Colônias que produziram cleistotécios	Colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias
Transferência:			
<u>por picada</u>	14 (7,83)	122 (128,17)	136
<u>monoclonal</u>	0 (6,17)	107 (100,83)	107
	14	229	243

$$X^2(G.L.=1)=9,88**$$

b) linhagem y; w 2; s 12; pyro 4

	Colônias que produziram cleistotécios	Colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias
Transferência:			
<u>por picada</u>	10 (4,31)	62 (67,69)	72
<u>monoclonal</u>	0 (5,69)	95 (89,31)	95
	10	157	167

$$X^2(G.L.=1)=11,68***$$

QUADRO XVI

Freqüências observadas e freqüências esperadas, bem como os valores de X^2 , considerando os dados da linha-gem y; w 2; s 12; pyro 4 sobre produção de cleistotécios, obtidos em temperatura de 25°C, e 37°C em placas vedadas e em placas sem vedação.

Método de inoculação: "transferência por picada"
 Meio de cultura: completo sólido
 Origem das colônias: originadas de uma colônia que não produziu cleistotécios.

a) Em placas vedadas

Temperatura	Colônias que produziram cleistotécios	Colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias
37°C	10 (4,73)	62 (67,27)	72
25°C	0 (5,27)	80 (74,73)	80
	10	142	152

$$X^2(G.L.=1)=9,77**$$

b) Em placas sem vedação

Temperaturas	Colônias que produziram cleistotécios	Colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias
37°C	4 (2,00)	76 (78,00)	80
25°C	0 (2,00)	80 (78,00)	80
	4	156	160

$$X^2(G.L.=1)=2,30 \text{ n.s.}$$

QUADRO XVII

Frequências observadas e frequências esperadas, bem como valores de X^2 , considerando os dados da linhagem y: w 2: s 12; pyro 4 sobre produção de cleistotécios, obtidos em placas com colônias originadas de uma colônia que não produziu cleistotécio e de colônia que produziu cleistotécio.

Método de inoculação: "transferência por picada"
 Temperatura de incubação: 37°C
 Placas vedadas.

a) Em meio completo sólido

Origem da colônia	Colônias que produziram cleistotécios	Colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias
De colônia:			
<u>cleistotecial</u>	48 (30,52)	32 (49,48)	80
<u>acleistotecial</u>	10 (27,48)	62 (44,52)	72
	58	94	152

$$X^2(G.L.=1)=34,16***$$

b) Em meio mínimo suplementado com piridoxina e sulfito.

Origem da colônia	Colônias que produziram cleistotécios	Colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias
De colônia:			
<u>cleistotecial</u>	42 (39,50)	38 (40,50)	80
<u>acleistotecial</u>	37 (39,50)	43 (40,50)	80
	79	81	160

$$X^2(G.L.=1)=0,62 \text{ n.s.}$$

QUADRO XVIII

Frequências observadas e frequências esperadas, bem como valores de X^2 , considerando os dados da linhagem y; w 2; s 12; pyro 4 sobre produção de cleistotécios, obtidos em placas com diversos meios de cultura.

Método de inoculação: "transferência por picada"
 Temperatura de incubação: 37°C
 Origem das colônias: originadas de uma colônia que não produziu cleistotécios
 Placas vedadas.

a) linhagem em meio completo sólido e linhagem em meio mínimo sólido, suplementado com sulfito e piridoxina.

Meio de cultura	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias
MC	10 (22,26)	62 (49,74)	72
MM+S+Pyro	37 (24,74)	43 (55,26)	80
	47	105	152

$$X^2(G.L.=1)=18,56***$$

b) linhagem em placas contendo meio completo líquido e linhagem em placas contendo meio mínimo sólido suplementado com 2% de meio completo sólido, na periferia, e, no centro, contendo meio completo sólido.

Meio de cultura	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias
MC	10 (30,66)	62 (41,34)	72
MM+2%MC//MC	36 (15,34)	0 (20,66)	36
	46	62	108

$$X^2(G.L.=1)=69,24***$$

(continua

..... continuação)

- c) linhagem em placas com meio mínimo sólido suplementado com sulfito e pirodoxina e linhagem em placas contendo, na periferia, meio mínimo sólido suplementado com 2% de meio completo sólido, e no centro, contendo meio completo sólido.

Meio de cultura	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias
MM+S+ Pyro	37 (50,34)	43 (29,66)	80
MM+2%MC//MC	36 (22,66)	0 (13,34)	36
	73	43	116

$$X^2(G.L.=1)=28,46***$$

OBSERVAÇÕES:

- MC = Meio completo sólido
 MM + S + Pyro = Meio mínimo sólido suplementado com sulfito e pirodoxina.
 MM + 2%MC//MC = Meio mínimo sólido suplementado com 2% de meio completo sólido, na periferia das placas de petri e meio completo no centro.

5 - DISCUSSÃO

Em 1954 JINKS, em seu trabalho "Somatic Selection in Fungi", assinalava que a formação de cleistotécios, em A. nidulans, ia se tornando progressivamente retardada e rara quando se fazia a transferência, do fungo, por meio de um único conídio. E da investigação preliminar a que procedeu, fôra levado a concluir pela natureza extranuclear dêsse fenômeno.

Ressaltando que a informação obtida, em fungos pode ser de potencial valor para compreensão do processo de diferenciação, em geral, JINKS, nesse estudo do A. nidulans, sugeria então, que a diferenciação em hifas ascógenas, conidióforas e micélios vegetativos, poderia ser devido não ao núcleo, mas às condições do citoplasma, nas regiões diferenciadas. E destacava que as diferenças citoplasmáticas poderiam ocorrer da casual irregularidade na distribuição de corpos auto-reproduzíveis, ou de mudanças nas condições do meio ambiente, ou ainda de ação nuclear. E enquanto, nos organismos superiores, a ação nuclear exercia um papel predominante, na diferenciação, pelo seu sistemático controle das mudanças citoplasmáticas, nos fungos, o núcleo exercia um controle menos rígido, do citoplasma.

Numa visão mais crítica dos problemas genéticos, em geral, poder-se-ia atribuir a JINKS uma preocupação maior em destacar o papel do citoplasma, nos fenômenos hereditários. Contudo, no que diz respeito aos corpos de frutificação em A. nidulans, não nos parece destituída de fundamento uma hipótese de trabalho que leve em conta essa diferenciação, a que se refere JINKS, devido, não ao núcleo, mas ao citoplasma.

BARACHO (1968), sem descer a detalhes, com base no comportamento das linhagens de A. nidulans, que submetidas às mesmas condições, ora produzem unicamente conídios,

ora apresentam formas sexuais, sugeria que a produção de cleistotécios poderia estar na dependência de fatores internos que se distribuem ao acaso.

É evidente que se relacionarmos essa idéia de participação desses fatores internos que se distribuem ao acaso, com esse processo de diferenciação sugerida por JINKS, poderíamos chegar a uma hipótese de trabalho, mais ampla, buscando explicar a formação de cleistotécios em A. nidulans.

Poder-se-ia admitir, então, que a formação de cleistotécios, em A. nidulans, estivesse na dependência de dois fatores citoplasmáticos. Os citoplasmas em que estivessem esses dois fatores não poderiam se diferenciar em órgãos sexuais ou não produziriam substâncias que pudessem interferir nessa diferenciação, ou na formação de cleistotécios. Mas esses fatores poderiam se dispersar, quando do desenvolvimento do micélio e dar origem a órgãos sexuais, fisiologicamente diferentes, de cuja união resultariam os cleistotécios, ou então, a dispersão, desses fatores, poderia dar origem a hifas que produzissem substâncias diferentes, e essas substâncias, quando reunidas, mais frequentemente pelo processo de anastomoses das hifas, iriam interferir na produção de cleistotécios.

O presente trabalho e os trabalhos anteriores sobre o assunto, parecem segurar a possibilidade de o fenômeno poder se enquadrar dentro de um esquema dessa natureza. Há certos aspectos do problema que poderiam justificar essa hipótese. E um deles é o comportamento do A. nidulans apresentando uma produção de cleistotécios irregular e incerta, cuja irregularidade não parece depender de um fator ambiental, normalmente controlado.

No presente trabalho essa variação na produção de cleistotécio foi efetivamente constatada. Colônias que não haviam produzido cleistotécios, transferidas, por picada, a

diversas placas de petri, e mantidas nas mesmas condições, deram origem a colônias que produziram cleistotécios e a colônias que não produziram (Quadros I, III, VI, VII, IX e X). Do mesmo modo colônias que haviam produzido cleistotécios transferidas a várias placas de petri, por picada, deram também origem a colônias que produziram cleistotécios e a colônias que não produziram (Quadros VIII e IX).

Se considerarmos as colônias inoculadas por picada, e originadas de uma que não produziu cleistotécios, verificaremos:

No Quadro I - em 136 colônias da linhagem y; nic 2 ribo 5, que foram examinadas, 14 colônias produziram cleistotécios e 122 não produziram.

No Quadro III - em 96 colônias da linhagem an 1, bi 1 que foram examinadas, 43 produziram cleistotécios e 53 não produziram.

No Quadro VI - em 72 colônias da linhagem y; w 2; s 12; pyro 4, que foram examinadas, 10 produziram cleistotécios e 62 não produziram.

No Quadro VII - em 80 colônias da linhagem y; w 2; s 12; pyro 4 que foram examinadas, 4 produziram cleistotécios e 76 não produziram.

No Quadro IX - em 80 colônias da linhagem y; w 2; s 12; pyro 4, que foram examinadas, 37 produziram cleistotécios e 43 não produziram.

No Quadro XI - em 80 colônias da linhagem y; ad 14; co que foram examinadas, 11 produziram cleistotécios e 69 não produziram; e em 80 colônias da linhagem sul ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha, que foram examinadas, 76 produziram cleistotécios e 6 não produziram.

Se considerarmos, por outro lado as colônias que

foram inoculadas por picada, mas originadas de uma que produziu cleistotécios, verificaremos:

No Quadro VIII - em 80 colônias da linhagem y; w 2; s 12; pyro 4, que foram examinadas, 48 produziram cleistotécios e 32 não produziram.

No Quadro IX - em 80 colônias da linhagem y; w 2; s 12; pyro 4, que foram examinadas, 42 produziram cleistotécios e 38 não produziram.

Os dados mostram, portanto, a variação que o A. nidulans apresenta na produção de cleistotécios.

Se, para cada caso considerado, a temperatura de incubação foi a mesma, o meio de cultura foi o mesmo, se não há nenhuma razão para se supor uma umidade diferente, se a té mesmo a alteração genética que pudesse ter ocorrido, poderia ter sido compensada ou anulada, pelos milhares de conídios inoculados, que, sem dúvida, não teriam mudado, se a variação, enfim, se realiza nas mesmas condições ambientais, torna-se mais fácil explicá-la pela hipótese que formulamos.

Mas no presente trabalho foi também constatada uma determinada influência da vedação das placas com fita celulósica, uma influência também da temperatura de incubação, do processo de inoculação, do meio de cultura utilizado e da procedência das colônias.

O efeito da vedação (Quadro XIII) foi constatado, na linhagem y; nic 2, ribo 5 e na linhagem an 1, bi 1. Entretanto, na linhagem y; w 2; s 12; pyro 4, considerando apenas o número de colônias que produziram e que não produziram cleistotécios, não houve diferença significativa.

A influência da vedação não está bem esclarecida. Tem sido sugerido que, talvez, se devesse a uma anaero-

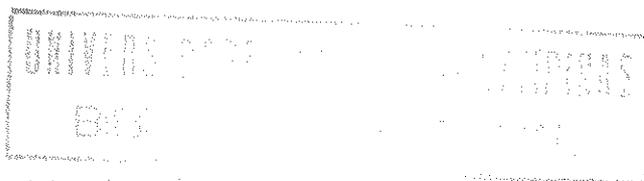
biose parcial (AZEVEDO, 1966). De qualquer modo êsse efeito não se opõe à hipótese que estamos considerando, e poderia ser justificado como interferência dessa anaerobiose parcial ou da tensão de água, no processo de dispersão dos fatores citoplasmáticos referidos, ou na anastomoses das hifas diferenciadas.

Quanto ao método de inoculação, também se constatou, na linhagem y; nic 2, ribo 5, e na linhagem y; w 2; s 12; pyro 4 que a transferência por picada, favorece o aparecimento de colônias cleistoteciais (Quadros XIV e XV). É possível supor que isso se verifica em face do grande número de conídios germinados, o que poderia aumentar enormemente as possibilidades de anastomoses de hifas diferenciadas.

486
Verificou-se também um efeito do meio de cultura utilizado (Quadro XVIII). Êsse efeito foi verificado na linhagem y; w 2; s 12; pyro 4. Quando se usou meio mínimo suplementado com sulfito e piridoxina, em vez de meio completo, houve um aumento no número de colônias que produziram cleistotécios. Êsse aumento foi ainda maior, quando se usou placas contendo meio completo, no centro, e meio mínimo suplementado com 2% de meio completo, na periferia. Nesse último caso nenhuma colônia examinada deixou de produzir cleistotécios.

É perfeitamente admissível que tal efeito do meio de cultura possa decorrer de êsses meios forçarem uma maior diferenciação e uma mais freqüente anastomoses de hifas diferenciadas.

Constatou-se ainda um efeito da procedência da colônia (Quadro XVII). Isso foi verificado na linhagem y; w 2; s 12; pyro 4, em meio completo sólido. Se as colônias procediam de uma que havia produzido cleistotécios, o número de colônias cleistoteciais era maior do que quando as co



lônias procediam de uma que não havia produzido cleistotécios.

Esse efeito, entretanto, só foi verificado em meio completo, pois em meio mínimo suplementado com sulfito e piridoxina, os resultados não mostraram diferenças significativas.

A influência da temperatura (Quadro XVI) foi verificada na linhagem y; w 2; s 12; pyro 4. Nessa linhagem a temperatura de 37°C favoreceu o aparecimento de colônias cleistoteciais, em placas vedadas, mas em placas sem vedação, não houve diferença significativa, nas temperaturas de 25°C e 37°C.

Convém assinalar que esses efeitos todos foram verificados em certas e determinadas linhagens e não se sabe até que ponto eles podem ser generalizados.

A hipótese de trabalho que estamos considerando presuppõe a participação de fatores citoplasmáticos na formação de cleistotécios, em A. nidulans.

A participação de fatores extracromossômicos na formação de cleistotécios em Aspergillus, foi constatada em A. glaucus por SHARPE (1956,1958) e por JINKS (1956,1958) e em A. nidulans por JINKS (1954), por MAHONEY & WILKIE (1958, 1962) e por CROFT (1966).

No entanto, no que diz respeito à participação de fatores extracromossômicos, na formação de cleistotécios em A. nidulans, que é o que nos interessa, no momento, JINKS (1954) limitou-se a uma investigação preliminar que não parece esclarecer convenientemente o problema.

MAHONEY & WILKIE (1958, 1962) estudaram mais detalhadamente o assunto e concluíram que a formação de cleistotécios estava na dependência de uma interação núcleo-citoplas

ma. Esses autores utilizaram, em seus trabalhos, linhagens selvagens, e um mutante espontâneo, que denominaram alba. Esse mutante, que os autores consideraram acleistotecial apresentava, contudo, uma taxa de reversão para formas cleistoteciais. Tendo em vista essa reversão e tendo em vista, também, a variação natural do A. nidulans, quanto à formação de cleistotécios, não parece ter ficado demonstrado, nos trabalhos, desses autores, a natureza verdadeiramente acleistotecial do mutante alba.

CROFT (1966), em nota publicada no Aspergillus News Letter, assinalou que testes de heterocários indicaram a participação de fatores extra cromossômicos no controle da diferença entre o estado cleistotecial e acleistotecial, em A. nidulans. Esse autor também usou, em seu trabalho, linhagens selvagens, e nessa nota prévia pouco esclarece sobre o assunto.

No presente trabalho foi verificado a participação de um fator extra nuclear na formação de cleistotécios em Aspergillus nidulans.

Constatou-se que a linhagem pro 1, paba 6, y; w 3 que em 684 colônias examinadas não havia formado cleistotécios (Quadros IV e V), ao receber citoplasma da linhagem sul ad 20 y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha passou a formá-los.

É interessante notar (Quadro XVV) que da linhagem pro 1, paba 6, y; w 3, isolada do 1º heterocário, em 80 colônias examinadas, nenhuma apresentou produção de cleistotécios; da linhagem isolada do 2º heterocário, em 92 colônias examinadas, 7 apresentaram produção de cleistotécios; e da linhagem isolada do 3º heterocário, em 40 colônias examinadas, 32 apresentaram produção de cleistotécios.

Constatou-se também uma certa anormalidade, nesses cleistotécios, pois 8 deles analisados revelaram-se in-

férteis (item 4.2.2, página 35) e a grande maioria parecia não ter atingido a maturidade, mantendo uma coloração amarelada. A razão disso não pôde ser inteiramente analisada. Um heterocário feito entre a linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha e a linhagem pro 1, paba 6, y; w 3 apresentou cleistotécios normais e 12 dêles analisados, pelo método descrito no item 3.4.4, na página 23, revelaram-se férteis e todos eram do tipo da linhagem pro 1, paba 6, y; w 3 (item 4.2.2, página 35).

Essas duas linhagens também foram colocadas em contato (Item 4.2.4, página 37) visando verificação infecção, mas dêsse modo a linhagem pro 1, paba 6, y; w 3, não apresentou produção de cleistotécios, e êsses só foram notados na junção das duas linhagens e na linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha. Todos os cleistotécios pareciam normais e 8 dêles, formados na junção das duas linhagens que foram analisados, revelaram-se férteis e todos eram híbridos (Item 4.2.4, página 37).

Um efeito de "infecção" não pôde, então, ser constatado, nesse caso. Também não se pôde verificar nenhuma influência de substâncias difundidas, no meio de cultura. O filtrado referido no item 4.2.3, na página 36, e adicionado ao meio completo, onde fôra inoculada a linhagem pro 1, paba 6, y; w 3 não parece ter produzido, nessa linhagem, nenhum efeito que pudesse ser notado. É possível, entretanto, que, no que diz respeito à produção de cleistotécios, o número de colônias examinadas tenha sido muito pequeno.

No presente trabalho embora tenha sido constatada a participação de fator extranuclear na formação de cleistotécios em A. nidulans, não foi possível verificar se mais de um fator interferia, nesse caso. Essa verificação seria de importância básica, no caso da hipótese que estamos considerando. Mas, nesse sentido, nenhuma investigação pôde ser le-

vada a efeito, pois apenas uma linhagem, a linhagem pro 1,
paba 6, y; w 3 pôde ser considerada acleistotecial, com rela
tiva segurança. E, em investigação dessa natureza em A.
nidulans, tôdas as precauções devem ser tomadas, para que
a variação natural dêsse fungo, quanto à produção de cleis-
totécios, não conduza a resultados imprecisos.

É evidente que o presente trabalho não apresen-
ta resultados que se constituam em provas claras da hipótese
que formulamos. Mas nessa questão, deve-se considerar que
diante dos poucos dados experimentais disponíveis, o campo
está aberto a especulações, e essa hipótese pode ter, ao me-
nos, o mérito de abrir perspectivas a outros trabalhos de
pesquisas.

6 - RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve por finalidade a realização de estudos correlacionados com a formação de cleistotécios em Aspergillus nidulans (Eidam) Winter.

1. Seis linhagens mutantes de A. nidulans, procedentes do estoque de Glasgow, Grã-Bretanha, foram analisadas com o fim de verificar a variação que apresentavam na produção de cleistotécios, e também para que se pudesse escolher linhagens cleistoteciais e acleistoteciais.

As linhagens analisadas foram:

- (1) y; nic 2; ribo 5
- (2) y; w 2; s 12; pyro 4
- (3) an 1, bi 1
- (4) y, ad 14; co
- (5) su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr 1; lys 5; cha
- (6) pro 1, paba 6, y; w 3

Pelos resultados obtidos, apenas a linhagem pro 1, paba 6, y; w 3 pôde ser considerada acleistotecial, com relativa segurança, pois não apresentou produção de cleistotécios em 684 colônias examinadas. As demais linhagens apresentaram produção de cleistotécios, embora essa produção tenha sido irregular e incerta, isto é, se bem que para a mesma linhagem sempre se utilizasse uma única colônia, para dessa, se obterem as demais, essas linhagens sempre deram origem a colônias produtoras e colônias não produtoras de cleistotécios.

O número de colônias produtoras e não-produtoras de cleistotécios variou em relação à vedação ou não vedação,

das placas de petri, com fita celulósica.

Constatou-se também uma determinada influência do método de inoculação. Comparou-se a "transferência por picada", em que se transferia micélios e conídios do fungo, por meio de um fio de platina, com a "transferência monocolonial" em que se transferia a colônia inteira (colônia proveniente de um único conídio), em bloco de meio sólido. Verificou-se, então, que a "transferência por picada" favorecia o aparecimento de colônia cleistotecial.

Constatou-se ainda um certo efeito do meio de cultura usado. Quando se usou meio mínimo suplementado com sulfito e piridoxina, em vez de meio completo sólido, houve um aumento no número de colônias que produziram cleistotécios. Esse aumento foi ainda maior quando se usou placas contendo meio completo sólido, no centro, e meio mínimo suplementado com 2% do meio completo sólido, na periferia.

Verificou-se, também, que, quando as colônias procediam de uma colônia que havia produzido cleistotécios, o número de colônias cleistoteciais era maior, do que quando as colônias procediam de uma colônia que não havia produzido cleistotécios.

Quanto à temperatura, constatou-se, que em placas vedadas, a temperatura de 37°C favoreceu o aparecimento de colônias produtoras de cleistotécios.

Convém assinalar que êsses efeitos todos foram constatados em certas e determinadas linhagens e não se sabe até que ponto êles podem ser generalizados.

2. Considerando-se que a linhagem pro 1, paba 6 y; w 3 era acleistotecial, procurou-se transferir, para essas linhagens, citoplasma da linhagem su 1 ad 20, y, ad 20, paba 1; Acr; lys 5; cha, que havia dado ori

gem a grande número de colônias produtoras de cleistotécios.

Para isso foram feitos 3 heterocários sucessivos entre essas duas linhagens, usando-se sempre nos 2 casos possíveis, a linhagem pro 1, paba 6, y: w 3 reisolado do heterocário anterior.

A linhagem pro 1, paba 6, y: w 3, isolada de cada heterocário foi analisada, obtendo-se o seguinte resultado:

Linhagem isolada do	Nº de colônias que produziram cleistotécios	Nº de colônias que não produziram cleistotécios	Total de colônias examinadas
1º heterocário	0	80	80
2º heterocário	7	85	92
3º heterocário	32	8	40

Esses resultados sugerem que fatores extracromossômicos interferem na produção de cleistotécios em A.nidularis.

Embora se tenha procurado verificar efeito de "infecção", e de substâncias difundidas no meio, nenhum desses efeitos foi constatado.

3. Quanto à formação de cleistotécios em A. nidularis é sugerido que ela poderia estar na dependência de dois fatores citoplasmáticos. Os citoplasmas em que estivessem esses dois fatores não poderiam se diferenciar em órgãos sexuais, ou não produziram substâncias que iriam interferir nessa diferenciação, ou na formação de cleistotécios. Mas esses fatores poderiam se dispersar, quando do desenvolvimento dos micélios, e dar origem a órgãos sexuais, fisiologicamente diferentes, de cuja união, resultariam os cleistotécios, ou, então, a dispersão desses fatores, poderia dar origem a hifas que produzissem substâncias diferentes e, essas substâncias quando reunidas, iriam interferir na formação de cleistotécios.

7 - SUMMARY

Haploid strains of Aspergillus nidulans were used in an attempt to study the variation in the production of cleistothecium. Six strains were analysed. From these strains 5 produced cleistothecia.

Erratic variation in the production of cleistothecium was observed. Colonies originated from strains which produce cleistothecium segregate into cleistothecial and acleistothecial forms. The number of cleistothecial and acleistothecial colonies showed variation under several conditions.

A heterokaryon transfer teste indicated the participation of an extrachromosomal factor in the control of the difference between the cleistothecial and acleistothecial states.

The genetic control of the formation of cleistothecium is discussed.

8 - BIBLIOGRAFIA CITADA

- ARLETT, C. F. - 1960 - A System of Cytoplasmic Variation in Aspergillus nidulans - Heredity 15: 377-388.
- AZEVEDO, J.L. de - 1966 - Estudos Sôbre Recessivos Letais em Aspergillus nidulans (Eidam) Winter - Tese de Livre Docência apresentada a ESALQ, Piracicaba - São Paulo - 121 pg.
- BAINBRIDGE, B.W. - 1964 - The Arginine Crossing Technique - Aspergillus News Letter, 6:8.
- BARACHO, I.R. - 1967 - Perithecium size and hybridization in Aspergillus nidulans - Aspergillus News Letter, 8: 16-17.
- BARACHO, I.R. - 1968 - Estudos sôbre Corpos de Frutificação em Aspergillus nidulans (Eidam) Winter - Tese para obtenção do título de "Magister Scientiae" apresentada a ESALQ, Piracicaba - São Paulo - 57 pg.
- BARRATT, R.W., G.B. JOHNSON & W.N. OGATA - 1965 - Wild Type and Mutant Stocks of Aspergillus nidulans - Genetics, 52: 233-246.
- BARY, A. de - 1854 - Ueber die entwickeling und den zusammenhang von Aspergillus glaucus und Eurotium - Botan. Zgt 12: 425-434; 441-451; 465-471.
- BENJAMIN, C.R. - 1955 - Ascocarps of Aspergillus and Penicillium - Mycologia 47: 669-687.
- BLAKESLEE, A.F. - 1904 - Sexual Reproduction in the Mucoraceae - Proc. Amer. Acad. Arts and Sci. 40: 205-319.

- BLOCHWITZ, A. - 1932 a - Perithechien, Sklerotien und Eidamsche Blasen der Aspergillaceen - Botan. Centr. Beih., Abt. A, 49: 262-292.
- BLOCHWITZ, A. - 1932 b - Die Urformen der Aspergillen - Hedwigia 72: 173-174.
- BLOCHWITZ, A. - 1932 c - Variabilität und Vererbend bei Schimmelpilzen. Ber. deut. botan. Ges. 50: 248-256.
- COCHRAN, W.G. - 1954 - Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests - Biometrics 10: 417-451.
- CROFT, J.H. - 1966 - Control of Perithecial Production - Aspergillus News Letter, 7: 7.
- DALE, E. - 1909 - On the Morphology and Cytology of Aspergillus repens de Bary - Ann. Mycol. 7: 215-225.
- DANGEARD, P.A. - 1907 - L'origine du périthèce chez les ascomycètes - Le Botaniste 10 : 1-385.
- EIDAM, E. - 1883 - Zur Kenntniss der Entwicklung bei den Ascomyceten - III. Sterigmatocystis nidulans n.sp. In F.S. Cohn. Beitr. Biol. Pflanz. 3: 392-411.
- ELLIOTT, C.G. - 1960 - The Cytology of Aspergillus nidulans - Genet. Research 1: 462-476.
- FENNELL, D.I. & J. H. WARCUP - 1959 - The Ascocarps of Aspergillus alliaceus - Mycologia 51: 409-415.
- FEAZER, H.C.I. & H.S. CHAMBERS - 1907 - The Morphology of A. herbariorum - Ann. Mycol. 5: 419-431.

- GREENE, H.C. - 1933 - Variation in Single Spore Cultures of Aspergillus fischeri - Mycologia 25: 117-138.
- GUPTA, D.D. - 1951 - Sporulation and Aversion in Eurotium herbariorum (Wigg). Indian Phytopathol 4:106-115.
- HEMMONS, L.M., G. PONTECORVO & A.W.S. BUFTON -1952- Perithecium Analysis in Aspergillus nidulans - Heredity 6: 135.
- HENRARD, P.- 1934 - Polarité, Héredité et Variation, chez Diverses Espèces d'Aspergillus -Cellule 43 : 351-424.
- JINKS, J.L. - 1954 - Somatic Selection in Fungi- Nature Lond. 174: 409-410.
- JINKS, J.L. - 1956 - Naturally occurring Cytoplasmic Changes in Fungi - C.R. Lab. Carlsberg, ser.Physiol. 26: 183-203.
- JINKS, J.L. - 1957 - Selection for Cytoplasmic Differences - Proc. Roy. Soc. B., 146: 527-540.
- KÄFER, ETTA - 1965 -Origins of Translocation in Aspergillus nidulans - Genetics 52: 217-232.
- KNIEP, H. - 1928 - Die Sexualität der niederen Pflanzen, Differenzierung, Verteilung, Bestimmung, und Vererbund des Geschlechts bei den Thallophyten - G. Fischer Jena 544 pg.
- MOHONEY, M. & D.WILKIE -1958 -An Instance of Cytoplasmic Inheritance in Aspergillus nidulans - Proc. Roy. Soc. B., 148: 359-361.

- MAHONEY, M. & D. WILKIE - 1962 - Nucleo-cytoplasmic Control of Perithecial Formation in Aspergillus nidulans - Proc. Roy. Soc. B., 154: 524-532.
- MOREAU, F. & M. MOREAU - 1953 - Étude du Développement de quelques Aspergillacées - Rev. mycol. 18: 163-180.
- OLIVE, L.S. - 1944 - Development of Perithecium in Aspergillus fischeri Wehmer, with a description of crozier formation - Mycologia 36: 266-275.
- OLIVE, L.S. - 1954 - Heterothallic Behavior in the Aspergillaceae - Mycologia 46: 254-255.
- OLIVE, L.S. - 1958 - On the Evolution of Heterothallism in Fungi - Am. Natur., 92: 233-251.
- PIMENTEL GOMES, F. - 1966 - Curso de Estatística Experimental - ESALQ - Piracicaba - São Paulo - 404 pg.
- PONTECORVO, G. - 1949 - Auxanographic technique in Biochemical Genetics - J. gen. Microbiol., 3: 122-126.
- PONTECORVO, G., E. FORBES & O.B. ADAM - 1949 - Genetics of Homothallic Ascomicete Aspergillus nidulans - Heredity 3: 385.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONS, K.D. MACDONALD & A.W. J. BUFTON - 1953 - The genetics of Aspergillus nidulans - Advances in Genet. 5: 142-238.
- RAPER, K.B. & D.I. FENNELL - 1965 - The Genus Aspergillus - Williams & Wilkins, - Baltimore - 686 pg.
- SCHWARTZ, W. - 1928 - Entwicklungsphysiologische Untersuchungen über die Gattungen Aspergillus und Penicillium. I-Aspergillus-Arten. Flora (Jena) 23: 386-440.

SHARPE, H.S.- 1956- Extra-nuclear inheritance in a Homothallic Fungus - Heredity 10: 280.

SHARPE, H.S.- 1958- A closed System of Cytoplasmic variation in Aspergillus glaucus - Proc. Roy. Soc.B., 148: 355.

SMITH, G.- 1957 - An Introduction to Industrial Mycology - Arnold. London. 399 pg.

SNEDECOR, G.M. - 1956 - Statistical Methods - The Iowa State College Press., Ames, Iowa. 534 pg.

YUILL, E.-1950- The Number of Nuclei in Conidia of Aspergillus- Trans. Brit., Mycol. Soc., 33: 324-331.