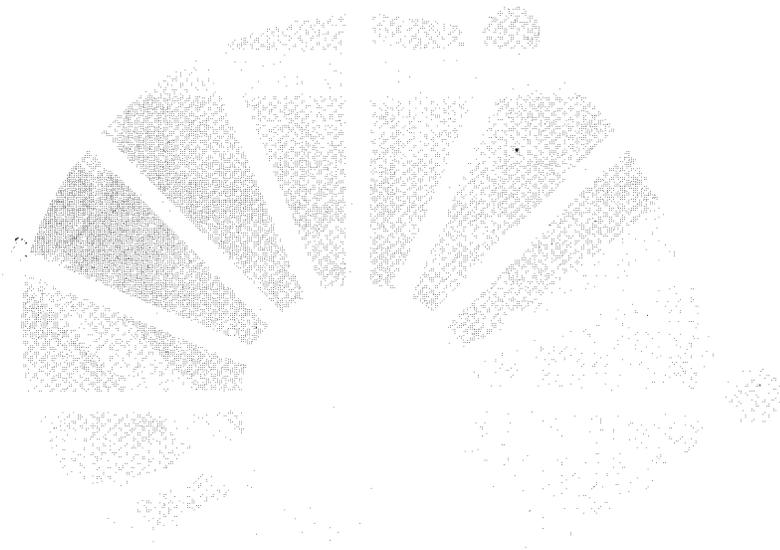


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/38965
IB/80859



INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

B23



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

MARTA DOS SANTOS BARACHO

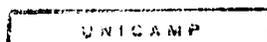
**MUTAÇÕES ESPONTÂNEAS RELACIONADAS AO GENE *methG*₁ DE
*Aspergillus nidulans***

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Marta dos Santos Baracho e aprovada pela Comissão Julgadora. 27/01/99

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Unicamp para obtenção do título de Doutor, área de concentração Genética

ORIENTADOR: Prof. Dr. IVANHOÉ RODRIGUES BARACHO

**Campinas-SP
1999**



UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	B23m
V.	Ex.
TOMBO BC/	38965
PROC.	229199
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
FRECO	R\$ 11,00
DATA	07/10/99
N.º CPD	

CM-00126389-5

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Baracho, Marta dos Santos
B23m Mutações espontâneas relacionadas ao gene *methG*₁ de *Aspergillus nidulans*/Marta dos Santos Baracho. - - Campinas, SP:[s.n.], 1999.
 108f.:ilus.

Orientador: Ivanhoé Rodrigues Baracho
 Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. *Aspergillus nidulans*. 2. Fungos. 3. Mutantes. I. Baracho, Ivanhoé Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 27 de agosto de 1999

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. Ivanhoé Rodrigues Baracho (Orientador)



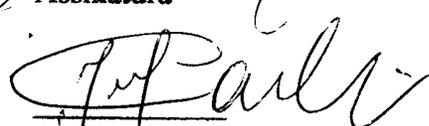
Assinatura

Prof. Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena



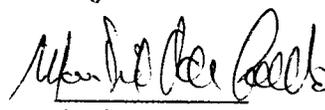
Assinatura

Prof. Dr. José Carlos da Silva



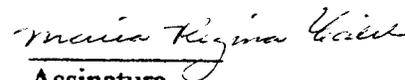
Assinatura

Prof. Dr. Marcos David Figueiredo de Carvalho



Assinatura

Prof. Dra. Maria Regina Calil



Assinatura

SUPLENTES:

Prof. Dr. Tomonasa Yano

Assinatura

Prof. Dr. Wanderlei Dias da Silveira

Assinatura

A meu pai por sua sabedoria e grande amizade

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e em especial:

Ao prof. Ivanhoé Rodrigues Baracho, pela confiança, amizade e excelente orientação.

Aos professores, Aquiles E. Piedrabuena, José Carlos da Silva e Maria Regina Calil pela leitura deste trabalho.

Ao prof. Aquiles E. Piedrabuena por suas sugestões e grande amizade.

Ao professor e amigo Marcos D.F. Carvalho pela amizade .

Ao meu pai por ter me iniciado no mundo da ciência e por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida.

A minha mãe pelo seu carinho, ternura e dedicação a família.

Ao Beto, pelo carinho, amizade, atenção e pôr tornar a minha vida mais significativa. .

As amigas Leila e Melina, pela atenção dispensada nos momentos alegres e tristes da minha vida.

A Cynira pela atenção dispensada nos momentos difíceis

A Cacá pela grande amizade e compreensão nas horas precisas.

Aos meus irmãos pelo carinho que sempre tiveram por mim.

A Patrícia, Maria Amélia, Felipe e Fernanda, pela compreensão e por tornarem a minha vida mais alegre.

A Teresa, Célia, Ana Rita, Ernestina, Patrícia e Zaira pela atenção e amizade.

Aos amigos Juverlandi, Maria, Gisa, Regina, Ricardo, Gilberto, Ricardo Destefano, Liliam, Maria Elena, Joaquim, Ingrid, Dilaine, Edson, Raquel, Célia, tornarem os dias mais agradáveis.

A Teresa, Célia, Ana Rita, Ernestina e Patrícia pela atenção e amizade.

A Capes pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO	XI
SUMMARY	XIII
1.0. Introdução	1
2.0. Revisão Bibliográfica	4
2.1. Estudo quantitativo de células sujeitas à mutação	4
2.2. Mutações espontâneas relacionadas ao gene <i>meth</i> de <i>Aspergillus nidulans</i>	10
2.3. Métodos de determinação da taxa de mutação em bactéria	12
2.4. Considerações sobre a taxa de mutação em organismos que crescem em forma micelial	19
3.0. Material e Métodos	20
3.1. Linhagem utilizada	20
3.2. Meios de Cultura	20
3.2.1. Meio Mínimo	20
3.2.2. Meio Completo	23
3.3. Soluções	24
3.3.1. Solução de Vitaminas	24
3.3.2. Solução Salina	24
3.3.3. Solução de Tween	25
3.3.4. Solução de Biotina	25
3.3.5. Tampão Fosfato	25
3.3.6. Solução Fixadora	25
3.3.7. Solução Estoque de Giemsa.	26
3.3.8. Solução de HCl	26
3.4. Esterilização e Temperatura de Incubação	26
3.5. Análise das Mutações	27
3.5.1. Determinação do número de mutantes	27
3.6. Determinação do tamanho e do volume das colônias	29
3.7. Determinação do número de conídios nas colônias	29
3.8. Determinação do número de núcleos em hifas de volume conhecido	30
3.9. Determinação do número de cabeças conidiais	31

3.10.	Determinação do tamanho das cabeças conidiais e do número de conídios por cabeça	31
3.11.	Determinação da viabilidade dos conídios	33
3.12.	Modelo Matemático	34
4.0.	Resultados	40
4.1.	Número de mutantes	40
4.2.	Tamanho e volume das colônias	48
4.3.	Número de conídios por colônias	50
4.4.	Número de núcleos nas hifas	50
4.5.	Número e tamanho de cabeças conidiais	53
4.6.	Número de conídios por cabeça	57
4.7.	Viabilidade dos conídios	57
5.0.	Discussão	62
5.1.	O método e os dados em geral	62
5.1.1.	O tamanho das colônias. O número e a viabilidade dos conídios	62
5.1.2.	Cabeças conidiais, quantidade de núcleos, volume das colônias	64
5.2.	Os mutantes	68
5.2.1.	A frequência de mutantes	68
5.2.2.	A média de núcleos que mutaram	73
5.3.	O modelo	81
6.0.	Conclusões	87
7.0.	Bibliografia	88
8.0.	Apêndice	99

RESUMO

Mutações relacionadas ao gene *methG*₁, da linhagem *bioA*₁ *methG*₁, de *Aspergillus nidulans*, foram analisadas, com o fim de verificar a possibilidade de haver locais preferenciais, para a ocorrência de mutações, que se expressam em colônias provenientes de conídio, e de estudar modelo matemático, que possibilitasse a determinação da taxa de mutação por núcleo, por geração, em fungos filamentosos.

Para esse fim, a linhagem era inoculada com um replicador de 26 agulhas, em placas de Petri contendo meio de cultura, e as nove colônias centrais foram analisadas em diversos aspectos. Foram determinados o tamanho e o volume das colônias, o número de conídios e de núcleos em cada colônia, a viabilidade dos conídios, o comprimento das cabeças conidiais e o número de conídios por cabeça.

Em relação às mutações, 99 colônias foram analisadas e, para cada uma, foi determinado o número e o tipo de reversão ocorrido. Para cada tipo de reversão, procurou-se também verificar se as frequências obtidas se ajustavam à Distribuição de GREENWOOD e YULE.

Os dados levaram à conclusão que as mutações analisadas se realizam, preferencialmente, em nível de esterigma, e que o modelo matemático estudado possibilita determinar a taxa de mutação, por núcleo, por geração.

SUMMARY

Mutations related to gene *methG*₁ of *Aspergillus nidulans* were analyzed in order to verify if there is a preferential site where these mutations occur, and to study a mathematical model for the determination of the mutation rate per nucleus per generation, in filamentous fungi.

A replica plating technique was used to inoculate in a single operation 26 colonies of the strain, in Petri dishes containing culture medium. But only the nine central colonies were analyzed for size and volume, number of conidia and nuclei in each colony, viability of conidia, size of the conidial heads and number of conidia in each conidial head.

Using this technique, 99 central colonies were analyzed with regard to the appearance of mutation and the number and type of reversions were determined for each colony. The frequencies obtained for each reversion were analyzed in order to verify if they followed a Greenwood and Yule distribution.

From the data obtained we may conclude that the mutations analyzed occur preferentially in the sterigma and that, by means of the mathematical model studied, it is possible to determine the mutation rate per nucleus, per generation, in filamentous fungi.

1.0. INTRODUÇÃO

Na determinação da taxa de mutação espontânea, em microrganismos, dois pontos podem ser destacados: a determinação em organismos que crescem em forma de células livres e a determinação em organismos que crescem em forma micelial.

Em relação ao primeiro ponto, ressalta-se os estudos sobre populações bacterianas sujeitas à mutação. Os aspectos matemáticos desse problema, embora tenham sido considerados antes (DESKOWITZ e SHAPIRO, 1935; BUTING, 1940 a e b), começaram a assumir importância maior a partir de 1943, com o trabalho de LURIA e DELBRUCK.

Outros estudos matemáticos deste assunto surgiram, tais como os de SHAPIRO (1946), LEA e COULSON (1949), e ARMITAGE (1952 e 1953).

Tais estudos possibilitaram o aparecimento de vários métodos para determinação da taxa de mutação espontânea, em organismos que crescem em forma de células livres.

Esses métodos, embora possam não ser inteiramente satisfatórios, permitem estimativas aceitáveis.

No que diz respeito a determinação da taxa de mutação espontânea, em organismos que crescem em forma micelial, não existem estudos esclarecedores do problema. Neste caso, a determinação da taxa de mutação oferece alguma dificuldade e normalmente não é estabelecida. O ideal seria a determinação da probabilidade de mutação por núcleo e por geração, como se procura fazer em bactéria. Mas, como no caso de fungos filamentosos as

amostras de núcleos somente podem ser facilmente obtidas através de esporos, o que se faz, normalmente, é determinar a proporção de mutantes, entre os esporos formados, sem considerar se a mutação ocorreu na formação do esporo, ou em divisões nucleares anteriores.

Sabe-se que o gene *methG*₁ em *Aspergillus nidulans* reverte espontaneamente com frequência alta de 1 em 6×10^4 conídios (LILLY, 1965).

LILLY (1965) verificou que esses revertentes caíam em três tipos visíveis que denominou de A, B e C.

Esse sistema de reversão, referente ao gene *methG*₁ de *Aspergillus nidulans*, pode ser explorado com vistas a verificar se há, nos fungos, locais preferenciais de ocorrência de mutação, ou seja, se as mutações ocorrem, preferencialmente, nos esterigmas ou em divisões nucleares anteriores.

Esse sistema também pode ser utilizado para estudar modelos que possibilitem a determinação da taxa de mutação espontânea em organismos que crescem em forma micelial.

Os objetivos deste trabalho são, portanto:

1- Verificar se há na linhagem *bioA*₁, *methG*₁ de *Aspergillus nidulans*, locais preferenciais de ocorrência de mutação .

2- Estudar modelos matemáticos que possibilitem a determinação da taxa de mutação espontânea para reversões relacionadas ao gene *methG*₁.

Esses estudos são justificados, primeiro, pelo fato de não se ter modelos testados para determinação de taxa de mutação em fungos filamentosos, e também porque é uma hipótese válida, assumir-se que células

diferentes mutam em taxas diferentes, e, por conseguinte, regiões diferentes dos organismos podem apresentar taxas de mutação diferenciadas.

No caso dos fungos filamentosos, podemos esperar que regiões diferentes das colônias, ou estruturas diferenciadas do micélio, apresentem núcleos com capacidade diferente de mutar, mesmo que estes núcleos tenham a mesma origem.

Essa suposição merece ser analisada, tendo em vista que em clones de bactérias, alguns trabalhos, como o de De COURCY Jr (1973), parecem demonstrar que algumas células têm propensão a mutar.

O trabalho visa, portanto, analisar o problema das mutações espontâneas, em fungos filamentosos, procurando, sobretudo, verificar a possibilidade de determinar a taxa de mutação.

2.0. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ESTUDO QUANTITATIVO DE CÉLULAS SUJEITAS À MUTAÇÃO

O acesso a estudos estatísticos, envolvendo populações de bactérias sujeitas à mutação, tornou-se possível desde a publicação do trabalho de LURIA e DELBRUCK (1943), os quais procuraram investigar a natureza da variação, a fim de verificar qual teoria era válida, se a teoria genética das mutações ou a teoria da adaptação fenotípica. Com esse objetivo, propuseram um modelo de crescimento da população bacteriana, e de ocorrência de mutantes. Em essência, eles consideraram que, tanto os mutantes quanto os selvagens, tinham um crescimento exponencial e que cada célula não mutante tinha uma pequena probabilidade de mutar durante um pequeno intervalo de tempo. Admitindo que a ocorrência de mutação era independente, em cada intervalo de tempo, consideraram que as mutações ocorriam segundo a distribuição de POISSON. Segundo esse modelo, a variância teórica do número de mutantes deveria ser bem maior do que o previsto na teoria da adaptação fenotípica. Isso porque cada mutante surgido poderia dar origem a muitos outros. E foi justamente o que os autores encontraram em seus experimentos, uma grande variação do número de mutantes, presentes em culturas paralelas, crescidas no mesmo intervalo de tempo, o que estava mais de acordo com a teoria genética das mutações do que com a teoria da adaptação fenotípica.

Baseado nesse modelo os autores estabeleceram dois métodos para estimar a taxa de mutação em bactérias.

Outros estudos referentes a este problema surgiram posteriormente, merecendo destaque os trabalhos de SHAPIRO (1946), LEA e COULSON (1949), ARMITAGE (1952), KENDAL (1953), CRUMP e HOEL (1974), MORROW (1975), GREEN *et al* (1976), GILBERT (1980), COLLINGS e OCHLERT (1981), FU *et al* (1982), KOCH (1982), LI *et al* (1985), KENDAL e FROST (1988), HOEVEN *et al* (1990), STEWART *et al* (1990), STEWART (1991), KOZIOL (1991), SMITH (1992), KIMMEL e AXEROLD (1994), ROSSMAM *et al* (1995), JAEGER e SARKAR (1995), NÁDAS *et al* (1996a e 1996b) e CRANE *et al* (1996).

LEA e COULSON (1949) foram, provavelmente, os primeiros que conseguiram obter a distribuição completa do número de mutantes presentes em uma população bacteriana. Eles estudaram dois modelos, os quais por métodos aproximativos levaram à mesma distribuição. Em ambos consideravam que os não mutantes se reproduziam segundo um modelo determinista como o de LURIA e DELBRUCK (1943). Os mutantes, pelo primeiro modelo, apresentavam um tempo de geração distribuído exponencialmente, e a taxa média de crescimento dos clones mutantes era a mesma das populações selvagens. Pelo segundo modelo admitiram que os clones mutantes apresentavam um crescimento determinista e discreto, de um modo exponencial. Os autores também estudaram quatro métodos de estimativa de taxa de mutação em bactérias .

Os modelos de LURIA e DELBRUCK (1943) e de LEA e COULSON (1949) não consideram a possibilidade de um retardamento fenotípico, isto é, um retardamento na expressão fenotípica do gene mutante. Esse retardamento fenotípico poderia explicar certas discrepâncias entre os valores encontrados para taxa de mutação, calculados por métodos diferentes (NEWCOMBE, 1948).

ARMITAGE (1952) modificou alguns modelos propostos a fim de que o retardamento fenotípico fosse considerado. Em seu trabalho ele fez também uma excelente análise, sob o ponto de vista matemático e estatístico, da teoria do crescimento de populações celulares sujeitas à mutação. Comparando a distribuição teórica de LEA e COULSON (1949), com dados provenientes de populações bacterianas, verificou um desacordo considerável, mesmo quando levava em conta o retardamento fenotípico.

Em trabalho posterior, também sobre a teoria estatística das mutações em bactéria, ARMITAGE (1953) analisou as distribuições teóricas até então propostas, especificando as restrições que deveriam ser consideradas na teoria de LURIA e DELBRUCK (1943) e de LEA e COULSON (1949) e discutiu vários métodos para estimativa de taxa de mutação em bactérias .

CRUMP e HOEL (1974) não apenas estudaram diversos modelos matemáticos de crescimento de população de células sujeitas a mutação, mas também analisaram o efeito do retardamento fenotípico nas estimativas. Esses autores chegaram a sugerir um procedimento para se obter informações acerca da duração desse retardamento.

MORROW (1975) estudou a relação entre taxa de mutação *in vivo* e *in vitro*.

GREEN, MURIEL e BRIDGES (1976) simplificaram o teste de flutuação de LURIA e DELBRUCK (1943), para detectar níveis baixos de mutagênicos, na presença e ausência da mutação.

GILBERT (1980) descreveu métodos para analisar os testes de flutuação.

COLLINGS, MARGOLIN e OEHLERT (1981) fizeram um estudo das propriedades estatísticas do teste de flutuação proposto por GREEN *et al* (1976).

FU, LI e CHU (1982) estudaram processos para determinar vários parâmetros na análise quantitativa de taxas de mutação, em culturas de células somáticas de mamíferos.

KOCH (1982) generalizou os modelos de LEA e COULSON (1949), para casos onde a taxa de crescimento de mutante pode ser diferente do não mutante, considerando também um retardamento fenotípico.

LI, WU, FU e CHU (1985) estimaram a taxa de mutação, em culturas de células de mamíferos, utilizando um método determinista que permitia estimar essa taxa quando células do tipo selvagem e tipo mutante apresentavam crescimento diferente.

LI e CHU (1987) fizeram uma comparação entre cinco diferentes métodos estatísticos, para estimar a taxa de mutação, em culturas de *hamster chinês* V 79. Os métodos comparados foram: LURIA e DELBRUCK (1943), os de LEA e COULSON (1949) e ARMITAGE (1953). Concluíram que o método de máxima verossimilhança, (LEA e COULSON, 1949), é o mais eficiente.

KENDAL e FROST (1988) adaptaram o procedimento descrito por LURIA e DELBRUCK (1949), para estimar taxa de mutação em culturas de células de mamíferos resistentes a drogas tóxicas.

HOEVEN, KOOLJMAN e RAAT (1990) descreveram um modelo que permite calcular a taxa de mutação, baseado na relação entre mutagenicidade e o número de revertentes por colônia.

STEWART, GORDON e LEVIN (1990) estudaram a distribuição de probabilidade do número de mutantes em diferentes condições. Em seu trabalho, procuraram simplificar os cálculos em situações onde dois ou mais tipos de mutações possam ocorrer em uma única cultura.

STEWART (1991) descreveu um procedimento eficiente para calcular a distribuição de probabilidade do número de mutantes, que possam ser observados em experimento de teste de flutuação, desde que a taxa de mutação por divisão celular permaneça constante durante o experimento.

KOZIOL (1991) comparou o método da máxima verossimilhança (LEA e COULSON, 1949) e o método baseado no número de cultura sem mutantes (LURIA e DELBRUCK, 1943). Assinala que o método da verossimilhança (LEA e COULSON, 1943), é o mais eficiente.

SMITH (1992) revisou fatores genéticos e experimentais que afetam o resultado de mutações espontâneas.

KIMMEL e AXELROD (1994) compararam o modelo de LURIA e DELBRUCK (1943) com outros modelos que incluem reversibilidade e mais de um estágio de mutação.

CRANE, THOMÁS e JONES (1996) investigaram a precisão com que taxas de mutação podem ser estimadas, usando modificações no protocolo do teste de flutuação de LURIA e DELBRUCK (1943). Modificações estas que envolvem um maior crescimento de cultura em relação ao usual e um plaqueamento usando pequenas alíquotas.

JONES (1994) desenvolveu uma distribuição de probabilidade para o tamanho dos clones bacterianas levando em conta a presença do crescimento entre o mutante e o tipo selvagem e derivou a distribuição de probabilidade do tamanho dos clones dos mutantes, levando em conta, simultaneamente, a taxa de crescimento diferencial e a sobrevivência de somente um fração de mutantes em meio seletivo.

JAEGER e SARKAR (1995) estudaram a distribuição e o efeito da adaptação de bactérias mutantes e não mutantes. Observaram que adaptação diferencial de mutantes e não mutantes não afeta a média da distribuição, embora diminua a variância.

ROSSMAM, GONCHAROVA e NÁDAS (1995) apresentaram uma breve revisão dos tratamentos matemáticos para mutação espontânea e apresentam um novo modelo, para calcular a taxa de mutação em culturas de células de mamíferos.

NÁDAS, GONCHAROVA e ROSSMAN (1996a e 1996b) discutiram a confusão que surge quando modelos matemáticos para bactérias são adaptados para calcular a taxa de mutação, em culturas de células de mamíferos.

2.2. MUTAÇÕES ESPONTÂNEAS RELACIONADAS AO GENE *meth* de *Aspergillus nidulans*

LILLY (1965), estudando mutantes *methG*₁ em *A. nidulans*, observou que eram capazes de serem suprimidos por genes supressores específicos e não ligados ao *locus* mutante.

O gene *meth*₁ em *A. nidulans* reverte, espontaneamente, com frequência alta de 1 em 6×10^4 conídios, que é pelo menos 100 vezes maior que a frequência encontrada para outros *loci*, como *ad 8*, *lys 5*, etc (LILLY, 1965) . Verificou-se que esses revertentes caíam em 3 tipos visíveis : Tipo A, Tipo B e Tipo C.

O Tipo A são colônias grandes e verdes, de aspecto semelhante ao tipo selvagem.

O Tipo B são colônias menores que A, com pigmento marrom e esporulação escassa .

O Tipo C são colônias pequenas, verdes, com um halo hialino, aspecto compacto e densamente esporulada.

LILLY (1965) reconheceu também que o Tipo A e C são independentes, e devidos a pelo menos dois *loci* cada um.

Além dos 3 Tipos mencionados, ocorre em menor frequência um mutante morfológico atípico, semelhante à maioria dos pertencentes ao Tipo B, produzindo pigmentos mais escuros, denominados “pseudo B” (ALDERSON e CLARK, 1966). Estes autores agruparam as colônias “pseudo B” com o Tipo A.

GAJEWSKI e LITWINSKA (1968) observaram em mutantes deficientes para metionina, que as reversões eram devidas à supressão.

BALL (1967), estudando a supressão do mutante *meth₁* em *A. nidulans*, verificou que a supressão era provocada por uma translocação de parte do cromossomo IV para o cromossomo V. A translocação, ocasionando quebra e fusão de dois cistrons de cromossomos diferentes, daria formação a um novo cistron que determinaria a síntese de uma proteína capaz de suprir a deficiência para metionina. Verificou-se também que o segmento translocado continha o mutante *arg₂* e que ocorria supressão desse mutante, em consequência, talvez, de um efeito de posição.

GAJEWSKI e LITWINSKA (1968) propuseram uma classificação dos mutantes da maneira que segue:

Tipo 1 - pelo agrupamento do Tipo A e C de LILLY(1965)

Tipo 2 - é o tipo B de LILLY (1965)

Tipo 3 - é formado por colônias compactas, brancas e pequenas.

Tipo 4 - enquandram-se todas as outras colônias que não se encaixam nos tipos anteriores.

A união dos tipos A e C é justificada pela dificuldade que se encontra, algumas vezes, em não poder distinguir os Tipos A e C (PUTRAMENT *et al*, 1970) .

SCOTT e ALDERSON (1971) analisando, os revertentes do Tipo B, verificaram que o fenótipo B se deve a dois genes distintos.

ROCHA (1983) sugeriu uma nova classificação, que nada mais é que a junção das duas outras. Assim os tipos A, B e C são os de LILLY, os outros (D e E) são os 3 e 4 de GAJEWSKI e LITWINSKA , respectivamente.

2.3. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA TAXA DE MUTAÇÃO EM BACTÉRIAS

Baseados nos estudos referidos no item 2.1. foram propostos vários métodos para determinação da taxa de mutação em bactérias.

A taxa de mutação pode ser definida como a probabilidade de mutação por célula e por geração (HAYES, 1968). Para estimar essa taxa, em organismos que crescem em forma de células livres, vários métodos têm sido sugeridos, embora nenhum deles seja inteiramente satisfatório. Entre esses métodos destacam-se os seguintes:

MÉTODO 1- DETERMINAÇÃO BASEADA NO NÚMERO DE CULTURAS SEM MUTANTES

Este é um método proposto por LURIA e DELBRUCK (1943). Baseia-se no princípio segundo o qual a ocorrência da mutação é independente, em cada intervalo de tempo, e segue uma distribuição de POISSON. Desse modo tendo-se uma série de culturas (C), com N bactérias, em algumas culturas não vão aparecer mutantes (C_o). A média dos mutantes que surgiram (m) pode ser estimada como segue:

$$\frac{C_o}{C} = e^{-m} \qquad m = -\ln\left(\frac{C_o}{C}\right)$$

onde : ln = logaritmo neperiano

e = base de ln

A taxa de mutação a seria dada pela fórmula:

$$a = \frac{m \cdot \ln 2}{N}$$

Em condições ideais, este método é altamente eficiente para $m < 0,5$ e bastante satisfatório para $m < 1$. Mas é também influenciado pelo retardamento fenotípico.

MÉTODO 2- MÉTODO DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.

O método da máxima verossimilhança, em condições ideais, é indiscutivelmente, o mais eficiente. Ele é descrito, em detalhe, por LEA e COULSON (1949), os quais organizaram tabelas para facilitar os cálculos.

MÉTODO 3 - MÉTODO DA MEDIANA (LEA e COULSON, 1949)

É um método para ser usado quando se deseja estimar a taxa de mutação em um experimento, onde todas ou quase todas as culturas apresentarem mutantes. As culturas com r mutantes são arranjadas em ordem

ascendente e a cultura do meio selecionada. O número de mutantes nesta cultura é uma estimativa de r_0 , a mediana da distribuição de r .

A média de mutantes que apareceram pode ser estimada pela fórmula:

$$\frac{r_0}{m} - \ln \cdot m = 1,24$$

Conhecido m , a taxa de mutação a será determinada por:

$$a = \frac{m \cdot \ln 2}{N}$$

LEA e COULSON (1949) organizaram tabelas para facilitar o cálculo de m por este método.

Com o uso dessas tabelas o método é bastante rápido e pode ser usado para fazer estimativas preliminares a serem utilizadas em métodos mais elaborados.

MÉTODO.4. - DETERMINAÇÃO BASEADA NA EQUAÇÃO $\Sigma x=0$ (LEA e COULSON, 1949)

Os valores de r podem ser transformados pela equação:

$$x = \frac{11,6}{\frac{r}{m} - \ln \cdot m + 4,5} - 2,02$$

x apresenta, no caso, uma distribuição aproximadamente normal. Como a média dessa distribuição é aproximadamente 0, uma estimativa de m pode ser feita em um conjunto de C observações experimentais. Usando-se esse método pode-se fazer uma primeira estimativa pelo método da mediana. O valor de m , então encontrado, é substituído na equação acima, e cada valor experimental de r é convertido em um valor de x . A seguir efetua-se a soma. Uma série de valores próximo ao de m é experimentado na procura do valor que faça $\Sigma x = 0$.

Tendo-se o valor de m , a taxa de mutação é calculada como no método anterior.

MÉTODO-5 - DETERMINAÇÃO BASEADA NO TERCEIRO QUARTIL (ARMITAGE, 1953)

O método é semelhante ao da mediana, obtendo-se a estimativa de m pela equação:

$$\frac{q}{m} - \ln.m = 4,09$$

onde q é o número de mutantes correspondente ao terceiro quartil .

ARMITAGE (1953) organizou tabelas para se obter a estimativa de m , baseada neste método.

MÉTODO 6- DETERMINAÇÃO BASEADA NO NÚMERO MÉDIO DE MUTANTES POR CULTURA

É um dos métodos propostos por LURIA e DELBRUCK (1943).

Tendo-se uma série de culturas (C), com igual número de bactérias, estima-se o número de mutantes em cada cultura, e determina-se a média de mutantes (\bar{r}), nessa série de culturas. A média de mutações m é determinada pela fórmula:

$$\bar{r} = m \cdot \ln (C \cdot m)$$

ARMITAGE (1952) propôs uma correção para esse método, sugerindo que m fosse estimado a partir da fórmula:

$$\bar{r} = m \cdot \ln (3,46 C \cdot m)$$

MÉTODO 7 - DETERMINAÇÃO BASEADA NO VALOR MÁXIMO DO NÚMERO DE MUTANTES

Método proposto por NEWCOMBE (1948), e no qual é usado a média de mutantes \bar{r} numa série de cultura, e o maior número de mutantes (r_m) encontrado. Calcula-se m pela fórmula:

$$m = \frac{r_m - \bar{r}}{C}$$

Sobre o ponto de vista da precisão esse método não leva vantagens em relação aos outros. Sua precisão não cresce quando o número de culturas C é aumentado.

MÉTODO 8 - DETERMINAÇÃO BASEADA NA VARIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE MUTANTES (NEWCOMBE, 1948)

Deixando-se as bactérias crescerem por um determinado tempo e fazendo-se a determinação da proporção de mutantes no começo e no fim de um intervalo de tempo, pode-se calcular a taxa de mutação pela fórmula:

$$a = \frac{2 \ln 2 \left(\frac{r_2}{N_2} - \frac{r_1}{N_1} \right)}{g}$$

onde r_1 e r_2 são número de mutantes nos tempos 1 e 2; o g , número de gerações e N_1 e N_2 , o número total de bactérias nos tempos 1 e 2.

MÉTODO 9 - DETERMINAÇÃO BASEADA NA CONTAGEM *in situ* DO NÚMERO DE CLONES MUTANTES (NEWCOMBE, 1948)

Determina-se a taxa de mutação utilizando-se duas séries de placas que são semeadas com o mesmo número de bactérias. Após certo intervalo

de tempo, estima-se o número total de bactérias em uma série. A outra é tratada com agente inibidor, de tal modo que a posição das colônias não seja modificada. As placas são reincubadas para determinação de clones resistentes. A taxa de mutação é dada pela fórmula:

$$a = \frac{\ln 2 (R_2 - R_1)}{(N_2 - N_1)}$$

onde a é a taxa de mutação, R_1 e R_2 ; o número de clones mutantes nos tempos 1 e 2 e N_1 e N_2 , o número total de bactérias nos tempos 1 e 2.

MÉTODO 10 - DETERMINAÇÃO BASEADA NO PLAQUEAMENTO EM PERÍODOS SUCESSIVOS

Este método é baseado no fato de que a proporção de mutantes em uma população, aumenta linearmente, com o tempo. Para estimar a média de mutações (m), nesse caso deixa-se a cultura de bactérias crescer por bastante tempo, fazendo-se durante esse período várias determinações da proporção de mutantes. A inclinação da reta resultante é usada para o cálculo da taxa de mutação.

Pode-se encontrar explicações sobre este método em STANIER *et al* (1969).

MÉTODO 11 - DETERMINAÇÃO BASEADA NA MÉDIA DE SETORES MUTANTES POR COLÔNIAS

Em alguns casos é possível observar, nas colônias de bactérias, setores resultantes de mutações ocorridas. Neste caso, determinando o número total de bactérias por colônias, e a média de setores (m), pode-se obter a taxa de mutação (a) pela fórmula:

$$a = \frac{m}{N - N_0}$$

onde N é o número final de células na população e N_0 é o número de células a partir dos quais a população cresceu durante o intervalo de tempo estudado, (AZEVEDO e COSTA, 1973).

2.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE A DETERMINAÇÃO EM ORGANISMOS QUE CRESCEM EM FORMA MICELIAL

A determinação da taxa de mutação espontânea, em organismos que crescem em forma de células livres, pode, então, ser feita por vários métodos. Esses métodos, embora possam não ser inteiramente satisfatórios, permitem estimativas aceitáveis.

O mesmo não ocorre em relação aos organismos que crescem em forma micelial, como são os casos dos fungos filamentosos, e, particularmente do *Aspergillus nidulans*, que aqui é objeto de estudo. Nesse caso, a determinação da taxa de mutação espontânea oferece alguma dificuldade e, normalmente, não é determinada. O ideal seria a determinação da probabilidade de mutação por núcleo e por geração. Mas, como no caso as amostras de núcleos somente podem ser obtidas através de esporos, o que se faz, normalmente, é determinar a proporção de mutantes entre os conídios

formados, sem considerar, profundamente, se a mutação ocorreu na formação do conídio ou em divisões nucleares anteriores.

3.0.MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LINHAGEM UTILIZADA

A linhagem utilizada foi a *bioA*₁, *methG*₁ de *Aspergillus nidulans*, originária de Glasgow e cedida pelo Departamento de Genética da Unicamp (Figura.1)

Os marcadores genéticos dessa linhagem, apresentados na Figura 2, são os seguintes:

MARCADOR	FENÓTIPO
<i>bioA</i> ₁	requisito para biotina
<i>methG</i> ₁	requisito para metionina

3.2. MEIOS DE CULTURAS

3.2.1. MEIO MÍNIMO (M.M.) (PONTECORVO *et al.* , 1953)

Caracteriza-se por apresentar uma fonte de nitrogênio [NaNO₃], uma fonte de carbono [glicose], sais minerais e ágar de acordo com as especificações a seguir:

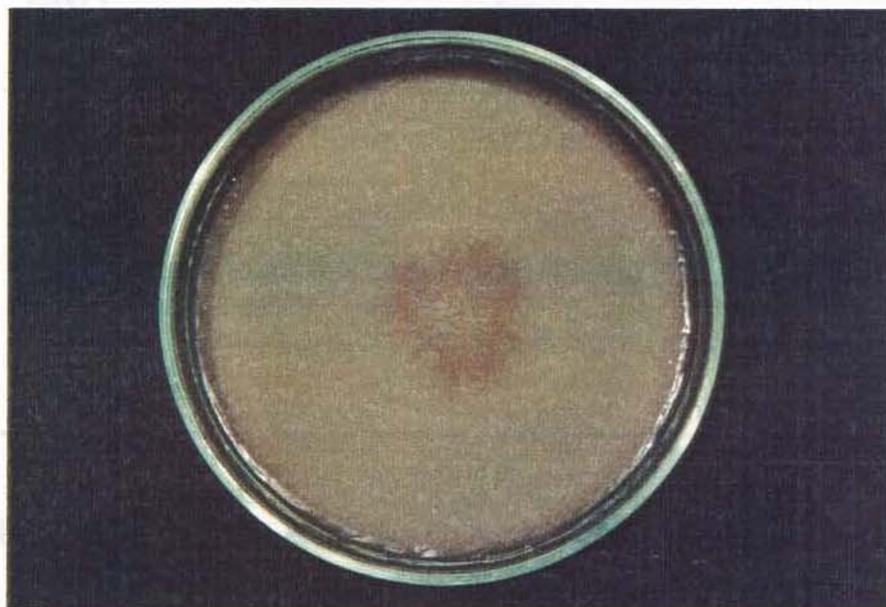


Figura 1- Linhagem *bioA*₁ *methG*₁ de *Aspergillus nidulans*

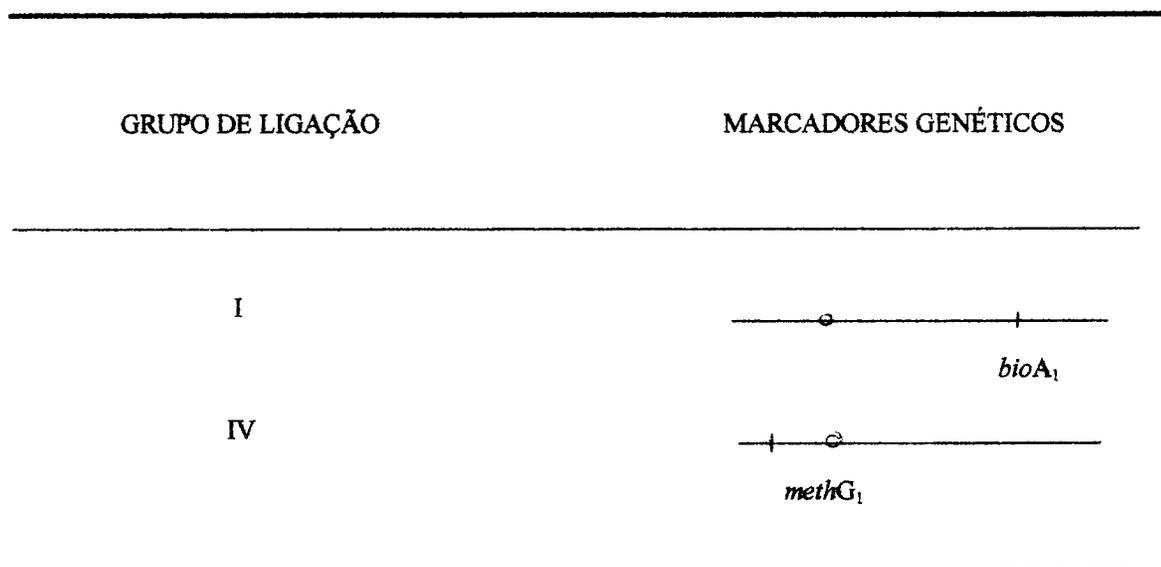


FIGURA 2. – Marcadores genéticos da linhagem *bioA₁ methG₁* de *Aspergillus nidulans*. Os centrômeros estão designados por o. Os fenótipos dos marcadores são encontrados no item 3.1. As posições dos marcadores não estão em escala no mapa.

NaNO ₃	6,0 gramas
KH ₂ PO ₄	1,5 gramas
KCl	0,5 gramas
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 gramas
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Glicose	10,0 gramas
Àgua destilada	1 litro

* pH ajustado para 6,5 com NaOH 4% ou HCl 1N.

Para fazer o meio sólido, adicionar ágar em pó na concentração final de 1,5%

3.2.2. MEIO COMPLETO (M.C) PONTECORVO *et al.*, 1953)

Adicionou-se ao meio mínimo:

Peptona	2,0 gramas
Caseína Hidrolizada	1,5 gramas
Extrato de Levedura	0,5 gramas
Solução de Vitaminas	1,0 mililitro

* pH ajustado para 6,5 com NaOH 4% ou HCl 1N

Para fazer o meio sólido, adicionar ágar em pó na concentração final de 1,5%

3.3. SOLUÇÕES

3.3.1. SOLUÇÃO DE VITAMINAS

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

A solução foi esterilizada em banho maria, por 15 minutos, à 60°C por 3 dias consecutivos e guardada em frasco escuro, sobre clorofórmio e conservada na geladeira.

3.3.2. SOLUÇÃO SALINA

Formaram esta solução:

Cloreto de sódio	8,5 gramas
Água destilada	1000ml

Colocou-se 9,0ml da solução em frascos para facilitar os experimentos, autoclavou-se a uma atmosfera de pressão, 120 graus centígrados por 15 minutos. Conservou-se os frascos à temperatura ambiente.

3.3.3. SOLUÇÃO DE TWEEN 80 (0,1%)

Adicionou-se Tween 80 a água destilada numa concentração de 0,1% (v/v).

Foram colocados 2,5ml da solução em tubos de ensaio, os quais foram autoclavados e mantidos à temperatura ambiente.

3.3.4. SOLUÇÃO DE BIOTINA

Biotina	200 μ g
Água destilada	50ml

3.3.5. TAMPÃO FOSFATO (pH 7)

Solução A- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,	3,73g	em 1000ml de água
Solução B- KH_2PO_4 -	2,4g	em 1000ml de água

Foram adicionados 7 partes da solução A a 3 partes da solução B

3.3.6. SOLUÇÃO FIXADORA

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

3.3.7. SOLUÇÃO ESTOQUE DE GIEMSA

Giemsa	3,8g
Glicerina	250ml
Metanol	250ml

Misturou-se e conservou-se em frasco de vidro com boca esmelhirada.

3.3.8. SOLUÇÃO HCl 1N

HCl (37%)	85,0ml
Água destilada	915 ml

A solução foi conservada à temperatura ambiente.

3.4. ESTERILIZAÇÃO E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 15 minutos à 120°C. As soluções as quais não foi indicado modo de esterilização, foram esterilizadas em banho maria à 60°C por 15 minutos, durante 3 dias consecutivos.

A temperatura de incubação foi de 37° C, em todos os experimentos.

3.5. ANÁLISE DAS MUTAÇÕES

3.5.1. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE MUTANTES

A linhagem *bioA*₁, *methG*₁, foi inoculada no centro de uma placa de Petri, de 9cm de diâmetro, contendo 20ml de meio completo sólido, e incubada à 37^o C., por 10 dias. Depois desse período de incubação, quando a linhagem já havia crescido e ocupado todo o meio de cultura, fez-se a repicagem com o replicador de 26 agulhas para placas de Petri com meio completo, as quais foram incubadas à 37^o C durante 4 dias . Em cada placa as colônias apresentavam, então, a disposição que se acha representada na Figura 3., e, de cada uma das nove colônias centrais, foram recolhidos todos os conídios possíveis, os quais foram suspensos em 1ml de solução de Tween 80, e agitados para desagregação completa dos conídios. Essa suspensão foi transferida a um tubo de ensaio que continha uma camada de aproximadamente um centímetro de espessura de algodão no terço superior, a fim de que nessa filtração, outras estruturas fossem retiradas. Retirado o algodão, que serviu de filtro, todo o conteúdo desses tubos foram colocado em 2 placas de Petri contendo meio mínimo com biotina (0,4 µg/ml) e espalhado com alça de Drigalski.

Essas placas foram incubadas à 37^oC e depois de 10 dias de incubação, era anotado o número de colônias de cada tipo que apareciam.

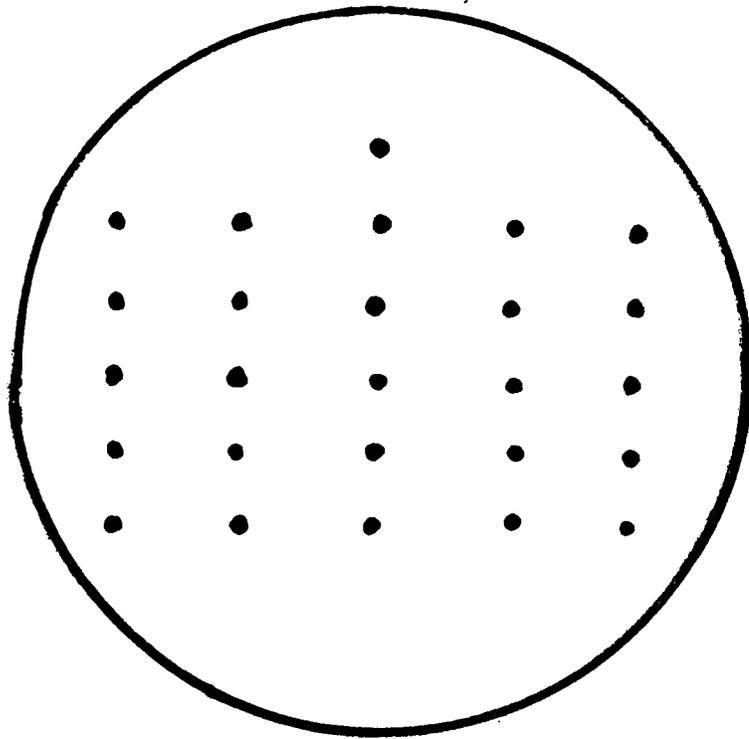


Figura 3 – Modelo do sistema de inoculação com o replicador, em Placa de Petri

3.6. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E DO VOLUME DAS COLÔNIAS.

Depois de 10 dias de crescimento, a linhagem foi repicada, com o replicador de 26 agulhas, para placas de Petri, contendo meio completo, e incubada por quatro dias. Após esse período de incubação, as nove colônias centrais foram medidas com a régua milimetrada, determinando-se o tamanho do diâmetro de cada colônia.

A determinação do volume das colônias foi feita como segue:

Nove colônias centrais eram recortadas e retiradas juntamente com o meio de cultura, e colocadas em Becker com água destilada. Esse Becker era levado ao fogo e deixava-se a água aquecer até que as colônias perdessem completamente o meio de cultura a elas aderido. Essas 9 colônias, livre de meio de cultura, eram, então, colocadas sobre papel de filtro e depois, em conjunto, eram colocadas, em provetas graduadas, contendo álcool absoluto, medindo-se o aumento de volume provocado por elas.

Do mesmo modo também foram feitas medidas de colônias, cujas partes aéreas foram retiradas por meio de alça de níquel-cromo. Nesse caso a parte aérea foi colocada diretamente na proveta contendo álcool a fim de se avaliar o seu volume, enquanto a parte restante, antes de ser medida, sofria o tratamento descrito acima.

3.7. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CONÍDIOS NAS COLÔNIAS

Colônias centrais obtidas após repicagem com o replicador de 26 agulhas, foram medidas com régua milimetrada, determinando-se o tamanho

do diâmetro de cada uma. A seguir os conídios dessas colônias foram transferidos para a solução de Tween 80 e desagregados por agitação. Essa suspensão foi filtrada do modo descrito em 3.5.1., e o número de conídios contados em hematímetro.

3.8. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE NÚCLEOS EM HIFAS DE VOLUME CONHECIDO

A linhagem foi inoculada por estrias, nas proximidades das bordas de lamínulas previamente esterilizadas, as quais foram colocadas sobre o meio completo sólido, em placas de Petri. Após três dias de incubação essas lamínulas foram retiradas e preparadas para observação microscópica.

Inicialmente procedeu-se à fixação em solução fixadora (item 3.3.6) por 15 minutos. Depois o material foi lavado, em água destilada, e procedeu-se a hidrólise em HCl 1N à 60° C, durante 15 minutos. A seguir lavou-se três vezes em água destilada, e fez-se a coloração durante 30 minutos, colocando-se a lamínula em uma mistura de 10ml de tampão fosfato pH 7 e 18 gotas de solução estoque de Giemsa .

Em seguida as lamínulas foram colocadas em lâminas, sobre tampão fosfato pH 7, e observadas ao microscópio. Então, uma parte da hifa, era medida com a ocular micrométrica, e os núcleos nela contidos eram contados. Cada parte, tinha a dimensão de 9,675 μ m de comprimento por 2,419 μ m de diâmetro, correspondente portanto, a um volume de 44,47 μ m³.

Foram contados núcleos em 150 partes, tomadas, ao acaso, em 3 lâminas, e, para cada uma dessas lâminas, contava-se o número de núcleos existentes em 50 dessas partes.

3.9. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CABEÇAS CONIDIAIS

Também em colônias centrais, obtidas com o replicador, de modo já descrito (item 3.5.1.), foram feitas contagens, do número de cabeças em 30 campos com área de $187,5\mu\text{m}$ de raio. As placas eram levadas ao microscópico, a área delimitada, através de medições com a ocular micrométrica, e as cabeças conidiais, que ocorriam nessa área, eram contadas. Os campos e as colônias eram escolhidas ao acaso.

3.10. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS CABEÇAS CONIDIAIS E DO NÚMERO DE CONÍDIOS POR CABEÇA

De colônias centrais de modo já descrito no item 3.5.1. eram retiradas cabeças conidiais e colocadas em uma gota de água sobre uma lâmina. A seguir cobria-se com uma lamínula e observava-se ao microscópico. As cabeças que se mostravam intactas, eram então medidas, com o auxílio de uma ocular micrométrica. Eram feitas medidas conjuntas da vesícula e cadeia de conídios.

O número de conídios por cabeça foi determinado de dois modos diferentes. O primeiro consistiu em isolar cerca de 40 cabeças conidiais, colocadas em 1ml de solução de Tween 80, desagregar os conídios por agitação e fazer contagem em hematímetro. Conhecido o número de cabeças conidiais colocadas e o número total de conídios originados dessas cabeças, pode-se, então, estimar o número médio de conídios por cabeça.

A outra técnica consistiu em fazer o isolamento de uma cabeça conidial em 1ml de solução de Tween 80. Os conídios eram desagregados por agitação e essa suspensão de conídio era colocada em 9ml de solução salina.

A seguir era preparada uma série de suspensões de conídios, de 10 níveis ao todo, cada qual 1/2 vezes mais diluída do que a anterior. Cada suspensão era utilizada para inocular cinco tubos de ensaio, contendo 2ml de meio completo líquido. E depois de 2-3 dias eram contados os tubos que mostravam presença do fungo.

A partir daí calculou-se, baseado em FISHER e YATES (1971):

a) o nível médio de fertilidade x

$$x = \frac{X}{n}$$

onde o X é o número de tubos férteis e n o número de tubos usados em cada concentração.

b) o nível de esterilidade médio y

$$y = s - x$$

onde s é o número de diluições da série, e x o número de fertilidade médio.

c) o número de conídios por tubo, na máxima concentração, que é dado pela fórmula:

$$\log \lambda = x \log a - K$$

onde x é o nível de fertilidade médio, a é o fator de diluição e K é um valor tabelado (Tabela VIII de FISHER e YATES, 1971-Tabela 22 neste trabalho)

3.11. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DOS CONÍDIOS

A viabilidade dos conídios da linhagem *bioA*₁, *methG*₁, e das reversões tipo A, B e C, foi determinada de dois modos diferentes.

O primeiro consistiu em inocular a linhagem em placas com meio completo, deixá-la crescer durante 4 dias e a seguir retirar os conídios e colocá-los em tubos de ensaio, contendo solução de Tween 80. Depois de desagregados por agitação, o número de conídios era contado em hematímetro. Procedia-se, então a diluições, em solução salina, de modo a ter-se um número apropriado de conídios a serem semeados. Dessa suspensão diluída, de conídios, 0,1ml era semeado, em meio completo, em cada placa, e espalhado com alça de Drigalski. A seguir as placas eram incubadas e depois de dois dias de incubação, contava-se o número de colônias que cresceram.

No outro método, depois de contados os conídios em hematímetro, procedia-se a uma série de diluições sucessivas, colocando-se 1ml da suspensão de conídio em 9ml de salina. De cada diluição 10ml da suspensão eram colocados em placas de Petri, esterilizadas. A seguir fazia-se a inoculação em placas com meio completo, utilizando-se um replicador de 17 alças. Esse replicador, depois de flambado, era mergulhado na suspensão de conídios e a seguir introduzido nas placas com meio de cultura. Depois de dois dias de incubação era contado o número de colônias que cresceram e calculado o número de conídios por ml de modo já descrito no item 3.10.

Previamente foi feita estimativa do volume de água que cada alça do replicador era capaz de transportar estimando-se um valor médio aproximado de 0,003ml.

3.12. MODELO MATEMÁTICO

A média de mutações poderia ser determinada com base em um modelo matemático (BARACHO e PIEDRABUENA, comunicação pessoal) que resulta das considerações que seguem:

Considere-se que p_2 é a probabilidade de um conídio ser gerado por um núcleo que sofreu determinada mutação e q_2 ($q_2 = 1 - p_2$) a probabilidade contrária.

Considere-se N o número de conídios sujeitos a serem gerados por esse núcleo mutante. Então a probabilidade de aparecer $0, 1, \dots, N$ conídios mutantes é dada pela distribuição binomial,

$$P(X = K) = \binom{N}{K} p_2^k q_2^{N-K} \quad (K = 0, 1, \dots, N)$$

Considere-se p_1 a probabilidade de um núcleo sofrer determinada mutação e q_1 ($q_1 = 1 - p_1$), a probabilidade contrária . Para n_1 núcleos a probabilidade de mutação é também dada por uma distribuição binomial

$$P(Y = i) = \binom{n_1}{i} p_1^i q_1^{n_1 - i} \quad (i = 0, 1, \dots, n_1)$$

Assumindo agora que o número de cópias sujeitos a serem gerados por núcleos mutantes (N), depende do número de núcleos mutantes que apareceram, tal que $N = \lambda i$ ($i = 0, 1, \dots, n_1$) onde $\lambda > 1$ é uma constante inteira, tem-se :

$$P(N = \lambda i) = P(Y = i) = \binom{n_1}{i} p_1^i q_1^{n_1 - i}$$

e a distribuição bidimensional de (X, N) é dada pela equação

$$P(X = K) = \sum_{i=\frac{K}{\lambda}+c}^{n_1} \binom{n_1}{i} \binom{\lambda i}{k} p_1^i q_1^{n_1 - i} p_2^k q_2^{N-k} \quad (1)$$

$$i = \frac{K}{\lambda} + c, \frac{K}{\lambda} + c + 1, \dots, n_1; \quad \lambda n_1 = n_2$$

$0 \leq C < 1$, sendo C uma constante arbitrária tal que i não assuma valores fracionários.

A média dessa distribuição é

$$m_1 = \lambda n_1 p_1 p_2 = n_2 p_1 p_2 \quad (2)$$

E a variância é

$$\sigma^2 = n_2 p_1 p_2 (q_2 + \lambda p_2 q_1) \quad (3)$$

As estimativas das médias de núcleos que sofreram mutação podem ser obtidas como segue:

De (2) e (3) tem-se

$$\frac{\sigma^2}{m_1} = q_2 + \lambda p_2 q_1$$

Se p_1 e p_2 tendem para zero, para suficientemente grandes n_1 e n_2 ($n_2 = \lambda n_1$)

$$\lambda p_2 = \frac{\sigma^2}{m_1} - 1$$

$$\text{e} \quad \frac{m_1}{\lambda p_2} = n_1 p_1$$

que é a média de núcleos que mutaram.

Um outro modelo matemático que pode ser considerado é o de uma distribuição Poissoniana composta (GRAY, 1967). Nesse caso consideramos que o número de núcleos que mutaram em colônias de fungos é uma variável

poissoniana, com parâmetro λ . O número de conídios gerados por esses diferentes núcleos que mutaram são variáveis poissonianas independentes com parâmetro α . Nesse caso a média (μ) e a variância (σ^2) da distribuição de conídios mutantes por colônia seriam:

$$\begin{aligned}\mu &= \lambda \alpha \\ \sigma^2 &= \lambda \alpha (1 + \alpha)\end{aligned}$$

$$\alpha = \frac{\sigma^2}{\mu} - 1$$

$$\lambda = \frac{\lambda \alpha}{\alpha} = \frac{\mu}{\alpha}$$

$$\frac{\sigma^2}{\mu} = \frac{\lambda \alpha (1 + \alpha)}{\lambda \alpha} = 1 + \alpha$$

Tendo-se, portanto a média e a variância da distribuição de conídios mutantes, por colônia, pode-se, então, calcular os parâmetros λ e α .

Assim, tem-se a média de núcleos, que mutaram, λ , e a média de conídios mutantes, gerados por eles, α .

Pode-se, também, considerar como modelo para aparecimento de conídios mutantes, gerados a partir de mutações de núcleos, a distribuição de GREENWOOD e YULE (1920).

Neste caso, os autores, ao referir-se ao número de acidentes, supõem que estes se distribuem segundo a distribuição de Poisson,

$$f(j) = e^{-\lambda} \frac{\lambda^j}{j!}$$

para $j = 0, 1, \dots$, sendo λ uma variável aleatória, que expressa os distintos graus de riscos individuais a que está submetida a população, e cuja função de distribuição é dada por:

$$dF = \frac{c^p}{\Gamma(p)} e^{-c\lambda} \lambda^{p-1} d\lambda$$

$$\lambda > 0 \quad p > 0$$

sendo c e p parâmetros da distribuição.

A partir daí os autores chegam ao desenvolvimento

$$\left(\frac{c}{c+1}\right)^p \left[1, \frac{p}{c+1}, \frac{p(p+1)}{2!(c+1)^2}, \dots \right],$$

ou em forma geral

$$f(x) = \left(\frac{c}{c+1}\right)^p \frac{\left| \binom{-p}{x} \right|}{(c+1)^x}$$

para $x = 0, 1, \dots$

A média (m) e a variância (σ^2) dessa distribuição são:

$$m = \frac{p}{c} \qquad \sigma^2 = \frac{p}{c} \left(\frac{c+1}{c} \right)$$

sendo

$$c = \frac{m}{\sigma^2 - m} \qquad p = \frac{m^2}{\sigma^2 - m}$$

Embora as considerações de GREENWOOD e YULE (1920) sejam sobre ocorrência de acidentes, tendo em conta os distintos graus de riscos individuais, pode-se facilmente justificar sua aplicação ao estudo de mutações aqui estudadas. Para isso temos, apenas, que considerar a ocorrência de cóndios mutados, tendo em vista as distintas possibilidades de aparecimento de núcleos mutados.

Os modelos, aqui referidos, são semelhantes em determinados casos. PIEDRABUENA (1968) demonstrou que os valores da distribuição de GREENWOOD e YULE podem ser obtidos por meio da Binomial Generalizada $(K + \Psi)^v$, onde $K = (\sigma^2 / m) > 0$, $\Psi = 1 - K$ e $v = m / \Psi$.

Tendo em vista que a aplicação da Binomial Generalizada facilita os cálculos, foi esta que utilizamos para estudar o ajuste dos dados, referentes ao aparecimento de mutações.

4.0. RESULTADOS

4.1. NÚMERO DE MUTANTES

Utilizando-se a linhagem *bioA*₁, *methG*₁ e as técnicas descritas no item 3.5.1. foram estudadas três tipos de reversões espontâneas (A, B e C), do gene *methG*₁ fenotipicamente distinguíveis. O tipo A (Figura 4) se apresenta em forma de colônias grandes e verdes. As do tipo B (Figura 5) são dotadas de pigmento marrom intenso, enquanto as do tipo C (Figura 6) são colônias verdes, com um halo hialino .

Procurou-se verificar o número total dessas reversões em cada colônia, usando-se duas placas de Petri por colônia. Foram analisadas 99 colônias grupadas em quatro grupos . Os resultados são apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3.

A partir dos dados destas tabelas, procurou-se determinar a média de núcleos que mutaram, de acordo com as fórmulas indicadas no item 3.12.

O total de reversões do tipo A, apresentado por colônia, pode ser visto na Tabela 1, que mostra o número dessas reversões nos quatro grupos em que foram divididas. Para essas reversões temos:

Número de colônias examinadas = 99

Média de mutantes = 22,06

Variância = 1186,87

Média de núcleos gerados por núcleos mutantes (λp_2) = 52,80

Média de núcleos que sofreram mutação ($n_1 p_1$) = 0,38

Para dados desta mesma Tabela, considerando-se, apenas, as quantidades de mutantes inferiores a 30, temos:

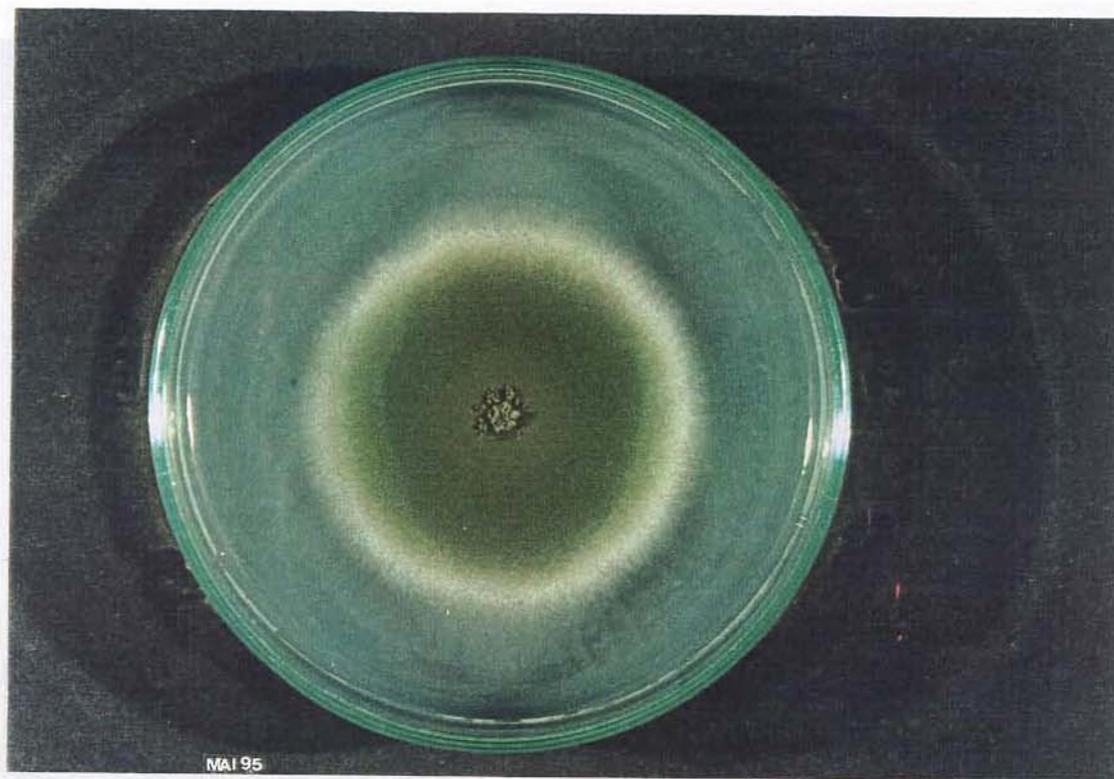


Figura 4- Mutante A- Linhagem *bioA*₁ *methG*₁ de *Aspergillus nidulans*



Figura 5- Mutante B-Linhagem *bioA*₁ *methG*₁ de *Aspergillus nidulans*

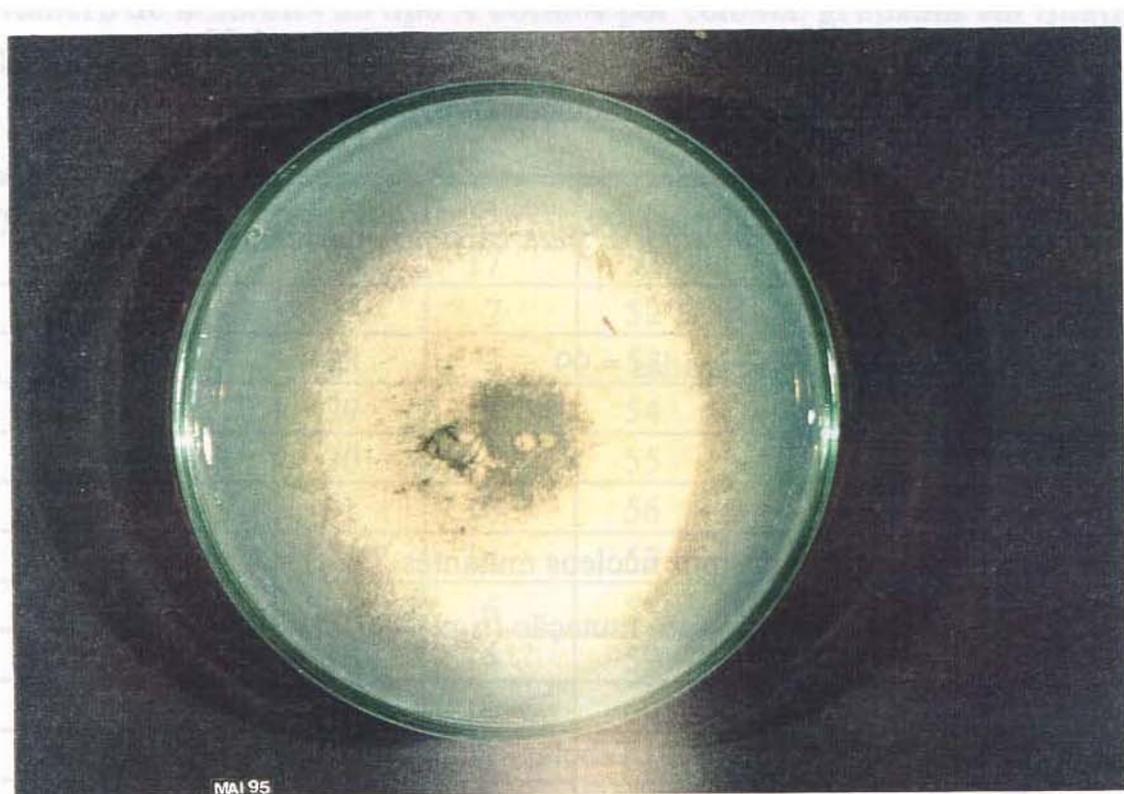


Figura 6- Mutante C-Linhagem *bioA*₁ *methG*₁ de *Aspergillus nidulans*

Número de colônias examinadas = 87

Média de mutantes = 12,30

Variância = 28,54

Média de núcleos gerados por núcleos mutantes (λp_2) = 1,32

Média de núcleos que sofreram mutação ($n_1 p_1$) = 9,31

O total de reversões do tipo B, para cada colônia, pode ser visto na Tabela 2, do qual temos :

Número de colônias examinadas = 99

Média de mutantes = 8,76

Variância = 378,41

Média de núcleos gerados por núcleos mutantes (λp_2) = 42,21

Média de núcleos que sofreram mutação ($n_1 p_1$) = 0,21

Para dados desta mesma Tabela, considerando-se, apenas, as quantidades de mutantes inferiores a 30, temos:

Número de colônias examinadas = 95

Média de mutantes = 6,17

Variância = 23,42

Média de núcleos gerados por núcleos mutantes (λp_2) = 2,80

Média de núcleos que sofreram mutação ($n_1 p_1$) = 2,21

Para as reversões do tipo C, os resultados são apresentados na Tabela 3, de onde temos :

Número de colônias examinadas = 99

TABELA 1.

Número de mutantes do tipo A obtidos por colônia, grupados em quatro grupos

COLÔNIA	TIPO A						
1	6	26	17	51	17	76	16
2	22	27	7	52	7	77	17
3	11	28	3	53	203	78	10
4	17	29	11	54	7	79	9
5	19	30	15	55	10	80	14
6	9	31	16	56	10	81	13
7	36	32	14	57	10	82	8
8	16	33	6	58	11	83	9
9	27	34	14	59	10	84	17
10	12	35	16	60	7	85	47
11	3	36	5	61	5	86	5
12	19	37	11	62	12	87	7
13	11	38	5	63	20	88	14
14	15	39	14	64	67	89	8
15	8	40	8	65	31	90	10
16	17	41	17	66	10	91	96
17	17	42	10	67	54	92	12
18	3	43	18	68	19	93	11
19	9	44	12	69	10	94	11
20	111	45	13	70	79	95	2
21	20	46	14	71	13	96	6
22	25	47	134	72	11	97	8
23	8	48	35	73	19	98	11
24	16	49	19	74	221	99	15
25	28	50	16	75	10		

TABELA 2.

Número de mutantes do tipo B obtidos por colônia, grupados em quatro grupos

COLÔNIA	TIPO B						
1	3	26	2	51	4	76	11
2	8	27	2	52	14	77	12
3	9	28	5	53	0	78	3
4	7	29	5	54	1	79	7
5	3	30	0	55	0	80	14
6	14	31	5	56	1	81	14
7	4	32	31	57	7	82	12
8	7	33	8	58	8	83	4
9	9	34	1	59	5	84	3
10	30	35	6	60	9	85	3
11	11	36	3	61	4	86	2
12	8	37	3	62	3	87	7
13	15	38	26	63	3	88	12
14	30	39	4	64	2	89	2
15	7	40	3	65	4	90	8
16	6	41	8	66	0	91	7
17	6	42	0	67	13	92	17
18	6	43	5	68	3	93	11
19	4	44	9	69	3	94	4
20	6	45	0	70	2	95	12
21	24	46	5	71	2	96	6
22	6	47	8	72	3	97	6
23	9	48	9	73	2	98	9
24	2	49	190	74	5	99	6
25	0	50	1	75	4		

TABELA 3.

Número de mutantes do tipo C obtidos por colônia, grupados em quatro grupos

COLÔNIA	TIPO C						
1	3	26	2	51	3	76	4
2	8	27	2	52	3	77	8
3	1	28	8	53	0	78	4
4	1	29	6	54	4	79	8
5	4	30	1	55	2	80	6
6	7	31	0	56	3	81	10
7	1	32	2	57	14	82	4
8	1	33	14	58	4	83	26
9	9	34	2	59	11	84	2
10	7	35	3	60	1	85	5
11	8	36	6	61	4	86	6
12	2	37	0	62	4	87	7
13	6	38	3	63	3	88	2
14	7	39	0	64	0	89	1
15	5	40	4	65	2	90	8
16	5	41	0	66	23	91	5
17	1	42	0	67	5	92	5
18	24	43	2	68	2	93	11
19	7	44	3	69	7	94	5
20	4	45	0	70	0	95	4
21	4	46	3	71	4	96	4
22	3	47	5	72	3	97	2
23	17	48	7	73	2	98	7
24	8	49	2	74	5	99	6
25	4	50	4	75	7		

Média de mutantes = 4,97

Variância = 22,34

Média de núcleos gerados por núcleos mutantes (λp_2) = 3,49

Média de núcleos que sofreram mutação ($n_1 p_1$) = 1,42

Para esse tipo, não apareceu quantidade de mutantes maior do que 30.

Utilizando a distribuição de Poisson composta (GRAY, 1967), item 3.12., obtem-se os mesmos valores, sendo:

$$\lambda p_2 = \alpha$$

$$n_1 p_1 = \lambda$$

4.2. TAMANHO E VOLUME DAS COLÔNIAS

Foram feitas medidas das colônias, do modo já descrito no item 3.6. A Tabela 4 mostra os resultados dessas medidas. Verificou-se que as 9 colônias centrais tinham um diâmetro que variava de 11 a 14 milímetros. Constatou-se ainda que essas colônias tinham, em média, 11,89 milímetros de diâmetro, ou seja 5,945 milímetros de raio (R), e para a medida do diâmetro o desvio padrão era de 0,87.

De acordo com o item 3.6. foi também estimado o volume correspondente às 9 colônias centrais juntas. Determinou-se o volume das colônias inteiras e também de suas partes aéreas e das suas partes submersas. Os dados são apresentados na Tabela 5.

TABELA 4.

Diâmetro em mm das 9 colônias centrais medido em 6 placas

colônia placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	11	12	11	12	13	11	13	11	12
2	12	11	11	12	13	12	12	11	11
3	12	12	13	11	13	11	11	12	11
4	13	14	12	12	11	11	12	13	13
5	13	11	12	12	13	11	12	12	11
6	11	11	13	12	11	11	12	11	14

Média do diâmetro das colônias = 11,89mm

Desvio padrão = 0,87

TABELA 5.

Volume em cm³ das colônias e suas partes aéreas e submersas correspondentes a 9 colônias centrais em cada experimento

EXPERIMENTO	COLÔNIAS INTEGRAIS	PARTE SUBMERSA	PARTE AÉREA
1	-----	0,10	0,04
2	-----	0,10	0,04
3	-----	0,10	0,05
4	0,15	-----	-----
5	0,15	-----	-----
6	0,15	-----	-----

4.3. NÚMERO DE CONÍDIOS POR COLÔNIAS

A determinação do número de conídios, nas colônias, foi feita conforme metodologia descrita no item 3.7. Os resultados são mostrados na Tabela 6. Dessa tabela tem-se que o número de conídios, por colônia, é de $3768,0556 \times 10^4$. (aproximadamente $3,8 \times 10^7$) com um desvio padrão de $6,08377614 \times 10^6$.

4.4 NÚMERO DE NÚCLEOS NAS HIFAS

De modo já descrito no item 3.8. foram contados os núcleos em hifas de $9,675\mu\text{m}$ de comprimento por $2,419\mu\text{m}$ de diâmetro, ou seja, com um volume de $44,47\mu\text{m}^3$. Essa contagem foi feita em 150 partes, tomadas, ao acaso, em três lâminas. A Tabela 7 mostra o resultado dessa contagem. Foram obtidos em média 0,867 núcleos, por parte da hifa com essa dimensão especificada.

Da Tabela 5, tem-se que a parte submersa da colônia apresenta um volume de $0,01111\text{cm}^3$.

O número de partes de hifas (H), com um volume de $44,47\mu\text{m}^3$, que cada colônia poderia conter seria de

$$H = \frac{11.110.000.000}{44,47} = 249.831.347$$

TABELA 6.**Número de conídios por colônias**

COLÔNIAS N	DIÂMETRO DA COLÔNIA EM mm	NÚMERO DE CONÍDIOS X 10 ⁴
1	12	4.387,5
2	13	4.450,0
3	14	3.725,0
4	13	4.237,5
5	11	3.025,0
6	12	4.412,5
7	12	3.087,5
8	13	3.362,5
9	13	3.225,0
TOTAL		33.912,5

Média do número de conídios = 3768,0556 X 10⁴

Desvio Padrão = 6,1 X 10⁶

TABELA 7.

Frequência de núcleos em 150 partes de hifa, tomadas ao acaso, em 3 lâminas. Cada parte media 9,675 μ m de comprimento por 2,4109 μ m de diâmetro. Foram contadas 50 partes em cada lâmina.

LÂMINA

NÚMERO DE NÚCLEOS	LÂMINA			TOTAL
	1	2	3	
0	21	22	17	60
1	23	18	26	67
2	3	5	4	12
3	1	3	2	6
4	2	1	1	4
5	0	1	0	1
TOTAL	50	50	50	150

Média de núcleos por parte = 0,867

E o número de núcleo (n) seria de:

$$n = 0,867 \times 249.831.347 = 216.603.778$$

No que diz respeito à parte aérea foi encontrado um volume (V_a) médio de $0,0048148148\text{cm}^3$.

O volume modal encontrado para núcleos da linhagem *bioA*₁, *methG*₁ foi de 11,0357 (BARROS, 1977).

Considerando o total de conídios de cada colônia tem-se um volume

$$11,035 \times 37.680.556 = 415.804.940\mu\text{m}^3.$$

Daí resulta então:

$$4.814.814.814\mu\text{m}^3 - 415.804.940\mu\text{m}^3 = 4.339.009,910\mu\text{m}^3$$

$$4.339.009,910 \div 44,47 = 98.920.843$$

$$98.920.843 \times 0,867 = 85.764.371$$

85.764.371 é a média estimada de núcleo da parte aérea da colônia , excluindo os núcleos do conídio.

Considerando as estimativas aqui feitas tem-se então, para a colônia o número total de núcleos que é especificado na Tabela 15.

4.5. NÚMERO E TAMANHO DE CABEÇAS CONIDIAIS

Conforme metodologia descrita no item 3.9., foram contadas as cabeças conidiais em 30 campos com área de $187,5\mu\text{m}$ de raio (r). Os campos foram escolhidos ao acaso, em 5 colônias diversas, contando-se 6 campos por colônias. A Tabela 8 mostra o resultado dessa contagem.

TABELA 8.

**Número de cabeças conidiais em 30 campos com área de 187,5 μ m de raio.
Foram contados campos em 5 colônias, sendo seis campos por colônia.**

COLÔNIA	CAMPO						TOTAL DE CABEÇA
	1	2	3	4	5	6	
1	23	16	22	17	19	25	122
2	24	17	18	27	14	23	123
3	14	18	18	14	20	23	107
4	24	20	20	13	21	18	118
5	23	22	22	20	19	14	119
						TOTAL	589

Média de cabeças conidiais por área = 19,63 \pm 7,25

Foi encontrada uma média de cabeças conidiais, por área, de $19,63 \pm 7,25$ cabeças.

Como o raio (R) das colônias é conhecido (item 4.2), podemos obter, a partir daí, a relação entre a área das colônias (ΠR^2) e área do campo (Πr^2), onde as cabeças conidiais foram contadas. Obtemos, assim, como segue, o número de campos contidos em cada colônia:

$$\frac{\Pi R^2}{\Pi r^2} = \frac{5945^2}{187,5^2} = 1005,31$$

Se cada colônia tem, em média, 1005,31 campos, e se cada campo tem, em média, 19,63 cabeças conidiais, então o número de cabeças conidiais por colônia é igual a:

$$1005,31 \times 19,63 = 19.734,24$$

Pelo cálculo, então, uma colônia deve ter, em média 19.734,24 cabeças conidiais.

Para se ter uma idéia do tamanho das cadeias de conídios, o comprimento de 60 cabeças conidiais foi medido em 6 colônias distintas, medindo-se 10 cabeças por colônia. Os dados estão na Tabela 9, onde se pode ver a média encontrada, que foi de $70,63 \mu\text{m} \pm 22,36 \mu\text{m}$.

TABELA 9.

Comprimento em micrometro de 60 cabeças conidiais, provenientes de 6 colônias distintas. Medidas de 10 cabeças por colônia.

CABEÇAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
COLÔNIA										
1	75,0	84,4	75,5	75,0	75,0	75,0	56,5	75,0	65,6	75,0
2	75,0	75,5	84,4	93,7	75,0	75,0	75,0	37,5	56,3	37,5
3	75,0	75,0	65,5	75,0	75,0	75,0	75,0	75,0	56,3	56,3
4	75,0	56,5	75,0	75,0	75,0	93,7	56,3	75,0	84,4	75,0
5	75,0	37,5	75,0	75,0	75,0	65,6	75,0	56,3	75,0	75,0
6	75,0	75,5	75,0	84,4	84,4	75,0	75,0	56,3	75,5	75,0

Média de comprimento das cabeças conidiais = 70,63 μ m \pm 22,36 μ m

4.6. NÚMERO DE CONÍDIOS POR CABEÇA

Procurou-se determinar também o número de conídios por cabeça conidial. Essa determinação foi feita por 2 técnicas diferentes que se acham descritas no item 3.10.

A Tabela 10 apresenta os resultados da determinação, pelo método de contagem no hematímetro. Por esse método foi encontrada uma média de conídios por cabeça de $4710,25 \pm 2765,91$. A outra técnica usada foi a técnica da diluição da qual resultou uma média de conídio por cabeça igual 1720,13 conídios, com limites fiduciais de 913,35 e 3262,00 conídios(Tabela 11).

Pode-se, também, estimar o número de conídios, por cabeça dividindo o número de conídios, por colônia, pelo número de cabeças por colônia. Esses dados são encontrados no item 4.3 e 4.5 respectivamente. Daí temos que o número de conídios por colônia é igual a $3,8 \times 10^7$ e que o número de cabeças conidiais por colônia é igual a 19.734,24, obtendo-se, portanto, uma quantidade de conídios, por cabeça, igual a 1925,58 conídios .

4.7. VIABILIDADE DOS CONÍDIOS

A viabilidade dos conídios da linhagem *bioA₁ methG₁*, e dos 3 tipos de reversões, foi analisada por 2 métodos descritos no item 3.11.

A Tabela 12 mostra os resultados dessa análise pelo método do semeio direto em placa de Petri, enquanto a Tabela 13a apresenta os resultados encontrados pelo método de diluição. O controle feito para os dados da Tabela 13a é apresentado na Tabela 13b.

TABELA 10.

Número de conídios por cabeça, em 4 experimentos
(Método do hematímetro).

EXPERIMENTO	Nº DE CABEÇAS	TOTAL DE CONÍDIOS X 10⁴	Nº DE CONÍDIOS POR CABEÇA
1	41	13,5	3.293
2	42	27,5	6.548
3	40	20,0	5.000
4	40	16,0	4.000

Média de conídios por cabeça = 4710,25 ± 2765,91

TABELA 11.

Número de conídios por cabeça, em 6 experimentos com 10 níveis de diluição (Método da diluição)

DILUIÇÃO EXPERIMENTO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	NÍVEL DE FERTILIDADE MÉDIO	Nº DE CONÍDIO POR CABEÇA
1	5	5	5	3	3	2	1	0	1	0	5,0	1.292
2	5	5	5	5	3	0	1	0	0	0	4,8	1.124
3	5	5	5	5	4	3	1	2	0	0	6,0	2.566
4	5	5	5	3	3	1	1	1	0	0	4,8	1.124
5	5	5	5	5	4	3	1	0	0	0	5,6	1.976
6	5	5	5	5	4	3	2	1	1	0	6,2	3.023

Média de níveis de fertilidade = $5,4 \pm 0,877$

Número de conídios por cabeça :

Média = 1720,13 conídios

Limites fiduciais : 913,35 e 3262,00 conídios

TABELA 12.

Determinação da viabilidade dos conídios, pelo método do semeio, para a linhagem usada e os diversos mutantes.

LINHAGENS E TIPOS DE MUTANTES	NÚMERO DE CONÍDIOS CONTADOS EM HEMATÍMETRO POR ml X 10 ⁴	NÚMERO DE DILUIÇÕES	NÚMERO MÉDIO DE CONÍDIOS SEMEADOS POR PLACA	NÚMERO DE PLACAS USADAS	NÚMERO MÉDIO DE CONÍDIOS VIAVÉIS POR PLACA
<i>bioA₁ methG₁</i>	346	4	34,6	5	30,2
Tipo A	195	4	19,5	5	22,0
Tipo B	29	3	29,0	5	24,0
Tipo C	147	4	14,7	5	10,4

TABELA 13a .

Determinação da viabilidade dos conídios pelo método do replicador para a linhagem usada e os diversos mutantes, usando o fator de diluição 10.

LINHAGEM	CONÍDIOS CONTADOS POR ml	DILUIÇÃO					NÍVEL DE FERTILIDADE	NÚMERO DE CONÍDIOS POR ml
		1	2	3	4	5		
<i>bioA₁ met G₁</i>	34×10^4	17	16	13	0	0	2,71	31×10^4
TIPO A	67×10^4	17	17	10	5	0	2,88	45×10^4
TIPO B	65×10^4	17	17	15	1	0	2,94	51×10^4
TIPO C	71×10^4	17	17	14	3	0	3,00	58×10^4

TABELA 13b.

Controle para o experimento da Tabela 13a. Estimativas do número de conídios por ml (usando hematómetro), e do número de conídios viáveis.

LINHAGEM	CONÍDIOS CONTADOS POR ml	CONÍDIOS VIÁVEIS
<i>bioA₁ metG₁</i>	34×10^4	18×10^4
TIPO A	67×10^4	34×10^4
TIPO B	65×10^4	$37,5 \times 10^4$
TIPO C	71×10^4	29×10^4

5.0. DISCUSSÃO

5.1.-O MÉTODO E OS DADOS EM GERAL

5.1.1. O TAMANHO DAS COLÔNIAS. O NÚMERO E A VIABILIDADE DOS CONÍDIOS

O trabalho teve dois objetivos principais:

1. Verificar se podia haver, em fungos filamentosos, locais preferenciais para ocorrência de mutação.
2. Estudar modelos que possibilitem a determinação da taxa de mutação, em fungos filamentosos.

Na tentativa de esclarecer esses dois pontos, foi utilizada a linhagem *bioA₁ methG₁* de *Aspergillus nidulans*, optando-se pelo estudo das mutações espontâneas relacionadas ao gene *methG₁*.

Para tentar esclarecer esses pontos, vários dados tiveram de ser levantados. Primeiramente procurou-se determinar o número de mutantes dos Tipos A, B e C (LILLY, 1965), que ocorreram em colônias da linhagem usada, as quais apresentavam um desenvolvimento com certa regularidade. Estes dados estão nas Tabelas 1, 2 e 3.

Para obtenção desses mutantes, os conídios, provenientes de cada colônia, eram colocados em placas com meio de cultura, conforme descrito no item, 3.5.1. Foi, então, necessário estabelecer o número de conídios por colônia, para poder determinar a frequência das mutações (Tabela.6.). E teve-se, também, de estabelecer o tamanho dessas colônias, para ter uma idéia de sua uniformidade (Tabela 4). Essas apresentaram um diâmetro variando de 11 a 14 milímetros, com uma média de 11,89 milímetros e um

desvio padrão de 0,87, podendo-se considerar que, quanto ao tamanho, apresentaram uma regularidade aceitável para os objetivos em vista.

Quanto ao número de conídios por colônia, a média encontrada foi de aproximadamente $3,8 \times 10^7$ com um desvio padrão de aproximadamente $6,1 \times 10^6$, o que demonstra, para as condições de experimento, uma regularidade também aceitável.

Mas, no que diz respeito ao uso de conídios para estudar mutações, não basta conhecer o número de conídios utilizados. É importante conhecer também a sua viabilidade .

Para determinar a frequência de conídios viáveis, o método que comumente se emprega, é o de fazer uma contagem de conídios, e verificar, em meio apropriado, quantos foram capazes de germinar e dar origem a colônia. Mas, devido ao tamanho microscópico dos conídios, essa contagem não é uma contagem direta. Normalmente toma-se uma suspensão, e estima-se, por meio de uma contagem em hematímetro, a quantidade de conídios que ela contém. E para o semeio em meio de cultura, tem-se de proceder a diluições convenientes.

É um método sujeito a grandes erros, mas bastante prático. E pode dar informações satisfatórias sobre a viabilidade dos conídios, desde que se tenha em vista os erros a que está sujeito.

Esse método foi empregado neste trabalho, e os resultados estão na Tabela 12 e na Tabela 14.

Por esse método os conídios apresentaram uma viabilidade variando de 71%, nos revertentes do Tipo C, a 100% nos do Tipo A. A imprecisão do método pode ser observada no caso dos revertentes do Tipo A, que mostram uma média de conídios semeados (19,5), menor do que a média de conídios germinados (22,0).

Tendo em vista a imprecisão desse método, procurou-se estudar um método alternativo, o qual foi denominado de método do replicador e que se acha descrito no ítem 3.11.

Por esse método a porcentagem de conídios viáveis variou de 67% nas reversões do Tipo A a 91% na linhagem *bioA₁ methG₁*. (Tabela 13 e 14).

Da maneira como foi realizado, o método, porém, apresenta grande imprecisão. Primeiramente, foi usado um fator de diluição 10, que não é muito recomendável (FISHER e YATES, 1971), e, além disso, a quantidade de água conduzida por cada alça do replicador teve uma estimativa bastante grosseira.

Contudo, em apenas um caso esses métodos apresentaram diferenças bastante amplas. Foi no caso das reversões do Tipo A, em que a diferença atingiu 33%. Nos demais casos, as diferenças são relativamente pequenas.

De um modo geral, pode-se concluir que a linhagem e os mutantes apresentam conídios com uma viabilidade em torno de 80%, e que não foi de nenhuma forma demonstrado, pela metodologia utilizada, que as mutações afetaram a viabilidade dos conídios.

5.1.2. CABEÇAS CONIDIAIS, QUANTIDADE DE NÚCLEOS, VOLUME DAS COLÔNIAS

Como um dos objetivos do trabalho era verificar se existiam locais preferenciais para ocorrência de mutações, e como os mutantes, relacionados nas Tabelas 1, 2 e 3, provieram de conídios, os quais são formados em cabeças conidiais, procurou-se estudar mais detidamente essas cabeças, não apenas

TABELA 14.

Porcentagem de conídios viáveis estimada pelo método do semeio e pelo método do replicador

MÉTODOS		
LINHAGEM	SEMEIO	REPLICADOR
<i>bioA₁ meth G₁</i>	87%	91%
TIPO A	100%	67%
TIPO B	83%	78%
TIPO C	71%	82%

quanto ao seu comprimento, mas também quanto ao número de conídios. Visava-se, assim, obter dados que pudessem ser confrontados com a quantidade de mutantes obtidos em cada colônia.

O *Aspergillus nidulans*, segundo RAPER e FENNEL(1965), apresenta cabeça conidial colunar variando de 40 a 80 μ m de comprimento por 25 a 40 μ m de largura, podendo-se encontrar, comumente, variações que vão de 60 a 70 μ m de comprimento, por 30 a 35 μ m de largura. As medidas para o comprimento de cabeças conidiais, feitas na linhagem usada neste trabalho, estão na Tabela 9. Essas medidas têm um intervalo de confiança de 70,63 μ m \pm 22,36 μ m, que embora abranja o comprimento maior de 80 μ m, não abrange o valor menor de 40 μ m.

Considerando-se que as cabeças conidiais têm um comprimento que varia de 48,27 μ m a 92,99 μ m (conforme o intervalo de confiança estabelecido) e que o diâmetro dos conídios é de 3 μ m (RAPER e FENNEL, 1965), pode-se admitir que cada coluna de conídios formada, nessas cabeças, tem de 16 a 30 conídios.

O número de conídios em cada cabeça conidial foi determinado por dois métodos descritos no item 3.10. Em um deles, os conídios de um certo número de cabeças eram desagregados em solução de Tween 80 e contados em hematímetro. O resultado é apresentado na Tabela 10. A média de conídios, por cabeça, encontrada por esse método, foi de 4710,25 \pm 2765,91.

No outro método, os conídios de uma cabeça conidial eram desagregados em uma solução de Tween 80. E o número de conídios nessa solução era estimado pelo método da diluições descrito de FISHER e YATES (1971). Foram feitos seis experimentos, cujos dados são apresentados na Tabela 11. Para os níveis de fertilidades médios temos, então, uma média de

5,4 \pm 0,87. Daí resulta uma média de conídios por cabeça igual a 1720,13 com limites fiduciais que vai de 913,35 a 3262,00.

Os dois métodos deram, portanto, resultados diferentes. Deve-se considerar, entretanto, que o método das diluições estima número de conídios viáveis, enquanto o método de contagem, em hematímetro, estima o número total de conídios. Contudo, tendo em vista os estudos já feitos sobre a viabilidade dos conídios, a diferença não pode ser explicada por este aspecto, pois seria necessário que os conídios tivessem uma viabilidade muito baixa.

A imprecisão do método da contagem, em hematímetro, já foi discutida anteriormente (item 5.1.1.). O método de diluições tem um bom fundamento matemático e, no caso desse trabalho, apresenta um erro menor do que o método do hematímetro (Tabela 10 e 11).

Como o número de conídios por colônia foi determinado (Tabela 6), pode-se, então, estimar o número de conídios por cabeça conidial, tendo-se o número de cabeças por colônia.

Para determinar o número de cabeças por colônia foi feita, primeiramente, uma contagem do número de cabeças em um área determinada (item 3.9.), cujo resultado encontra-se na Tabela 8.

A partir daí pôde-se calcular o número de conídios por cabeça, obtendo-se a estimativa de 1925,58 conídios (item 4.6). Essa estimativa não difere estatisticamente do valor estabelecidos pelo método da diluição, mas está fora dos limites fiduciais estabelecido para o método do hematímetro.

Todas as determinações, até agora feitas, visaram possibilitar um enfoque das mutações de uma maneira que pudesse permitir tirar conclusões relacionadas com os dois objetivos principais desse trabalho. E como se verá, esses dados foram fundamentais. Entretanto, considerou-se que seria vantajoso se se pudesse ter estimativas sobre as quantidades de núcleos

envolvidos nesse processo mutacional. Quanto ao estudo quantitativo de núcleos, nos conídios, há trabalhos anteriores em que pudemos nos apoiar (BARROS, 1977). Mas com referências ao micélio, na ausência de dados de literatura, convenientes, foi necessário levantar dados experimentais.

Primeiramente, pela técnica descrita, no item 3.6., determinou-se o volume de cada colônia. Esses dados se encontram na Tabela 4. E a seguir determinou-se o número de núcleo em um volume conhecido de hifa pelo método descrito no item 3.8., obtendo-se os dados que se encontram na Tabela 7, que apresenta uma média de 0,867 núcleos, por parte de hifa de $44,47\mu\text{m}^3$ de volume.

Com esses dados pode-se estimar o número de núcleo para a parte submersa da colônia e para a parte aérea, dados que se encontram na Tabela 15.

Em vista da metodologia empregada para determinação do volume das colônias, essas estimativas se tornam amplamente imprecisas, e apenas podem dar uma idéia vaga da quantidade de núcleos no micélio da linhagem estudada.

5.2. OS MUTANTES

5.2.1. A FREQUÊNCIA DE MUTANTES

Três tipos de reversões do gene *methG*₁, fenotipicamente distinguíveis, foram aqui estudados. E o número de mutantes encontradas, em cada colônia, pode ser visto nas Tabelas 1, 2 e 3, para as reversões do Tipo A, B e C, respectivamente, cujas frequências podem ser encontradas na Tabela 16.

Visando decidir se as diferenças entre essas amostras significavam diferenças efetivas entre as mutações, ou se representavam, apenas, variações

TABELA 15.**Estimativas do número de núcleos, para as diversas partes da colônia.**

PARTES DA COLÔNIA	NÚMERO DE NÚCLEOS
Micélio submerso	$21,7 \times 10^7$
Partes aéreas:	
Conídios	$3,8 \times 10^7$
Outras partes	$8,6 \times 10^7$
Total	$34,1 \times 10^7$

casuais, que podiam ser esperadas entre amostras aleatórias, aplicou-se o Teste de Kruskal-Wallis (SIEGAL, 1975). Esse teste deu como resultado $H = 104,566$, altamente significativo, demonstrando que havia uma diferença efetiva entre as mutações. Assim a hipótese H_0 foi rejeitada, e neste caso, estamos admitindo que, pelo menos duas das mutações diferiam entre si. Para estabelecer quais as mutações que diferiam significativamente empregamos as comparações múltiplas que complementam o Teste de Kruskal-Wallis (CAMPOS, 1976). Para as reversões do tipo A, B e C, foram encontrados os valores, respectivamente, de $R_a = 219,03$, $R_b = 128,71$ e $R_c = 99,26$. Calculou-se a diferença mínima significativa (dms), para 5% de probabilidade, tendo-se encontrado uma $dms\ 5\% = 28,60$, o que mostra que as três mutações diferem entre si.

Vários trabalhos que empregam essa mesma linhagem, (que teve origem em Glasgow) para detectar atividades mutagênicas de agentes físicos e químicos, apresentam resultados referentes a essas reversões espontâneas. SIDDIQUI (1962) menciona uma frequência de mutação espontânea da ordem de $8,2 \times 10^{-6}$, sendo 34,2 % para o Tipo A, 31,2 % para o Tipo B e 35% para o Tipo C.

LILLY (1965) refere-se a uma frequência de 1 em 6×10^4 , que vem a ser aproximadamente 17×10^{-6} . Encontrou para os três tipos porcentagens de 66% A, 31% B e 3% C. Salienta que a frequência encontrada é 100 vezes maior do que aquela mostrada para outros *loci*. ALDERSON E CLARK (1966), realizaram dois experimentos. Em um deles encontraram uma frequência de $9,2 \times 10^{-6}$, com uma distribuição entre os três tipos de 35% A, 65% B e 0% C. Num outro, a frequência foi de $1,1 \times 10^{-6}$, sendo 63% A, 29% B e 8% C. Esses autores mencionam que ROPER, com o mesmo estoque, obteve uma frequência de 10×10^{-6} . Já os dados de DUARTE (1972)

TABELA 16.
Frequência de mutante dos tipos A, B e C.

FREQUÊNCIA				
Número de mutantes	A	B	C	Total
0		7	9	16
1		4	8	12
2	1	9	14	24
3	3	13	11	27
4		9	16	25
5	4	7	9	20
6	3	9	6	18
7	5	7	9	21
8	6	7	7	20
9	4	7	1	12
10	10		1	11
11	9	3	2	14
12	4	4		8
13	3	1		4
14	6	4	2	12
15	3	1		4
16	6			6
17	8	1	1	10
18	1			1
19	5			5
20	2			2
22	1			1
23			1	1
24		1	1	2
25	1			1
26		1	1	2
27	1			1
28	1			1
30		2		2
31	1	1		2
35	1			1
36	1			1
47	1			1
54	1			1
67	1			1
79	1			1
96	1			1
111	1			1
134	1			1
190		1		1
203	1			1
221	1			1
TOTAL	99	99	99	297

mostram uma frequência de $12,6 \times 10^{-6}$ com 58% do Tipo A, 31% do Tipo B e 11% do Tipo C. SCOTT *et al.* (1973) referem-se a frequências de 2 a 5×10^{-6} , enquanto ROCHA (1983) encontrou variações que vão de 6,4 a $20,4 \times 10^{-6}$.

No presente trabalho, foi encontrada uma frequência de $0,95 \times 10^{-6}$, (aproximadamente 1×10^{-6}), com uma proporção de 61% do Tipo A, 25% do Tipo B e 14% do Tipo C. Esses dados se encontram na Tabela 17.

Os dados apresentados pelos diversos autores mostram, portanto, uma discrepância. E como não apresentam medidas de dispersão, torna-se difícil fazer-se uma comparação mais acurada. Não só a metodologia para estimar o número de conídios, mas também o método para estimar o número de mutantes, são fontes de muitos erros, e dão lugar a essa discrepância. Contudo, no trabalho ora apresentado, há um outro fator que se deve considerar. Neste, fora contado o número de mutantes por colônia, e estimado o número de conídios que cada colônia possuía, tendo-se analisado 99 colônias. Nos outros trabalhos referidos, o que se fez foi tomar uma suspensão de conídios, estimar o número de conídios nessa suspensão, e verificar o número de mutantes que surgiu a partir de um volume conhecido da suspensão. Embora, em ambos os casos, se viesse a ter o número de mutantes e o número de conídios, obtendo-se daí a frequência de mutações, o fato de a metodologia ser diferente, pode justificar um resultado diferente. Realmente, de todos os dados apresentados na Tabela 17, os desse trabalho, para total de mutantes, é o que mostra valor mais baixo.

Empregamos uma metodologia diferente tendo em vista os objetivos desse trabalho. Mas essa metodologia possibilita ainda que se estime, não apenas a média das frequências de mutantes, mas também o desvio padrão referente a essa frequência. Como a frequência de mutantes é um quociente de

uma variável x (o número de mutante) e uma variável y (o número de conídios), a média e o desvio padrão do quociente x/y , podem ser estimados, pelas fórmulas que seguem (BRIEGER, 1955), desde que se tenha a média (\bar{x}), e o desvio padrão (σx) de x e também a média (\bar{y}) e o desvio padrão (σy) de y :

$$\text{Média.de.} \frac{x}{y} = \frac{\bar{x}}{\bar{y}} \left\{ 1 + \left(\frac{\sigma y}{\bar{y}} \right)^2 \right\}$$

$$\text{Desvio.padrão.de} \frac{x}{y} = \pm \frac{\bar{x}}{\bar{y}} \sqrt{\left(\frac{\sigma x}{\bar{x}} \right)^2 + \left(\frac{\sigma y}{\bar{y}} \right)^2}$$

Utilizando essas fórmulas encontrou-se uma média de frequência igual a $0,969 \times 10^{-6}$ com limites fiduciais de $0,766 \times 10^{-6}$ a $1,17 \times 10^{-6}$. Dos dados dos outros autores mostrados na Tabela 17, apenas os de um dos experimentos de ALDERSON e CLARK (1966) se situam dentro desses limites.

5.2.2. A MÉDIA DE NÚCLEOS QUE MUTARAM

A frequência de conídios mutados não dá efetivamente uma idéia do número de mutações que realmente ocorreram. Isso é fácil de entender. No caso do *Aspergillus nidulans* os conídios são formados a partir dos esterigmas secundários por repetidas divisões do seu núcleo. Os conídios iniciam o seu

TABELA 17.

Frequência de mutações espontâneas, determinada por vários autores.

AUTORES	Frequencia de Totais de Mutantes	Porcentagem dos tipos		
		A	B	C
SIDDIQUI(1962)	$8,2 \times 10^{-6}$	34%	31%	35%
LILLY(1965)	17×10^{-6}	66%	31%	3%
ROPER (ALDERSON E CLARK, 1966)	10×10^{-6}			
ALDERSON E CLARK (1966)	$9,2 \times 10^{-6}$	35%	65%	0%
ALDERSON E CLARK (1966)	$1,1 \times 10^{-6}$	63%	29%	8%
DUARTE (1972)	$12,6 \times 10^{-6}$	58%	31%	11%
SCOTT <i>et al</i> (1973)	$2 \text{ a } 5 \times 10^{-6}$			
ROCHA (1983)	$6,4 \text{ a } 20,4 \times 10^{-6}$			
Dados deste Trabalho	1×10^{-6}	61%	25%	14%

desenvolvimento como uma protuberância citoplásmica na extremidade do esterigma. Então o núcleo do esterigma se divide mitoticamente, e enquanto um deles entra na região que vai se transformar em conídio, o outro move-se para a extremidade oposta. E na medida em que o conídio fica delimitado, o núcleo do esterigma começa a se dividir novamente para produzir um outro conídio. E o processo continua, formando uma longa cadeia, na qual o último conídio formado é o que fica próximo do esterigma, enquanto aquele que foi formado primeiro é o que fica mais distante (TIMBERLAKE, 1990).

Essa cadeia de conídios e os esterigmas podem ser vistos na Figura 7 e 8.

Com esse processo de formação fica evidente que o número de conídios mutados numa cadeia, vai depender do momento em que a mutação ocorreu no núcleo do esterigma. E é claro que se a mutação ocorreu muito antes da formação dos esterigmas, toda uma cabeça conidial pode ser mutada. É por esse motivo que quando se tem a frequência de conídios mutados, não se tem, efetivamente, a frequência de mutações que realmente ocorreram, por núcleo. E, por conseguinte, não se tem uma taxa de mutação.

Como assinalaram FINCHAM e DAY (1971) nesse caso o ideal é determinar “a probabilidade de ocorrência de mutação por núcleo, por unidade de tempo, ou por tempo de geração nuclear.” Isso é possível em organismos que crescem em forma de células livres. Em fungos filamentosos contudo, só se obtém com facilidade uma amostra de núcleos, pela utilização de esporos, o que torna difícil determinar a taxa de mutação. Normalmente o que se determina é uma frequência de esporos mutantes.

É isso que é feito comumente no estudo de mutação, quando se utiliza a linhagem *bioA₁ methG₁*. Nesse caso, a amostra de núcleo provém da amostra de conídio, onde, conforme já referido, o número de núcleos mutados não correspondente ao número de núcleos que sofreram mutação. Daí a

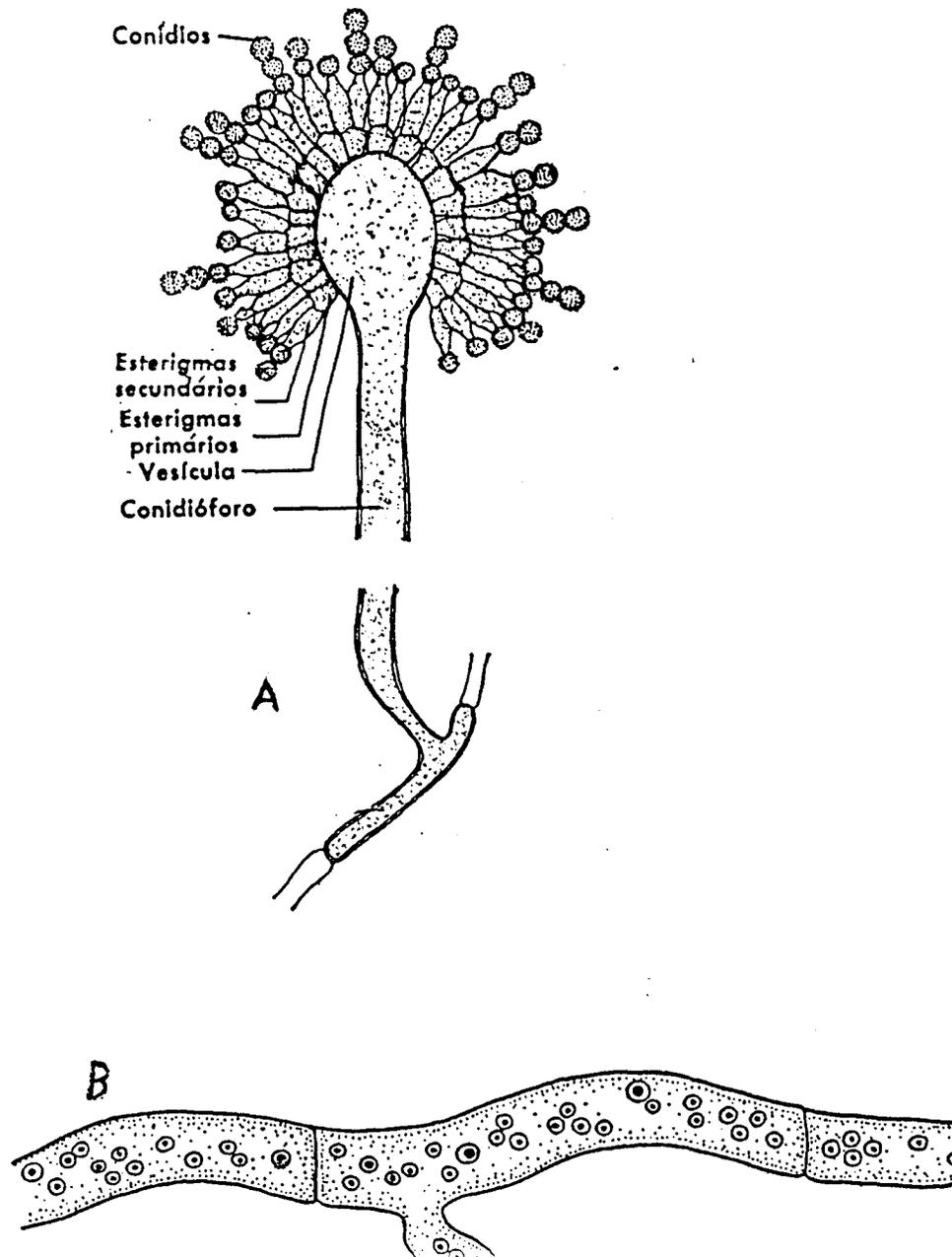


Figura 7. Conidióforo e hifa de *Aspergillus nidulans*.

A- Conidióforo com duas fileiras de esterigmas. B- Hifa multinucleada

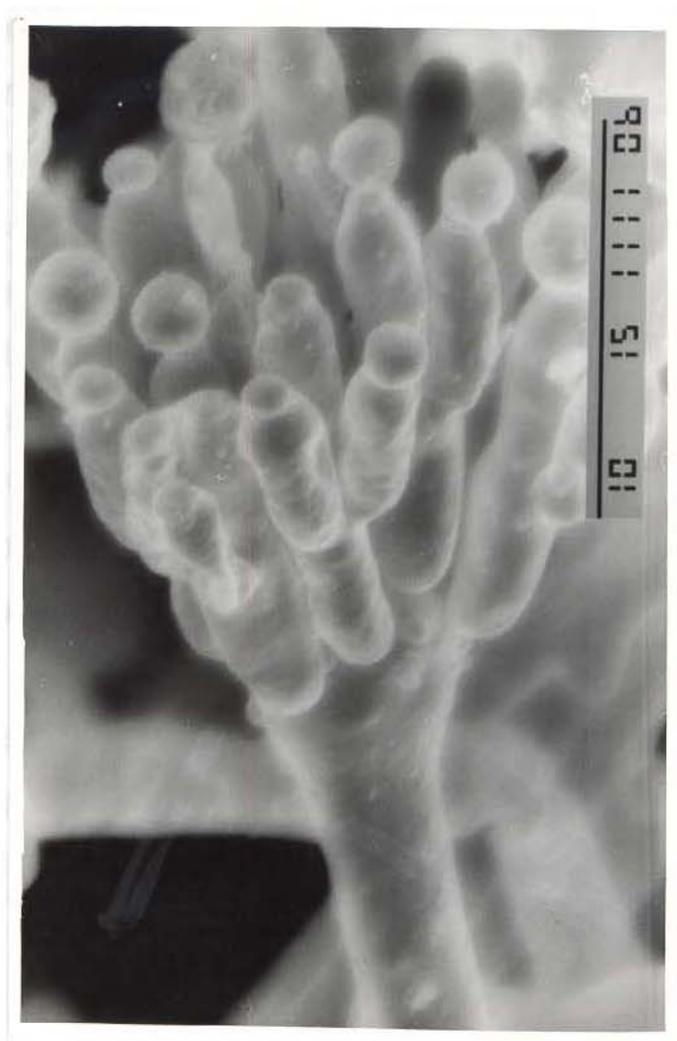


Figura 8. Cabeça conidial de *Aspergillus nidulans*, mostrando esterigmas primários e secundários

necessidade de se estabelecer um modelo matemático que possibilite estimar o número de núcleos que mutaram, a partir do número de conídios mutados.

Neste trabalho, três distribuições de frequências foram consideradas, mas, diante das restrições feitas, elas se equivalem, nas estimativas da média do núcleo que sofreram mutação (n_1p_1) e na média de núcleo gerados por núcleo mutados (λp_2). Embora na apresentação dessas distribuições (item 3.12) tenha-se conservado os símbolos usados nos trabalhos referidos, nos resultados que encontramos, preferimos usar a simbologia de BARACHO e PIEDRABUENA. Esses resultados estão no item 4.1. E para que sejam melhor visualizados, nessa discussão, foram resumidos na Tabela 18.

Essa tabela apresenta, na parte A, as estimativas encontradas para os três tipos de reversão, utilizando todos os dados das Tabelas 1, 2 e 3. O que esses dados mostram é que as variâncias das reversões do tipo A e B são enormes e que esses tipos apresentam também uma média de núcleo, que mutaram, muito baixa. Por outro lado, para esses tipos, a média de núcleos gerados por esses núcleos mutantes, foi bastante alta, da ordem de 52,80 para o tipo A e de 42,21 para o Tipo B.

Tendo em vista o número de conídios que uma cadeia contém e que foi estimado, para esse trabalho, em cerca de 16 a 30, chega-se à conclusão que para um núcleo, que mutou, gerar 52 núcleos ou mesmo 43, esse núcleo, ao mutar, não poderia pertencer ao esterigma secundário.

Para se ter uma estimativa baseada em núcleos do esterigma secundário, fez-se, então, uma outra estimativa na qual apenas se considerou as colônias que apresentaram número de mutantes inferior a 30.

Os resultados obtidos se encontram na parte B da Tabela 18. Aí se verifica que a reversão do Tipo A, apresentou uma média de núcleos que mutaram igual a 9,31 e que a média de núcleos gerados, por esses, foi de 1,32.

TABELA 18.

Média (m) e variância (s^2) para os dados das tabelas 1, 2 e 3, bem como estimativas das médias de núcleos que mutaram (n_1p_1) e dos núcleos gerados por esses núcleos (λp_2)

A- Considerando todas as colônias

B- Considerando apenas colônias com menos de 30 mutantes

	Reversões	s^2	m_1	n_1p_1	λp_2
A	Tipo A	1186,87	22,06	0,38	52,80
	Tipo B	378,41	8,76	0,21	42,21
	Tipo C	22,34	4,97	1,42	3,49
	Típos A+ B + C	1474,38	35,93	0,90	40,03
B	Tipo A	28,54	12,30	9,31	1,32
	Tipo B	23,42	6,17	2,21	2,80
	Tipo C	22,34	4,97	1,42	3,49

Para a reversão do Tipo B, as estimativas encontradas foram respectivamente de 2,21 e 2,80 e para o Tipo C, de 1,42 e 3,49 respectivamente.

Os dados dos experimentos aqui realizados parecem mostrar que a grande maioria das mutações ocorrem na conidiação. O número de conídios por cabeça conidial encontrado em dois tipos de experimentos foi em média de 4.710,25 e 1720,13 (Tabelas 10 e 11). Contudo o maior número de conídios mutados, por colônia, que se encontrou foi de 221 na reversão do tipo A (Tabela 1), de 190 na reversão do tipo B (Tabela 2) e de 26 na reversão do tipo C (Tabela 3).

Isso indica que, nesses experimentos, em nenhum caso, o núcleo mutante deu origem a uma cabeça conidial inteira, e ao que parece as mutações se realizaram, preferencialmente, em nível de esterigma.

Como essas reversões são capazes de formar conídios e como as mutações analisadas, aqui, parecem que se realizaram em nível de esterigma, a menor capacidade de formar conídios mutados, poderia decorrer de uma menor velocidade de geração desses núcleos mutantes.

É possível que os núcleos que apresentaram a reversão respondam a mecanismos regulatórios diversos dos da linhagem normal. E atuando em hifas onde os núcleos normais seriam predominantes, eles possam sofrer um efeito seletivo que se refletiria no seu processo de divisão e até mesmo na sua participação no processo de formação de conídios.

A probabilidade de ocorrência de mutações no micélio submerso deveria ser aproximadamente cinco vezes maior do que a probabilidade de ocorrência de mutações nos conídios, tendo em vista o número de núcleos em cada uma dessas partes (Tabela 15). Entretanto, nos casos aqui estudados, em nenhuma oportunidade, foi possível verificar a existência de setores mutados. Isso poderia decorrer de as mutações serem selecionadas nos micélios, ou

ocorrerem com probabilidade muito diferentes na formação dos conídios e nos micélios.

O fato de se supor mutações realizadas predominantemente em nível de esterigma, faz supor a existência de células propensas a mutar, como já foi sugerido por outros autores, em bactérias (De COURCY Jr, 1973).

Apesar de ter sido estimada a média de núcleos que sofreram mutação e o número de conídios que foram gerados a partir desses núcleos, não é possível calcular-se a taxa de mutação dos genes envolvidos, em face de não se poder relacionar os fenótipos estudados, com um único gene.

5.3. O MODELO

Este trabalho teve dois objetivos principais. O primeiro já foi examinado no item anterior. O outro era estudar modelos que possibilitem determinar a taxa de mutação, em fungos filamentosos. Esse objetivo será examinado agora.

No item 3.12. três distribuições foram consideradas capazes de interpretar, em termo de probabilidades, a ocorrência de conídios mutantes, que se formaram a partir de sucessivas divisões de um núcleo que sofreu mutação. Essas distribuições, entretanto, consideradas as restrições feitas (item 3.12.), revelaram-se semelhantes, restringindo os modelos a serem testados, a um único modelo. É evidente que, neste caso, a distribuição a ser testada deverá ser aquela que possibilite maior facilidade de cálculo. Por isso escolhemos a distribuição de GREENWOOD e YULE (1920), cujas frequências podem ser calculadas, por meio de uma Binomial Generalizada, conforme foi

demonstrada por PIEDRABUENA (1968), tendo em vista que o uso dessa binomial facilita os cálculos.

Calculadas as frequências para a distribuição teórica (distribuição teórica de GREENWOOD e YULE), e para os dados amostrais referentes às reversões do Tipo A, B e C (Tabela 16), procurou-se verificar, por meio de um teste de aderência, se o ajuste dos dados observados à distribuição teórica, escolhida, era satisfatória ou não. O teste de aderência que foi empregado, foi o teste de KOLMOGOROV-SMIRNOV, que procura especificar a distribuição de frequência acumulada sob a distribuição teórica e compará-la com a distribuição de frequência acumulada observada. O ponto em que essas duas distribuições - teórica e observada - acusam maior divergência é determinado, e verifica-se se essa diferença máxima (D) pode ser atribuída ao acaso (SIEGEL, 1975).

O teste de KOLMOGOROV-SMIRNOV, portanto, poderá nos dizer, se o modelo matemático escolhido serve aos nossos propósitos, que eram poder estimar a média de núcleos que sofreram mutação, a partir do número de cópias mutados, podendo com essa estimativa calcular a taxa de mutação, por núcleo, por geração.

Aplicou-se o teste de aderência para os três tipos de reversão cujas frequências se encontram na Tabela 16, mas apenas considerou-se o número de mutantes inferior a 30, por razões que foram assinaladas no item 5.2.2.

O resultado do teste de KOLMOGOROV-SMIRNOV, para as reversões do Tipo A, pode ser visto na Tabela 19. Foi encontrado um valor de $D = 0,0444$ não significativo à 5 % de probabilidade, indicando, portanto, que a distribuição de GREENWOOD e YULE, se ajusta aos dados.

Para as reversões do tipo B, o resultado se encontra na Tabela 20. Nesse caso temos um valor de $D = 0,0361$, também não significativo à 5 % de

probabilidade. Para as reversões do Tipo C, o resultado do teste é apresentado na Tabela 21, onde se encontra um valor de $D = 0,0877$, não significativo à 5%.

As frequências amostrais dos três tipos de reversão se ajustam, portanto, às frequências teóricas da Distribuição de GREENWOOD e YULE, o nosso modelo testado. É válido, por conseguinte, usar essa distribuição para obter, a partir do número de conídios mutados, a média de núcleos que sofreram mutação. E pode-se, certamente, com essa estimativa calcular a taxa de mutação por núcleo, por geração, quando os dados forem referentes a um único gene.

TABELA 19.

Teste de Kolmogorov-Smirnov, para verificar a bondade do ajuste das frequências observadas para as reversões do tipo A, (Tabela 16) às frequências teóricas da distribuição de Greenwood-Yule.

n	Frequência Observada	Frequência Esperada	Freq.Observada Acumulada	Freq.Esperada Acumulada	Diferença
0	0	0,004	0	0,004	0,004
1	0	0,0021	0	0,0025	0,0025
2	0,0115	0,0061	0,0115	0,0086	-0,0029
3	0,0345	0,0131	0,046	0,0217	-0,0217
4	0	0,023	0,046	0,0447	-0,0013
5	0,0459	0,0348	0,0919	0,0795	-0,0124
6	0,0345	0,0472	0,1264	0,1267	0,0003
7	0,0575	0,0587	0,1839	0,1854	0,0015
8	0,0689	0,0681	0,2528	0,2535	0,0007
9	0,0459	0,0745	0,2987	0,328	0,0293
10	0,1149	0,0775	0,4136	0,4055	-0,0081
11	0,1034	0,0774	0,517	0,4829	-0,0341
12	0,0459	0,0745	0,5629	0,5574	-0,0055
13	0,0345	0,0694	0,5974	0,6268	-0,0294
14	0,0689	0,0629	0,6663	0,6897	0,0234
15	0,0345	0,0555	0,7008	0,7452	0,0444*
16	0,0685	0,048	0,7693	0,7932	0,0239
17	0,0919	0,041	0,8612	0,8342	-0,027
18	0,0115	0,0341	0,8727	0,8683	-0,0044
19	0,0575	0,0278	0,9302	0,8961	-0,0341
20	0,023	0,0244	0,9532	0,9206	-0,0326

* $D = 0,0444$ não significativo à 5%

Número de colônias consideradas = 87

Obs: Só foram consideradas colônias com menos de 30 mutantes

TABELA 20.

Teste de Kolmogorov-Smirnov, para verificar a bondade do ajuste das frequências observadas para as reversões do tipo B, (Tabela 16) às frequências teóricas da distribuição de Greenwood-Yule.

n	Frequência Observada	Frequência Esperada	Freq.Observada Acumulada	Freq.Esperada Acumulada	Diferença
0	0,0737	0,0527	0,0737	0,0527	0,021
1	0,0421	0,0857	0,1158	0,1384	-0,023
2	0,0947	0,5011	0,2105	0,2395	-0,029
3	0,1368	0,1044	0,3473	0,3439	0,0034
4	0,0947	0,1002	0,442	0,4441	-0,0021
5	0,0737	0,913	0,5157	0,5356	-0,0199
6	0,0947	0,81	0,6104	0,6166	0,0062
7	0,0737	0,7	0,6841	0,6866	-0,0025
8	0,0737	0,0594	0,7578	0,7459	0,0119
9	0,0737	0,0495	0,8315	0,7954	0,0361*
10	0	0,409	0,8315	0,8363	-0,0048
11	0,0316	0,3334	0,8631	0,8697	-0,0066
12	0,0421	0,0271	0,9052	0,8968	0,0084
13	0,0105	0,0218	0,9157	0,9186	-0,0029
14	0,0421	0,0174	0,9578	0,936	0,0218
15	0,0105	0,0128	0,9683	0,9488	0,0195
16	0	0,011	0,9683	0,9598	0,0085
17	0,0105	0,0087	0,9783	0,9685	0,0098
18	0	0,0068	0,9788	0,9753	0,0035
19	0	0,0053	0,9788	0,9806	0,0018
20	0	0,0042	0,9788	0,9848	0,006

* $D = 0,0361$ não significativo à 5 %

Número de colônias consideradas = 95

Obs: Só foram consideradas colônias com menos de 30 mutantes

TABELA 21.

Teste de Kolmogorov-Smirnov, para verificar a bondade do ajuste das frequências observadas para as reversões do tipo C, (Tabela 16) às frequências teóricas da distribuição de Greenwood-Yule.

n	Frequência Observada	Frequência Esperada	Freq.Observada Acumulada	Freq.Esperada Acumulada	Diferença
0	0,0909	0,1179	0,0909	0,1179	0,027
1	0,0808	0,1304	0,1717	0,2484	0,0767
2	0,1414	0,1228	0,3131	0,3712	0,0581
3	0,1111	0,1033	0,4242	0,4746	0,0504
4	0,1616	0,0936	0,5858	0,5682	-0,0176
5	0,0909	0,0789	0,6767	0,6472	0,0295
6	0,0606	0,0656	0,7373	0,7129	-0,0245
7	0,0909	0,0541	0,8282	0,7669	-0,0613
8	0,0707	0,0443	0,8989	0,8112	-0,0877*
9	0,0101	0,0360	0,909	0,8472	-0,0618
10	0,0101	0,0292	0,9191	0,8764	-0,0427
11	0,0202	0,0236	0,9393	0,9	-0,0393
12	0	0,0190	0,9393	0,9119	-0,0274
13	0	0,0152	0,9393	0,9271	0,0122
14	0,0202	0,0122	0,9595	0,9393	0,0202
15	0	0,0098	0,9595	0,9491	0,0104
16	0	0,0078	0,9595	0,9569	0,0026
17	0,0101	0,0062	0,9696	0,9631	0,0065
18	0	0,0049	0,9696	0,968	0,0016
19	0	0,0039	0,9696	0,9719	0,0023
20	0	0,0031	0,9696	0,975	0,0054

* D= 0,0877 não significativo à 5%.

Número de colônias consideradas = 99

6.0.CONCLUSÕES

O trabalho teve dois objetivos principais :

1- Verificar se podia haver em fungos filamentosos locais preferenciais para a ocorrência de mutação.

2- Estudar modelos matemáticos que possibilitassem a determinação da taxa de mutação em fungos filamentosos .

Quanto ao primeiro ponto a conclusão a que se chega é que as mutações analisadas se realizaram, preferencialmente, em nível de esterigma.

Quanto ao segundo ponto a conclusão que se tira é que as frequências amostrais das mutações, que foram analisadas, se ajustam às frequências teóricas da Distribuição de GREENWOOD e YULE, sendo válido, portanto, utilizar essa distribuição para obter, a partir do número de conídios mutados, a média de núcleos que sofreram mutação, o que permite estimar a taxa de mutação por núcleo, por geração.

7.0. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ALDERSON, T. and CLARK, A. M. - 1966. Interlocus specificity for chemical mutagens in *Aspergillus nidulans*. **Nature**, 210: 593-595.
- ARMITAGE, P. - 1952. The statistical theory of bacterial populations subject to mutation. **J. R. Statist. Soc. B**, 14:1
- ARMITAGE, P. - 1953. Statistical concepts in the theory of bacterial mutation **J. Hyg.** 51, 162-183.
- AYLING, P.D. - 1969. Methionine suppressors in *Aspergillus nidulans*: their genetics and behaviour in heterokaryons and diploids. **Genet. Res. Camb.**, 14: 275-289.
- AZEVEDO, J.L. e COSTA, S.O.P. - 1973. Exercícios de Genética para cursos de graduação e pós-graduação. Edusp. São Paulo -SP
- BAL, J; MACIEJKO, D.M., KAJTANIAK, E.M. and GAJEWSKI, W. - 1978. Supersuppressors in *Aspergillus nidulans*. **Molec. Gen. Genet**, 159: 227-228.
- BALL, C. - 1967. Chromosome instability related to gene suppression in *Aspergillus nidulans*. **Gen. Res. Camb.**, 10: 173-183.
- BARROS, J.P.- 1977. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans*. Tese de Mestrado. ESALQ. Piracicaba. São Paulo.
- BENSON, S. A. ; DeCLOUX, A.M. and MUNRO, J.- 1991. Mutant bias in nonlethal selections results from selective recovery of mutants. **Genetics**: 129: 647-658.

- BOS, C.J. - 1987. Induction and isolation of mutants fungi at low mutagen doses. **Curr.Genet.** 12: 471-474.
- BRIEGER, F.G. - 1955. Curso de Estatística. I parte ESALQ - Piracicaba.
- BUTING, M.I. - 1940a - A description of some colors variants produced by *Serratia marcescens*, strain 274. **J. Bact.** 40:57-68.
- BUTING, M.I. - 1940b. The production of stable populations of color variants of *Serratia marcescens*, 274 in rapidly growing cultures . **J. Bact.** 40, 69-81.
- CAMPOS, H. - 1976. Estatística experimental não-paramétrica. ESALQ-Piracicaba. 2ª edição
- CAIRNS, J. ; OVERBAUGH, J. and MILLER, S. - 1988. The origin of mutants. **Nature** . 335: 142-145.
- CAIRNS, J. and FOSTER, P.L. - 1991. Adaptative reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. **Genetics**, 128: 695-701.
- COLE, J., ARLETT, C.F. and GREEN, M.H.L. - 1976. The fluctuation test as a more sensitive system for determining induced mutation in L 5178y mouse lymphoma cells. **Mutat. Res.**, 41: 377-386.
- COLLINGS, B.J., MARGOLIN, B.H. and OEHLERT, G.W. - 1981. Analysis for Binomial Data, with Application to the Fluctuation Test for Mutagenecity. **Biometrics**, 37: 775-794.
- CRANE, G.J.; THOMAS, S.M. and JONES, M.E.- 1996. A modified Luria-Delbruck fluctuation assay for estimating and comparing mutation rates. **Mutat. Res.**, 354: 171-182.
- CRUMP, K. and HOEL, D. - 1974. Mathematical models for estimating mutation rates in cell population. **Biometrika**, 61: 237-252 .

- DESKOWITZ, M. and SHAPIRO, A. - 1935. Numerical relations of an unstable variant of *Salmonella abiotycke*. **Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y.** 32, 573.
- DUARTE, F.M. - 1971. Efeitos mutagênicos de alguns ésteres de ácidos inorgânicos em *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Cultura**, 24 (1): 42-52.
- ESHEL, I. - 1981. An the Survival probability of a slighty advantageous mutant gene with a general distribution of progeny size-branching process model. **J. Mathem. Biol.**, 12/3: 355-362.
- FINCHAM, J.R.S. and DAY, P.R. - 1971. Fungal Genetics. Botanical Monographs, vol 4. Blackwell Scientific Publications. Philadelphia, Pennsylvania.
- FISHER, R.A. e YATES, F. - 1971. Tabelas estatísticas para pesquisa em Biologia, Medicina e Agricultura. Editora da Universidade de São Paulo - Polígono. 150p. São Paulo-SP.
- FOSTER, P.L. - 1993. Adaptative mutation: The uses of Adversity. **A. Rev. Microb.**, 47: 467-504.
- FOSTER, P.L. and CAIRNS, J. - 1992. Mechanisms of Directed Mutation. **Genetics**, 131:783-789.
- FU, J.; LI, I. C .and CHU, E.H.Y. - 1982. The parameters for quantitative analysis of mutation rates with cultured mammalian somatic cells . **Mutat. Res.**, 105: 365-370
- FURTADO, J.S. - 1968. Basidial cytology of *Exidia nucleata*. **Mycologia**, 1: 9-15.
- GAJEWSKI, W. and LITWINSKA, J. - 1968. Methionine *loci* and their suppressors in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Gen. Genet**, 102: 210-220

- GILBERT, R.I. - 1980. The analysis of Fluctuation Test. **Mutat. Res.**, 74: 283-289.
- GIZATULLIN, F.S. and BABYNIN, E.V. - 1996. The selection-induced his⁺ reversion in *Salmonella thyphimurium*. **Mutat. Res.**, 357: 43-56.
- GRAY, J.R. - 1967. Probability -1st edition. Oliver & Boyd. Edimburgh and London,UK.
- GREEN, M.H.L. and MURIEL, W.J. - 1976. Mutagen testing using TRP⁺ reversion in *Escherichia coli*. **Mutat. Res.**, 38: 3-32.
- GREEN, M.H.L., MURIEL,W.J., and BRIDGES, B.A. - 1976. Use of simplified fluctuation test to detect low levels of Mutagenes. **Mutat. Res.**, 38: 33-42.
- GREEN, M.H.L., BRIDGES, B.A., ROGERS, A.M., HORSPOOL, G., MURIEL,W.J., BRIDGES, J.W. and FRY, J.R. - 1977. Mutagens screening by a simplified bacterial fluctuation test: use of microsomal preparations and whole liver cells for metabolic activation . **Mutat. Res.**, 48: 287-294.
- GREENWOOD, M. and YULE, G.U. - 1920. An enquiry into the nature of frequency distribuitons representative of multiple happenings with particular reference of multiple attaks of disease or of repeted accidents. **Jorn. Roy. Stat. Soc.**, 83: 255-279.
- HALL, B.G.- 1988. Adaptative evolution that requires multiple spontaneous mutations . I mutations involving and insertation sequence . **Genetics**, 120: 887-897.
- HALL, B.G. - 1990. Spontaneous point mutations that occur more often when advantageous than when neutral. **Genetics**, 126: 5-16.
- HARRIS, R.S.; LONGERICH, S., ROSEMBERG, S.M. - 1994. Recombination in adaptative mutation,. **Science**, 264: 258-260.

- HAYES, W. - 1968. DNA as Genetic Material . Oxford -, Blackwell scientific Publications, 297-338.
- HOEVEN, van der; KOOLJMAN, S.A.L.M., and RAAT, W.K. - 1990. Salmonella test: relation between mutagenicity and number of revertant colonies. **Mutat. Res.** , 234: 289-302.
- HOPPE, F.M. - 1992. The survival probably of a mutation in a multidimensional population. **J. Math. Biol.**, 30: 567-575.
- HOPPE, F.M. - 1992. Assymptotic rates of growth of the extinction probability of a mutant gene. **J. Math. Bio.** 30:547-566.
- JAEGER, G. and SARKAR, S. - 1995. On the distribution of bacterial mutants: the effects of differential fitness of mutants and non-mutants. **Genética**, 96: 217-223.
- JONES, M. E. - 1994. Luria-Delbruck fluctuation experiments: accounting simultaneously for plating efficiency and differential growth rate. **J. Theor. Biol.**, 166: 355-362.
- JONES, M.E., THOMAS, S.M. and ROGERS, A. - 1994. Luria-Delbruck fluctuation experiments: design and analysis. **Genetics**, 136: 1209-1216.
- KENDAL, D.G. - 1953. Stochastic process and the growth of bacterial colonies . **Symp. Soc. Exp. Biol.** 7 .
- KENDAL, W.S. and FROST, P.- 1988. Pitfalls and practice of Luria-Delbruck Fluctuation Analysis: A Review 1. **Câncer Res.**,48: 1060-1065.
- KIMMEL, M. and AXELROD, D.E. - 1994. Fluctuation test for two-stage mutations: application to gene amplification. **Mutat. Res.**, 306: 45-60.
- KOCH, A.L. - 1982. Mutation and growth rates from Luria - Delbruck fluctuation tests. **Mutat. Res.**, 95: 129-143.

- KOCH, A.L. - 1982. Mutation and growth rates from Luria - Delbruck fluctuation tests. **Mutat. Res.**, 95: 129-143.
- KOZIOL, J.A. - 1991. A note on efficient estimation of mutation rates using Luria-Delbruck fluctuation analysis. **Mutat. Res.**, 249: 275-280.
- LEA, D.E. and COULSON, C.A. - 1949. The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. **J. Gen.**, 49 : 264-285.
- LENSKI, R.E ; SLATKIN, M. and AYALA, F.J. - 1989. Mutation and selection in bacterial populations: Alternatives to the hypothesis of directed mutation. **Proc. Natl. Acad. Sci-USA**, 86: 2775-2778.
- LENSKI, R.E. and MITTLER, J.E. - 1993. The directed mutation controversy and neo darwinism. **Science**, 259: 188-194.
- LI, I-CHIAN, WU, S ; FU, J and CHU, E.H.Y. - 1985. A deterministic approach for the estimation of mutation rates in cultured mammalian cells. **Mutat. Res.**, 149: 127-132.
- LI, I-CHIAN and CHU, E.H.Y. - 1987. Evaluation of methods for the estimation of mutation rates in cultured mammalian cell populations. **Mutat. Res.**, 190: 281-287.
- LILLY, J.L. - 1963. A possible technique for the simultaneous measurement of forward mutation rate in several cistrons. **Aspergillus News Letter** ,4.
- LILLY, J.L. - 1965. An investigation of the suitability of the suppressors of meth 1 in *Aspergillus nidulans* for study of induced and spontaneous mutation. **Mutat. Res.**, 2: 192-195.
- LURIA, S.E. - 1946. Spontaneous bacterial mutations to resistance to antibacterial agents. **C. Sp. B. Symp. on Quant. Biol.**, XI: 130-138.

- LURIA , S.E. and DELBRUCK, M. - 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. **Genetics** , 28: 491-511.
- MAGNI, G.E. and VON BORSTEL, R.C. - 1962. Different rates of spontaneous mutation during mitosis and meiosis in yeast . **Genetics**, 47: 1097-1108.
- MARQUARDT, H. - 1976. Spontaneous mutation in fungi. **Humangenetik**, 16: 7-18.
- MILLER, J.H. - 1996. Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathway of mutagenesis and repair. **Annu.Rev. Microbiol.**, 50: 625-643.
- MORROW, J. - 1975. On the relationship between spontaneous mutation rates in vivo and vitro. **Mutat. Res.**, 33 : 367-372.
- NÁDAS, A., GONCHAROVA,.E.I. and ROSSMAN,.T.G. – 1996a. Maximum likelihood estimation of spontaneous mutation rates from large initial population. **Mutat. Res.**, 351: 9-17.
- NÁDAS, A., GONCHAROVA, E.I. and ROSSMAN, T.G., 1996b. Mutations and infinity: improved statistical methods for estimating spontaneous rates. **Environm. and Molec. Mutag.**, 28: 90-99.
- NEWCOMBE , H.B, 1948. Delayed phenotypic expression of spontaneous mutations in *Escherichia coli*. **Genetics** , 33: 447-476.
- O'NEILL, J.P., BRIMES, P. A . and HSIE, A.W. - 1981. Fluctuation analysis of spontaneous mutations to 6-thioguanine resistance in chinese hamster ovary cells in culture. **Mutat. Research**, 82: 343-353.
- PAKES, A.G. - 1992. Limit theorems for the numbers of rare mutants a branching process model. **Adv. Appl. Prob.**, 24: 778-794.

- PARRY, J.M. - 1977. The use of yeast cultures for the detection of environmental mutagens using a fluctuation test. **Mutat. Res.**, 46: 165-176.
- PIEDRABUENA, A.E. - 1968. Distribuições interferidas. Estudo sobre uma distribuição generalizada. (Tese de Mestrado). ESALQ.Piracicaba.
- PONTECORVO, G ; ROPER, J.A. ; HEMMONDS, L.M. ; MacDONALD, K.D. and BUFTON, A.W. - 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans* . **Adv. Gen.** ,5: 141-238.
- PUTRAMENT, A; GUZEWSKA, J. and PIENIAZEK, D. - 1970. Further characteristics of methionine mutants and their suppressors in *A. nidulans*. **Mol. Gen. Genet**, 109: 209-218.
- PRICKETT, M.S. ,COULTRIP, L., PATTERSON, M.K. and MORROW, J. - 1974. Effect of ploidy on spontaneous mutation rate to asparagine non-requeriment in cultured cells. **J. Cell. Physiol**, 85: 621-626.
- RAPER, K.B. and FENNELL, D.I. - 1965. The genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins Company. Baltimore.
- RYAN, F.J. and WAINWRIGHT, L.K. - 1954. Nuclear segregation an the growth of clones of spontaneous mutants of bacteria. **J.Gen. Microbiol.**, 11: 364-379.
- ROCHA, C.L.M.S.C. - 1983. Detecção da atividade mutagênica de produtos químicos no sistema meth1 em *A. nidulans*. (Tese de Mestrado) -UFPR-77pag
- ROSEMBERG, S.M. - 1994. In pursuit of a molecular mechanism for adaptative mutation. **Genome**, 37: 893-899.
- ROSSMAN, T.G., GONCHAROVA, E.I. and NÁDAS, A. - 1995. Modeling and measurement of the spontaneous mutation rate in mammalian cells. **Mutat. Res.**, 328: 21-30.

- SARKAR, S. - 1991. Haldane's solution of the Luria-Delbruck distribution. **Genetics**, 127:257-261.
- SARKAR, S., MA, W.T. and SANDRI, G.v.H. - 1992. On fluctuation analysis: a new , simple and efficient method for computing the expected number of mutants. **Genética**, 85: 173-179.
- SIDDIQUI, O.H. - 1962. Mutagenic action of nitrous acid on *Aspergillus nidulans*. **Genet. Res.**, 3: 303-314.
- SIEGEL, S. - 1975. Estatística não-parâmetros . Editora Mcgraw-Hill do Brasil, São Paulo.
- SCOTT, B.R. e ALDERSON., T. - 1971. The random (non-specific) forward mutational response of gene *loci* in *Aspergillus nidulans* conidia after photosensitisation to near ultraviolet light by 8 methoxypsoralen. **Mutat. Res.**, 12: 29-34.
- SCOTT, B.R. , ALDERSON, T. and PAPWORTH, D.G. - 1973. The effect of plating densities on the retrieval of methionine suppressor mutation after ultraviolet or gamma irradiation of *Aspergillus*. **J. Gen. Microb.**,75: 235-239.
- SHAPIRO, A. - 1946. The kinetics of growth and mutation in bacteria . **Cold Spr. Harb . Symp. Quant. Biol.** ,11: 228.
- SMITH,K.C, 1992. Spontaneous mutagenesis experimental, genetic and other factors. **Mutat. Res.**, 277: 139-162.
- STANIER, R. Y. ; DOUDOROF, M. e ADELBERG, E.A. - 1969. Mundo dos micróbios. Editora Edgard Blucher. São Paulo.
- STEWART, F.M. - 1991. Fluctuation analysis the effect of plating efficiency. **Genética**: 84: 51-55

- STEWART, F.M. - 1991. Fluctuation analysis the effect of plating efficiency. **Genética**: 84: 51-55
- STEWART, F.M. - 1994. Fluctuation test: how reliable are the estimates of mutation rates? **Genetics**, 137: 1139-1146.
- STEWART, F.M., GORDON, D.M. and LEVIN, B.R., 1990. Fluctuation analysis: the probability distribution of the number of mutants under different conditions. **Genetics**: 124: 175-185.
- TIMBERLAKE, W.E. - 1990. Molecular genetics of *Aspergillus* development. **Annu.Rev.Genet.**, 24: 5-36.
- THALER, D.S. - 1994. The evolution of genetic intelligence . **Science**, 264: 224-225.
- WOLFE, K.H. , SHARP, P.M. and LI, W.H. - 1989. Mutation rates differ among regions of the mammalian genome. **Nature**, 337: 283-286.
- ZHIVOTOVSKY, L.A. and FELDMAN, M.W. - 1993. On the probability of loss of new mutations in the presence of linkage disequilibrium. **J. Math. Biol.**, 31: 177-188.

APÊNDICE

Tabela 22-

Densidade de organismos estimadas pelo método da diluição
(Adaptada de FISHER e YATES, 1971)

Dupla

x	número de níveis (s)							
	4	5	6	7	8	9	10	11 ou mais
0.4	.757	.773	.781	.785	.787	.788	.789	.789
0.6	.622	.640	.649	.653	.655	.656	.657	.657
0.8	.537	.556	.566	.571	.573	.574	.575	.575
1.0	.479	.500	.511	.516	.518	.520	.520	.521
1.2	.437	.461	.472	.478	.480	.482	.482	.483
1.4	.406	.432	.444	.450	.453	.455	.456	.456
1.6	.381	.411	.424	.431	.435	.436	.437	.438
1.8	.361	.394	.410	.417	.421	.423	.424	.425
2.0	.344	.382	.399	.408	.412	.414	.415	.416
2.5		.358	.382	.394	.399	.402	.403	.405
3.0			.370	.386	.394	.398	.400	.402
3.5				.379	.390	.396	.399	.401
4.0					.386	.394	.397	.401
4.5						.390	.396	.401
5.0							.394	.401
y								.401*
7.0								.399
6.0								.397
5.0							.394	.394
4.5						.390	.390	.390
4.0					.386	.386	.386	.386
3.5				.379	.379	.379	.379	.379
3.0			.370	.370	.370	.370	.370	.370
2.5		.358	.356	.356	.356	.356	.356	.356
2.0	.344	.334	.334	.334	.334	.334	.334	.334
1.8	.327	.323	.323	.323	.323	.323	.323	.323
1.6	.311	.309	.309	.309	.309	.309	.309	.309
1.4	.293	.292	.292	.292	.292	.292	.292	.292
1.2	.271	.271	.271	.271	.271	.271	.271	.271
1.0	.245	.245	.245	.245	.245	.245	.245	.245
0.8	.212	.212	.212	.212	.212	.212	.212	.212
0.6	.167	.167	.167	.167	.167	.167	.167	.167
0.4	.101	.101	.101	.101	.101	.101	.101	.101

Décupla (Três ou mais níveis)

x < 1		x > 1, y > 2			y < 2			
x	K	x	K	y	K	y	K	y
		.0	.763	.0	.761	2.0	.744	1.0
		.1	.768	.9	.766	1.9	.744	0.9
		.2	.768	.8	.764	1.8	.734	0.8
		.3	.760	.7	.755	1.7	.712	0.7
0.4	.761	.4	.747	.6	.741	1.6	.684	0.6
0.5	.740	.5	.736	.5	.729	1.5	.658	0.5
0.6	.733	.6	.733	.4	.724	1.4	.638	0.4
0.7	.736	.7	.736	.3	.726	1.3		
0.8	.744	.8	.744	.2	.732	1.2		
0.9	.753	.9	.753	.1	.739	1.1		
1.0	.763	.0	.763	.0	.744	1.0		

Quando $x > 1$ e $y > 2$, entre na tabela apenas com a parte decimal de x ou y .