

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/9231
IB/80884

MESTRADO

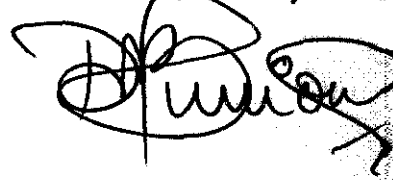
INSTITUTO DE BIOLOGIA

1988

da tese defendida para a Universidade
MÁRCIA MASIERO aprovada pela Comissão
MARCIA MASIERO Julgadora.

80884

Em 26/02/88



**TÍTULO - Parassexualidade e produção de amiloglicosidase em
Aspergillus niger.**

ORIENTADOR - Prof. Dr. RENATO BONATELLI Jr.

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

CAMPINAS - SP

1988

SYM

| | |
|----------|----------|
| Classif. | J |
| Autor | M 378 p |
| V. | Ex. |
| Tombo | BC/ 9231 |
| | 1B/ 785 |

1B/ 80884
BU/ 9231



AMP

À

Meus pais, Armando e Amaziles

dedico

AGRADECIMENTOS

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

A Deus por mais esta oportunidade de vida e de aprendizado entre pessoas de tão inestimável valor.

Aos bons espíritos que tanto se esforçam por me inspirar no bem.

Ao Prof. Renato Bonatelli Jr. pela excelente orientação, amizade e apoio que sempre demonstrou, desde os estágios de graduação e que eu espero poder seguir como exemplo de dedicação e profissionalismo.

Aos Professores Aline A. Pizzirani-Kleiner, Cláudio Luiz Messias e Ivanhoé Rodrigues Baracho pela atenção na leitura e valiosas sugestões dadas durante a análise prévia desta tese.

Ao Prof. Aquiles Piedrabuena pela alegria e prontidão com que me auxiliou nas análises estatísticas.

Ao Tó pelo incondicional apoio e paciência nas horas difíceis, pelo companheirismo e pela tremenda ajuda com os programas de computador e impressão da tese.

A minha irmã Rosilene por tudo e tanto que fez por mim, sem o que não seria possível o término desta tese.

Aos meus pais e irmãos que me apoiaram e possibilitaram os estudos.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação, Ana Melanogaster, Nelva Brunet, Dilaine Shields, Juverlandi, Breno, Dráusio, José Carlos, Cris, Cristina, Arrais, Marcos e Ricardo pela grande amizade e paciência de sempre.

A Gisela e Airton pelas sugestões, discussões e apoio valioso, além da amizade sincera.

A grande amiga Maria Regina por tudo.

Aos funcionários Edna, Welson, Sônia, Célia, Rita, Sílvia e Tereza pela grande colaboração e amizade.

A CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado, à FAPESP pela concessão da bolsa de Mestrado e auxílio-tese, e a Profa. Maria Luiza Silveira Mello, Coordenadora da Comissão de Pós-Graduação, pelo material oferecido para confecção desta tese.

I N D I C E

| | Pág. |
|--|------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 2 |
| 2.1. O fungo <i>Aspergillus niger</i> | 2 |
| 2.2. O ciclo parassexual em fungos | 2 |
| 2.3. A enzima Amiloglucosidase | 11 |
| 2.4. Aspectos genéticos e de melhoramento de microrganismos | 11 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 3.1. Linhagens de <i>Aspergillus niger</i> utilizadas | 16 |
| 3.2. Esterilização e incubação | 17 |
| 3.3. Soluções e meios de cultura | 17 |
| 3.3.1. Solução Tween | 17 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.3.2. | Solução salina | 17 |
| 3.3.3. | Solução de vitaminas | 17 |
| 3.3.4. | Hidrolizado de ácido nucleico de leveduras | 18 |
| 3.3.5. | Solução Benlate | 18 |
| 3.3.6. | Solução de amido 1% em tampão citrato 0.1M pH 4,0 | 18 |
| 3.3.7. | Soluções estoque | 18 |
| 3.3.8. | Meio mínimo (MM) (PONTECORVO e col., 1952b) | 19 |
| 3.3.9. | Meio Completo (MC) (PONTECORVO e col., 1952b) ... | 19 |
| 3.3.10. | Meio de fermentação (MAC) (BONATETELLI JR e col., 1984)..... | 20 |
| 3.3.11. | Meio mínimo líquido + 4% de meio completo | 20 |
| 3.4. | Mutagênicos | 20 |
| 3.4.1. | Etil Metano Sulfonato (EMS) | 21 |



| | | |
|----------|--|----|
| 3.4.2. | Luz Ultra-Violeta | 21 |
| 3.5. | Método de cultivo e manutenção das linhagens | 21 |
| 3.6. | Metodologia para medida da atividade enzimática | 21 |
| 3.6.1. | Produção da enzima | 21 |
| 3.6.2. | Medida da atividade enzimática | 22 |
| 3.7. | Obtenção de mutantes | 23 |
| 3.7.1. | Curva de sobrevivência | 23 |
| 3.7.1.1. | Mutagênico luz Ultra Violeta | 23 |
| 3.7.1.2. | Mutagênico EMS | 23 |
| 3.7.2. | Tratamento com luz Ultra-Violeta | 24 |
| 3.7.3. | Auxonografia de colônias após tratamento mutagênico | 24 |
| 3.7.4. | Enriquecimento por filtração | 24 |



| | | |
|----------|--|----|
| 3.7.5. | Tratamento com EMS | 25 |
| 3.7.6. | Mutante resistente ao Verde Malaquita | 25 |
| 3.7.6.1. | Curva de sobrevivência | 26 |
| 3.7.6.2. | Obtenção de mutante espontâneo e induzido | 26 |
| 3.7.6.3. | Caracterização do mutante | 26 |
| 3.7.6.4. | Interação alélica da marca de resistência | 26 |
| 3.7.7. | Mutante resistente ao Brometo de Etídio | 27 |
| 3.7.7.1. | Curva de sobrevivência | 27 |
| 3.7.7.2. | Obtenção de mutante espontâneo e induzido | 27 |
| 3.7.7.3. | Caracterização do mutante | 27 |
| 3.7.7.4. | Interação alélica da marca de resistência | 28 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.8. | Obtenção de diplóides | 28 |
| 3.8.1. | Isolamento | 28 |
| 3.8.2. | Caracterização | 29 |
| 3.8.3. | Manutenção dos diplóides | 29 |
| 3.9. | Obtenção de segregantes | 30 |
| 3.9.1. | Isolamento | 30 |
| 3.9.2. | Caracterização | 30 |
| 3.10. | Análises estatísticas | 30 |
| 4. | RESULTADOS | 31 |
| 4.1. | Curva de sobrevivência a luz Ultra Violeta | 31 |
| 4.2. | Curva de sobrevivência ao EMS | 31 |
| 4.3. | Enriquecimento por filtração | 33 |
| 4.4. | Mutantes obtidos com EMS | 35 |
| 4.5. | Curva de sobrevivência ao Verde Malaquita | 37 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.6. | Caracterização do mutante resistente ao Verde Malaquita | 37 |
| 4.7. | Interação alélica da marca da resis- tência ao Verde Malaquita | 39 |
| 4.8. | Curva de sobrevivência ao Brometo de Etídio | 42 |
| 4.9. | Caracterização do mutante resistente ao Brometo de Etídio | 42 |
| 4.10. | Interação alélica da marca de resis- tência ao Brometo de Etídio | 44 |
| 4.11. | Obtenção e caracterização de diplóides | 47 |
| 4.11.1. | Diplóide $\underline{mgr}_2//\underline{nic}_1\underline{olv}_3$ | 50 |
| 4.11.2. | Diplóide $\underline{ebr}_5//\underline{nic}_1\underline{olv}_3$ | 50 |
| 4.11.3. | Diplóide $\underline{lys}_1//\underline{nic}_1\underline{olv}_3$ | 53 |
| 4.11.4. | Diplóide $\underline{tlo}_1//\underline{nic}_1\underline{olv}_3$ | 53 |
| 4.11.5. | Diplóide $\underline{mys}_1//\underline{nic}_1\underline{olv}_3$ | 56 |

| | | |
|----------|---|----|
| 4.11.6. | Diplóide <u>met</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | 56 |
| 4.11.7. | Diplóide <u>arg</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | 59 |
| 4.11.8. | Diplóide <u>arg</u> ₁ // <u>lys</u> ₁ <u>nic</u> ₁ | 59 |
| 4.11.9. | Diplóide <u>arg</u> ₁ <u>lys</u> ₁ // <u>met</u> ₁ <u>nic</u> ₁ | 62 |
| 4.11.10. | Recombinação genética entre marcas nos cruzamentos estudados | 62 |
| 4.12. | Produção de amiloglicosidase | 65 |
| 4.12.1. | Teste número 1 e 2 | 65 |
| 4.12.2. | Teste número 3 e 4 | 68 |
| 4.12.3. | Teste número 5 e 6 | 70 |
| 4.12.4. | Teste número 7 | 73 |
| 4.12.5. | Produção de amiloglicosidase das linhagens analisadas | 74 |
| 5. | DISCUSSÃO | 77 |
| 5.1. | Obtenção de mutantes | 77 |



| | | |
|--------|--|-----|
| 5.1.1. | Auxotróficos | 77 |
| 5.1.2. | Resistentes | 78 |
| 5.2. | Testes de interação alélica e comple- mentação em diplóides | 78 |
| 5.3. | Análises Genéticas | 80 |
| 5.4. | Produção de amiloglicosidase | 81 |
| 6. | CONCLUSÕES | 84 |
| 7. | RESUMO | 86 |
| 8. | SUMMARY | 87 |
| 9. | BIBLIOGRAFIA | 88 |
| | APÊNDICE | 105 |

LISTA DE TABELAS

| TABELA | Pág. |
|---|------|
| 1 Porcentagem de sobrevivência da linhagem <u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁ ao agente mutagênico luz Ultra-Violeta | 32 |
| 2 Porcentagem de sobrevivência da linhagem <u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁ ao agente mutagênico EMS | 32 |
| 3 Condições e mutantes obtidos por filtração | 34 |
| 4 Condições e mutantes obtidos com EMS | 36 |
| 5 Número de colônias crescidas da linhagem <u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁ nas diferentes concentrações de Verde Malaquita | 38 |
| 6 Crescimento das linhagens em diferentes concentrações de Verde Malaquita | 38 |
| 7 Número e porcentagem de colônias crescidas nas diferentes concentrações de Verde Malaquita | 40 |
| 8 Número de colônias crescidas da linhagem <u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁ em diferentes concentrações de Brometo de Etídio | 43 |

| | | |
|----|--|----|
| 9 | Crescimento do mutante <u>ebr</u> ₅ comparado com a linhagem parental <u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁ nas diferentes concentrações de Verde Malaquita | 43 |
| 10 | Tamanho da colônia e porcentagem de crescimento nas diferentes concentrações de Brometo de Etídio | 45 |
| 11 | Caracterização dos diplóides | 48 |
| 12 | Símbolo dos diplóides | 49 |
| 13 | Marcas auxotróficas, morfológicas e de resistência ao Verde Malaquita dos segregantes do diplóide <u>mgr</u> ₂ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | 51 |
| 14 | Análise mitótica do diplóide <u>mgr</u> ₂ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | 51 |
| 15 | Marcas auxotróficas, morfológicas e de resistência ao Brometo de Etídio dos segregantes do diplóide <u>ebr</u> ₅ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | 52 |
| 16 | Análise mitótica do diplóide <u>ebr</u> ₅ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | 52 |
| 17 | Marcas auxotróficas e morfológicas dos segregantes do diplóide <u>lys</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | 54 |



| | | |
|----|---|----|
| 18 | Análise mitótica do diplóide $lys_1//nic_1olv_3$ | 54 |
| 19 | Marcas auxotróficas e morfológicas dos segregantes do diplóide $tio_1//nic_1olv_3$ | 55 |
| 20 | Análise mitótica do diplóide $tio_1//nic_1olv_3$ | 55 |
| 21 | Marcas auxotróficas e morfológicas dos segregantes do diplóide $mys_1//nic_1olv_3$ | 57 |
| 22 | Análise mitótica do diplóide $mys_1//nic_1olv_3$ | 57 |
| 23 | Marcas auxotróficas e morfológicas dos segregantes do diplóide $met_1//nic_1olv_3$ | 58 |
| 24 | Análise mitótica do diplóide $met_1//nic_1olv_3$ | 58 |
| 25 | Marcas auxotróficas e morfológicas dos segregantes do diplóide $arg_1//nic_1olv_3$ | 60 |
| 26 | Análise mitótica do diplóide $arg_1//nic_1olv_3$ | 60 |
| 27 | Marcas auxotróficas e morfológicas dos segregantes do diplóide $arg_1//lys_1nic_1$ | 61 |
| 28 | Análise mitótica do diplóide $arg_1//lys_1nic_1$ | 61 |

| | |
|----|--|
| 29 | Marcas auxotróficas e morfológicas dos segregantes do diplóide <u>arg</u> ₁ <u>lys</u> ₁ // <u>met</u> ₁ <u>nic</u> ₁63 |
| 30 | Análise mitótica do diplóide <u>arg</u> ₁ <u>lys</u> ₁ // <u>met</u> ₁ <u>nic</u> ₁63 |
| 31 | Resultados combinados de recombinação genética entre marcas nos cruzamentos estudados64 |
| 32 | Análise de variância dos dados dos experimentos 1 e 267 |
| 33 | Comparação das médias pelo teste de Tukey dos dados da Tabela 3267 |
| 34 | Análise de variância dos dados dos experimentos 3 e 469 |
| 35 | Comparação das médias pelo teste de Tukey dos dados da Tabela 3469 |
| 36 | Análise de variância dos dados dos experimentos 5 e 672 |
| 37 | Comparação das médias pelo teste de Tukey dos dados da Tabela 3672 |
| 38 | Análise de variância dos dados do experimento 775 |
| 39 | Comparação das médias pelo teste de Tukey dos dados da Tabela 3875 |



| | | |
|----|---|----|
| 40 | Produção média de amiloglicosidase (U/ml) dos mutantes, parentais e diplóides e a distribuição das repetições em classes de 1 unidade | 76 |
|----|---|----|



LISTA DE FIGURAS

| FIGURA | Pág. |
|---|------|
| I Porcentagem de crescimento do mutante resistente, do parental sensível e do diplóide nas diferentes concentrações de Verde Malaquita | 41 |
| II Porcentagem de crescimento do mutante resistente, do parental sensível e do diplóide nas diferentes concentrações de Verde Malaquita | 46 |



LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE

| TABELA | Pág. |
|--------|--|
| A1 | Produção de AG de mutantes, parentais e diplóides106 |
| A2 | Produção de AG de mutantes, parentais e diplóides106 |
| A3 | Produção de AG de mutantes, parentais e diplóides107 |
| A4 | Produção de AG de mutantes, parentais e diplóides107 |
| A5 | Produção de AG de mutantes, parentais e diplóides108 |
| A6 | Produção de AG de mutantes, parentais e diplóides109 |
| A7 | Produção de AG de mutantes, parentais e diplóides110 |



1. INTRODUÇÃO

A enzima amiloglicosidase (E.C.3.2.1.3.) tem sido intensamente estudada devido a sua capacidade de converter amido em glicose (DIXON e WEBB, 1962). Dentre os diversos microrganismos produtores dessa enzima, os fungos, principalmente os dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*, são destacados devido a alta produtividade (SINKAR e LEWIS, 1982).

O fungo *Aspergillus niger* produz amiloglicosidase, dentre outros metabólitos de interesse industrial. O estudo básico e de melhoramento dessa espécie foi objeto de trabalhos como os de LHOAS (1961, 1967), VAN TUYLL (1977), BALL e col. (1978), BONATELLI JR e col. (1982, 1983) e BOS (1985, 1987). Contudo, muitos aspectos genéticos de um modo geral, e também os relativos à produção de amiloglicosidase necessitam ainda maiores esclarecimentos.

Assim, o presente trabalho tem por objetivos:

- 1- obter mutantes auxotróficos e de resistência à drogas em uma linhagem industrial de *Aspergillus niger*;
- 2- utilizar esses mutantes em cruzamentos via ciclo parassexual, visando localizar o grupo de ligação a que pertencem os marcadores genéticos estudados;
- 3- analisar a produção de amiloglicosidase dos mutantes, parentais e diplóides obtidos, visando estudar alguns aspectos genéticos da produção.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O fungo *Aspergillus niger*.

O fungo *Aspergillus niger* é considerado por RAPER e FENNELL (1965) organismo do grupo niger, apresentando colônias pretas quando cultivado em meio Czapek sólido, com duas séries de esterigmas e conídios globosos de aspecto rugoso, sem equinulações verdadeiras, medindo em torno de 4 a 5 um de diâmetro quando maduros.

Essa espécie não tem ainda evidenciado ou não apresenta o ciclo sexual, sendo assim classificada na Sub Divisão Deuteromicotina.

2.2. O ciclo parassexual em fungos.

Um requisito essencial ao estudo genético de qualquer organismo é que ele apresente mutantes. Estes podem ser morfológicos, diferenciados da linhagem selvagem visualmente (cor de conídios, modo de crescimento, secreção de pigmento, etc); auxotróficos ou nutricionais, diferenciados por não serem capazes de crescer em meio quimicamente definido, composto de nutrientes essenciais para a linhagem selvagem ou prototrófica, a menos que um ou mais fatores de crescimento sejam adicionados (BEADLE e TATUM, 1941); ou resistentes, que se dife-



rencia da linhagem selvagem por crescerem em meio contendo concentração inibitória de uma determinada substância.

Os mutantes morfológicos e resistentes são geralmente mais facilmente obtidos e selecionados que os auxotróficos. PONTECORVO e col. (1953 b), trabalhando com *Aspergillus nidulans* apontaram a facilidade com que mutantes morfológicos foram selecionados, principalmente após exposição à mutagênico, sendo que WARR e ROPER (1965) fizeram comentários similares com relação à obtenção de mutantes resistentes nesse mesmo organismo.

Mutantes auxotróficos, por outro lado, são fundamentais a estudos genéticos, apesar do seu isolamento ser mais laborioso. Normalmente a seleção é feita através da avaliação individual em meio de constituição definida, de grande quantidade de sobreviventes a tratamento com mutagênico, sendo que aqueles que não crescem são recuperados em meio completo e testados novamente em meio mínimo suplementado com diferentes requerimentos nutricionais, para que seja identificada a substância, ou substâncias, as quais o mutante é deficiente. Este procedimento foi originalmente utilizado em *Neurospora crassa* por BEADLE e TATUM (1941) e é conhecido pela denominação de isolamento total. O processo de isolamento, no entanto pode ser facilitado por técnicas como "STARVATION" (FRIES, 1948 a,b) e enriquecimento por filtração (FRIES, 1947), as quais diminuem o número de prototróficos entre os sobreviventes ao tratamento com o mutagênico. PONTECORVO e col. (1953 b) obtiveram excelentes resultados com a técnica de "STARVATION" em *Aspergillus nidulans*. O enriquecimento por filtração foi também

utilizado com sucesso por CATCHESIDE (1954) em *Neurospora crassa*; por DAY e ANDERSON (1961) em *Coprinus lagopus*; por ANDERSON e DEPPE (1977) em *Schizophyllum commune*; por SILVEIRA e AZEVEDO (1984) em *Metarhizium anisopliae* e por FUNGARO (1984) e VIALTA (1987) em *Aspergillus awamori*.

Tão primordial para se fazer estudos genéticos quanto a presença de mutantes é a existência de um sistema de recombinação na espécie. Embora o processo de recombinação sexual seja frequente, não são todos os organismos que o apresentam. Os fungos classificados na Sub-Divisão Deuteromycotina não tem evidenciado ou não apresentam ciclo sexual, sendo o ciclo parassexual a única alternativa de recombinação e portanto de estudo genético nesses organismos.

Após sua descoberta em 1952 por PONTECORVO e ROPER, no fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*, o ciclo parassexual tem sido amplamente estudado em diferentes espécies de fungos por representar não só um importante instrumento de análise genética, como também de melhoramento de espécies de interesse industrial.

Foi demonstrado o ciclo parassexual em *Aspergillus niger* por PONTECORVO e col. (1953 a); em *Penicillium italicum* por STROMNAES e col. (1964); em *P.expansum* por BERAHA e GARBER (1966); em *A.flavus* por PAPA (1973); em *A.parasiticus* por PAPA (1978) e em *Metarhizium anisopliae* por MESSIAS e AZEVEDO (1980) e AL-AIDROOS (1980). Uma relação mais completa das espécies com ciclo parassexual descrito pode ser encontrada em CATEN (1981) e AZEVEDO (1987).

O ciclo parassexual difere em alguns pontos do processo sexual típico, e se caracteriza basicamente pela formação de diplóides relativamente estáveis, nos quais ocorrem permutas mitóticas e/ou haploidização, originando recombinantes mitóticos (PONTECORVO, 1956).

No processo de formação do diplóide, primeiramente ocorre anastomose de hifas resultando o heterocário, caracterizado pela presença de núcleos diferentes em um mesmo citoplasma. O heterocário pode se formar através de mutação, como mostraram ISHITANI e SAKAGUCHI (1956) e TINLINE (1961). Os primeiros demonstraram a presença de heterocário após tratamento de homocários com luz Ultra-Violeta em *Aspergillus sp.*, e o segundo recuperou clones auxotróficos a partir de hifas homocarióticas tratadas com luz Ultra-Violeta em *Cochiobolus sativus*. O fenômeno da heterocariose pode ser encontrado descrito nas revisões de CATEN e JINKS (1966) e TINLINE e MACNEILL (1969).

Devido a proximidade dos núcleos no heterocário, pode ocorrer a formação do diplóide heterozigoto por cariogamia. ROPER (1952) descreveu a obtenção de diplóides heterozigotos em fungos filamentosos através do cruzamento de linhagens com marcas auxotróficas e morfológicas. Os diplóides assim obtidos se assemelham à linhagem selvagem podendo, no entanto, ser separados por características como: conteúdo de DNA nuclear (HEAGY e ROPER, 1952); diâmetro de conídios 1,1 a 1,3 vezes maior (PONTECORVO e ROPER, 1952); segregação de marcas genéticas envolvidas no cruzamento (KAUFER, 1960) e sensibilidade ao fungicida Benlate (HASTIE, 1970; UPSHALL e col., 1977).

Com relação ao diâmetro de conídios ROSIM e col. (1978) concluíram que este não é critério confiável para a caracterização de diplóides em *Aspergillus niger*, apesar dos resultados de LHOAS (1967) SHCHERBAKOVA e col.(1978) e BONATELLI JR e col.(1983). Ainda em relação a diferença de tamanho de conídios entre diplóides e haplóides, esta não ocorre em *Aspergillus oryzae* e *A.sojae* (ISHITANI e col.,1956), em *Ustilago maydis* (HOLLIDAY, 1961), em *Cochliobolus sativus* (TINLINE, 1962) e em *Metarhizium anisopliae* (MESSIAS e AZEVEDO 1980).

A frequência de esporos diplóides a partir do micélio heterocariótico varia entre linhagens e entre espécies (TINLINE e MACNEILL, 1969) situando-se ao redor de 10^{-6} a 10^{-7} em *Aspergillus nidulans* (PONTECORVO e col., 1953b) e é mais alta em *Aspergillus niger* segundo LHOAS (1967) e PONTECORVO e col.(1953 a), sendo que os resultados de BOS (1985) mostram que essa frequência é semelhante a de *A.nidulans*.

A fase diplóide no ciclo parassexual é relativamente estável em comparação ao sexual constituindo, além de parte integrante daquele, excelente objeto de estudos como os de instabilidade genética (AZEVEDO, 1972, 1976), alelismo e não alelismo (AZEVEDO, 1972), regulação genica em eucariotos (SMITH e PATEMAN, 1977), etc.

Em 1978, BALL e HAMLYN, estudando *Acremonium chrysogenum* (*Cephalosporium acremonium*) sugeriram que a condição diplóide nessa espécie é transiente, como no ciclo sexual, pois recombinantes são ob-



tidos diretamente, sem observação do diplóide heterozigoto. HAMLYN e col. (1985) confirmaram que o estado diplóide nessa espécie não é estável, conseguindo entretanto, estabelecer oito grupos de ligação nessa espécie através do estudo de treze marcas genéticas usando fusão de protoplastos e obtendo recombinantes diretamente em meios seletivos apropriados. BONATELLI JR e col. (1983), estudando uma linhagem industrial de *Aspergillus niger*, observaram também alta frequência de recombinação mitótica, sugerindo o termo parametiose para designar o fenômeno de formação a partir do heterocáριο, além de diplóides heterozigotos, haplóides recombinantes e diplóides homozigotos para marcas genéticas estudadas. BAGALHI (1987) observou e estudou esse fenômeno em *Metarhizium anisopliae*.

WARR e ROPER (1965) estudaram, através do ciclo parassexual, linhagens de *Aspergillus nidulans* resistentes a diferentes inibidores. Verificaram que os genes responsáveis pela resistência ao Teoquil, Verde Malaquita e p-fluorfenilalanina eram recessivos, sendo que os de resistência ao Actidione era semi-dominante e ao Iodoacetato era dominante.

AZEVEDO e col. (1977) estudaram mutação espontânea em *Aspergillus nidulans* para resistência aos fungicidas Cloroneb e Vitavax através do ciclo parassexual, verificando que o gene que conferia resistência ao Cloroneb era semi-dominante, e ao Vitavax era dominante. Outro aspecto interessante observado foi que ambos os fungicidas alteraram a instabilidade do diplóide, o Cloroneb aumentando e o Vitavax reduzindo a recombinação mitótica.

O passo seguinte à formação do diplóide no processo parassexual é a produção de recombinantes através de eventos como permuta e não disjunção mitótica, que ocorrem isolados ou juntos, seguidos de haploidização (PONTECORVO e KÄFER, 1958).

PONTECORVO e ROPER (1952) se valeram do crossing-over mitótico, baseados nos trabalhos de STERN (1936) com *Drosophila melanogaster*, para explicar a ocorrência de segregantes homozigotos para algumas marcas, obtidos a partir de diplóides heterozigotos em *Aspergillus nidulans*. Estudos posteriores (ROPER e PRITCHARD, 1955; KÄFER, 1961) mostraram que esse evento representava uma troca recíproca de cromossomos homólogos no estágio de quatro fios, de maneira que os núcleos filhos ou tornavam-se homozigotos para os marcadores distais com relação ao ponto de permuta, ou continuavam heterozigotos como o diplóide original. O estudo destes diplóides oferece um meio de se determinar a ordem dos genes e a posição do centrômero em fungos da Sub-Divisão Deuteromycotina.

LHOAS (1967) estimou a ocorrência de 20% de crossing-over mitótico em *Aspergillus niger*, estimativa esta bem maior que a obtida por PONTECORVO (1958) para *A. nidulans*, sendo que BOS (1985) estimou 0,3%, trabalhando com uma linhagem de origem diferente da usada por Lhoas.

WHELAN e SOLL (1982) demonstraram a ocorrência de recombinação mitótica num intervalo de genes marcadores em *Candida*



albicans, sugerindo assim a possibilidade de análise genética nesse patógeno que não tem identificado o ciclo sexual. WHELAN e MARKIE (1985), estudando híbridos de *C.albicans* sugeriram que o ciclo parassexual nesse organismo estaria baseado em híbrido tetraplóide ($2n \times 2n \rightarrow 4n \rightarrow 2n$)

AMIRKHANIAN e COWAN (1985) mapearam três marcas morfológicas em *Coprinus cinereus* por recombinação mitótica induzida por luz Ultra-Violeta, sugerindo inclusive o uso de diplóides heterozigotos morfológicos em repulsão para testes rápidos de substâncias mutagênicas e carcinogênicas, devido a baixa ocorrência de segregantes mitóticos espontâneos nesse organismo.

Além da permuta mitótica, ocorre também a haploidização, que resulta de uma série de não disjunções (KÄFER, 1960, 1961), onde a partir de um diplóide pode-se obter toda uma gama de aneuplóides e haplóides cujos marcadores ligados segregam sempre juntos, a não ser em caso de crossing-over mitótico. Assim, a haploidização é uma maneira conveniente para se determinar grupos de ligação em fungos com ciclo parassexual.

LHOAS (1967); TUYLL (1977) e BOS (1987) sugeriram seis grupos de ligação em *Aspergillus niger*.

BERAHA e GARBER (1966) relataram a existência de pelo menos três diferentes loci de genes para resistência à fungicidas em diferentes grupos de ligação em *Penicillium expansum*. Em 1980, os mes-

mos autores, identificaram quatro grupos de ligação em *P.italicum* através de mutantes morfológicos, auxotróficos e de resistência ao Thiabendazol e ao o-fenilfenato de sódio, além de verificarem vários aspectos sobre a natureza das resistências.

BALL (1971) estudou o fungo *Penicillium chrysogenum* através do ciclo parassexual com o objetivo de construir mapas de ligação para estabelecer as bases de um programa de recombinação e melhoramento nessa espécie produtora de penicilina. Neste trabalho o autor identificou três grupos de ligação na espécie.

PAPA (1976) estabeleceu sete grupos de ligação em *Aspergillus flavus* e ainda conseguiu mapear muitos genes envolvidos na produção de aflatoxina, sugerindo papel regulatório para um deles (PAPA, 1980, 1982, 1984). Em *A.parasiticus* foram demonstrados seis grupos de ligação (BRADSHAW e col., 1983) sendo que dois dos genes que afetam a produção de aflatoxina foram mapeados no mesmo grupo.

COLEY e col. (1986) obtiveram treze mutantes resistentes ao cádmio em *Aspergillus nidulans*, sendo que cada um correspondeu a mutação em um único gene, mapeados em apenas dois locus diferentes, três no cromossomo IV e dez no cromossomo VI.

A obtenção de haplóides a partir de diplóides heterozigotos pode ser intensificada através de substâncias que induzem ou selecionam segregantes haplóides. A p-fluorfenilalanina (pFA), cujo efeito foi descoberto por MORPURGO (1961) e LHOAS (1961), foi usada em



trabalhos com diferentes espécies como *Aspergillus niger* (LHOAS, 1967; BOSS, 1987), *A.flavus* (PAPA, 1973, 1976, 1982, 1984) *A.parasiticus* (PAPA, 1978; BENNETT, 1979). O Benomyl foi usado por ANDERSON e col.(1985) para obter segregantes haplóides em *Armillaria mellea*. O fungicida Benlate foi usado com esse mesmo objetivo em *Aspergillus parasiticus* por BRADSHAW e col. (1983), em *Dictyostellium discoideum* por MORRISSEY e LOOMIS (1981) e em *Aspergillus niger* por BONATELLI JR e col. (1983), UMBUZEIRO VALENT (1985) e VIALTA (1987).

2.3. A enzima Amiloglicosidase

A enzima amiloglicosidase ou glucoamilase (E.C.3.2.1.3.) tem ação sobre as ligações α -1,4 e α -1,6 do amido a partir das extremidades não redutoras, liberando unidades de glicose (DIXON e WEBB, 1962).

Alguns autores estudaram essa enzima, obtida de *Aspergillus niger* (KERR e col., 1951; PAZUR e ANDO, 1959) confirmando sua ação sobre o amido, enquanto PAZUR e KLEPPE (1962) a purificaram, determinando ainda seu peso molecular aproximado.

Duas formas da enzima, a amiloglicosidase I e II, foram demonstradas em *Aspergillus niger* por FLEMING e STONE (1965), FINCH e LEONARD (1978), SVENSSON e col. (1982) e RAMANESH e col.(1982), que são imunologicamente iguais segundo MANJUNATH e RAO (1980).

2.4. Aspectos genéticos e de melhoramento de microrganismos

Pode-se conseguir melhorar a produção de metabólitos de interesse industrial através de modificações nas condições de cultivo do microrganismo utilizado. No entanto, aumentos realmente elevados de produtividade só são conseguidos com a introdução de modificações genéticas, através de mutação e/ou recombinação, nestes organismos.

Muitos trabalhos tem sido feitos neste sentido em relação a diversos metabólitos e em diferentes microrganismos. Em muitos casos a tentativa de aumento de produção é feita diretamente através de seleção de mutantes com alta produção. Com relação a enzima amiloglucosidase, por exemplo, PARK e DE SANTI (1977) e NEVALAINEN e PALVA (1979) conseguiram, após tratamento com mutagênico, selecionar mutante de *Aspergillus awamori* com respectivamente 1 e 2,5 vezes maior produção que a linhagem parental.

KVESITADZE e col. (1981) obtiveram mutante de *Aspergillus niger*, através do uso de luz Ultra-Violeta, com produção 10 vezes maior de amilase e amiloglucosidase ácido estáveis, que a linhagem parental

IVANOVA e IROKHINA (1983) isolaram linhagem com produção de amiloglucosidase 2,5 vezes maior que a linhagem parental, através do uso de nitrosoguanidina e seleção de mutantes desreprimidos para maltose.

Outro aspecto considerado importante para escolha de técnicas de melhoramento é o estudo dos genes envolvidos na produção do metabólito em questão. Com esse objetivo, mutantes de baixa ou nula produção, assim como aqueles de produção elevada são usados. Os estudos genéticos dessas mutações é feito através de recombinação com marcas genéticas conhecidas, para localização desses genes e identificação das relações entre eles.

Nesse sentido foram conduzidos trabalhos com *Penicillium chrysogenum* (SERMONTI, 1956; NORMANSELL e col., 1979) e com *Aspergillus nidulans* (MACDONALD, 1972; EDWARDS e col., 1974; HOLT e col., 1976; MAKINS e col., 1983) em relação a produção de penicilina.

YAMASHITA e FUKUI (1984 a, b) estudaram mutantes não produtores de amiloglicosidase em *Saccharomyces diastaticus* e UMBUZEIRO VALENT (1985) em *Aspergillus niger*.

Com relação a marcas, principalmente auxotróficas, introduzidas em linhagens de interesse industrial, verifica-se que estas podem alterar o nível de produção. MACDONALD e col. (1963) sugeriram efeito pleiotrópico de marcas auxotróficas que diminuíam a produção de penicilina em *Penicillium chrysogenum*. BENNETT (1979) também verificou que mutantes auxotróficos em geral, apresentavam produção de aflatoxina menor que linhagens prototróficas de *Aspergillus parasiticus*.

Esta característica também foi observada em trabalhos com outros metabólitos como o ácido cítrico (CHANG e TERRY, 1973; DAS e ROY, 1978; BONATELLI JR e col., 1982) e amiloglicosidase (CHANG e TERRY, 1973; UMBUZEIRO VALENT, 1985)

Por outro lado, FIEDUREK (1983) e ILCZUK (1970) relataram aumentos de produção de enzimas pectinolíticas e ácido cítrico respectivamente, em mutantes auxotróficos de *Aspergillus niger*. Ainda, ILCZUK e FIEDUREK (1986) selecionaram revertentes de mutantes auxotróficos desta mesma espécie com produção de amiloglicosidase 40% maior que o prototrófico maior produtor.

A respeito da produção de metabólitos por heterocários e diplóides, os resultados também variam. ILCZUK e FIEDUREK (1985) verificaram que heterocários obtidos entre mutantes auxotróficos de *Aspergillus niger* apresentaram produção de amilase superior a de seus componentes. Essa produção, contudo era sempre menor que a do prototrófico maior produtor. O mesmo ocorreu com diplóides em relação à ácido cítrico (CHANG e TERRY, 1973; BONATELLI JR e col., 1982) e à amiloglicosidase (CHANG e TERRY, 1973; UMBUZEIRO VALENT, 1985). No entanto, DAS e ROY (1978), JOHANNSEN e col. (1985) e GRIGOROV e col. (1986) obtiveram diplóides de *Aspergillus niger*, *Candida shehatae* e *Rhizopus pygmaeus* com produções aumentadas de, respectivamente ácido cítrico, D-xilose e amiloglicosidase em relação a linhagem selvagem maior produtora.



O aspecto mais interessante no entanto, em relação a melhoramento é a possibilidade de recombinação de características de interesse encontradas em diferentes linhagens ou mesmo espécies. BALL e col. (1978) por exemplo, obtiveram linhagem recombinante de *Aspergillus niger* com alta produção de amiloglicosidase e boas características de filtração através de recombinação pelo uso do ciclo parassexual. KUNDU e DAS (1985) também obtiveram linhagem de *A.niger* recombinante, via ciclo parassexual alta produtora de gluconato de cálcio com boas características de crescimento e esporulação. Assim, a utilização deste ciclo tanto para estudos básicos quanto de melhoramento, tem sido bastante positiva, se mostrando um instrumento primordial em trabalhos de genética de fungos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens de *Aspergillus niger* utilizadas

Foram utilizadas as linhagens abaixo relacionadas:

- linhagem pab_1fwn_1 , mutante deficiente para ácido p-aminobenzóico e conídios marrom claro, obtido da linhagem industrial 10v10 por tratamento com luz Ultra-Violeta (BONATELLI JR, 1981).

- linhagem $pab_1fwn_1lys_1$ (lys_1), mutante deficiente para ácido p-aminobenzóico e lisina, e conídios marrom claros, obtido da linhagem pab_1fwn_1 por tratamento com luz Ultra-Violeta. Este mutante foi obtido em trabalho anterior (Bolsa de Aperfeiçoamento CNPq : "Produção de amiloglicosidase por mutantes de *Aspergillus niger* em meio de glicérol") por seleção total numa frequência de $1,6.10^{-3}$.

- linhagem $pab_1fwn_1arg_1$ (arg_1), mutante deficiente para ácido p-aminobenzóico e arginina, e conídios marrom claro, obtido da linhagem pab_1fwn_1 , por tratamento com luz Ultra-Violeta. Mutante gentilmente cedido por Maria Regina Calil (Dados não publicados).

- linhagem nic_1oly_3 , mutante deficiente para ácido nicotínico e conídios verde oliva, obtido da linhagem industrial 10v10 por tratamento com luz Ultra-Violeta (BONATELLI JR, 1981).

3.2. Esterilização e Incubação

Esterilizou-se os meios de cultura e soluções utilizadas em autoclave à 1 atm (120°C) por 20 minutos ,a menos que seja especificado de maneira diversa. A incubação foi feita em estufa regulada para 28°C.

3.3. Soluções e Meios de Cultura

3.3.1. Solução Tween 80

Adicionou-se Tween 80 a água destilada na concentração de 0,1% (v/v). Colocou-se 2,5ml dessa solução em tubos de ensaio que após autoclavagem foram conservados à temperatura ambiente.

3.3.2. Solução Salina

Adicionou-se 8,5g de NaCl em 1000ml de água destilada. Colocou-se 9,4ml dessa solução em frascos de 30ml que após autoclavagem foram conservados à temperatura ambiente.

3.3.3. Solução de Vitaminas

| | |
|-----------------------|----------|
| Biotina | 0,2 mg |
| Ácido p-aminobenzóico | 10,0 mg |
| Tiamina | 10,0 mg |
| Piridoxina | 50,0 mg |
| Ácido nicotínico | 100,0 mg |
| Riboflavina | 100,0 mg |

Água destilada 100,0 ml

A mistura foi autoclavada e conservada sobre clorofórmio em refrigerador.

3.3.4. Hidrolisado de Ácidos Nucleicos de Leveduras

Colocou-se 2g de ácido nucleico em 15ml de solução 1N de NaOH e 2g de ácido nucleico em 15ml de solução 1N de HCl. As soluções foram aquecidas por 20 minutos à 100°C, misturadas a quente e o pH ajustado para 6,0. A mistura foi filtrada completando-se o volume com água destilada para 40 ml e guardada no refrigerador sobre clorofórmio.

3.3.5. Solução Benlate

Quatro miligramas de Benlate (fungicida: metil-1-(butil-carbamoil)-2-benzimidazol-carbamato) foram dissolvidos em 1ml de acetona e 99ml de água destilada esterilizada e guardada à temperatura ambiente.

3.3.6. Solução de Amido 1% em Tampão Citrato 0,1M pH 4,0

Dissolveu-se a quente 1g de amido solúvel em aproximadamente 40ml de água destilada. Misturou-se 33ml de solução de 0,1M de ácido cítrico com 17ml de solução 0,1M de citrato de sódio, adicionando-se o amido dissolvido e completou-se o volume para 100ml com água destilada.

3.3.7. Soluções Estoque

As soluções estoque dos requerimentos nutricionais dos mutantes auxotróficos foram feitas nas concentrações abaixo descritas e após esterilização (item 3.2.) foram guardadas em refrigerador.

As soluções estoque das drogas para mutantes resistentes foram feitas acrescentando em água destilada esterilizada, quantidades adequadas para obter-se as concentrações descritas abaixo, sendo conservadas em refrigerador em frasco envolto em papel alumínio.

As soluções de aminoácidos, tiosulfato de sódio e guanina foram de 10mg/ml, as de ácido nicotínico e ácido p-aminobenzoico de 1,25mg/ml, e as de Verde Malaquita e Brometo de Etídio de 0,1mg/ml.

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

| | |
|---|---------|
| Nitrato de Sódio | 6,00 g |
| Cloreto de Potássio | 0,52 g |
| Sulfato de Magnésio $7H_2O$ | 0,52 g |
| Fosfato Dihidrogenado de Potássio | 1,52 g |
| Sulfato de Ferro (solução 1% p/v) | 0,10 ml |
| Sulfato de Zinco (solução 1% p/v) | 0,10 ml |
| Glicose | 10,00 g |
| Água Destilada | 1000 ml |
| O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH (4%) ou HCl (1N). | |
| Quando sólido, adicionou-se 15g de ágar por litro. | |

Os requerimentos nutricionais das linhagens foram adicionados ao meio quando necessário nas concentrações de 100 μ g/ml para bases nitrogenadas, tiosulfato de sódio e aminoácidos e 6,25 μ g/ml para vitaminas.

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

Adicionou-se a 1000ml de MM

| | |
|------------------------------------|--------|
| Peptona | 2,0 g |
| Caseína Hidrolisada | 1,5 g |
| Extrato de Leveduras | 0,5 g |
| Solução de Vitaminas (item 3.3.3.) | 1,0 g |
| Ácido Nucleico de Leveduras | 2,5 ml |

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH ou HCl. Quando sólido, adicionou-se 15g de ágar por litro.

3.3.10. Meio de Fermentação (MAC) (BONATELLI JR e col., 1984)

| | |
|--|---------|
| Farinha de raspa de mandioca | 20,0 g |
| Nitrato de Sódio | 2,0 g |
| Fosfato Dihidrogenado de Potássio | 1,0 g |
| Sulfato de Magnésio 7 H ₂ O | 0,5 g |
| Água Destilada | 1000 ml |

O pH foi ajustado para 5,5 e a esterilização foi feita à 1 atm por 15 minutos. Quando necessários foram adicionados requerimentos nutricionais das linhagens em estudo como especificado para o MM.

3.3.11. Meio Mínimo líquido mais 4% de Meio Completo

Adicionou-se 4ml de MC líquido a 96ml de MM líquido. Colocou-se 2,5ml dessa solução em tubos de ensaio que após autoclavagem foram conservados em refrigerador.

3.4. Mutagênicos

3.4.1. Etil Metano Sulfonato (EMS)

Solução 8% de EMS em água destilada esterilizada (v/v) (Sigma).

3.4.2. Luz Ultra-Violeta

Lâmpada Mineralight - Multi Band - UV- SL.25 da Ultra Violet Products INC, San Gabriel, California.

Ondas curtas (254nm), $300 \mu\text{w}/\text{cm}^2/\text{s}$ de intensidade e altura de 6,4cm da lâmpada em relação a superfície tratada.

3.5. Método de Cultivo e Manutenção das Linhagens

As culturas foram inoculadas em placas de Petri contendo MC e incubadas por 6 dias para crescimento vegetativo.

A manutenção das linhagens foi feita em tubos de ensaio contendo MC ou MM inclinado, guardadas em refrigerador.

3.6. Metodologia para Medida da Atividade Enzimática

3.6.1. Produção da enzima

Inoculou-se 1ml de uma suspensão de 10^6 conídios/ml em Erlenmeyers de 125ml com 25ml de meio de fermentação MAC. Os frascos foram então incubados por 4 dias, sem agitação.



Mutantes auxotróficos e resistentes à drogas, assim como as linhagens parentais e os diplóides obtidos foram testados para produção da enzima amiloglicosidase, segundo esta metodologia, com 5 repetições por teste. Os mutantes foram ensaiados juntamente com seus respectivos diplóides e parentais, para efeito de comparação e análise estatística.

3.6.2. Medida da Atividade Enzimática

Após 4 dias de fermentação, as amostras foram filtradas e 0,5ml de cada uma, após diluição conveniente, foi incubado com 0,5ml de solução tampão citrato 1% de amido por 60 minutos em banho-maria à 60°C (condições adaptadas dos trabalhos de PARK e PAPINI, 1970; BANKS e col., 1976)

Após incubação, as amostras foram transferidas ao banho-maria de água fervente por 3 minutos para inativação da enzima.

Procedeu-se então a medida da quantidade de açúcares redutores liberada, após a hidrólise do amido pela amiloglicosidase presente no filtrado.

Os açúcares redutores foram medidos pelo método da ortotoluidina, utilizando-se kits para determinação da glicose (Labtest, Doles ou Biobrás). O espectrofotômetro (Coleman - modelo 295) foi ajustado para o comprimento de onda 630nm ou 625nm, conforme especificações do kit utilizado.

A quantidade de açúcares redutores presente no filtrado após fermentação foi também estimada e denominada Glicose Residual. Considerou-se a quantidade de açúcares redutores medida após

hidrólise do amido menos a "Glicose Residual" correspondente, para o cálculo da produção da enzima amiloglicosidase.

A quantidade de açúcares redutores foi expressa em mg/100ml e cada 1000mg/100ml corresponde a uma unidade (U) de amiloglicosidase (AG).

3.7. Obtenção de Mutantes

3.7.1. Curva de Sobrevivência

3.7.1.1. Mutagênico Luz Ultra Violeta

Uma suspensão de conídios da linhagem pab₁fwn₁ ajustada para 10^3 conídios/ml foi irradiada com luz Ultra-Violeta por tempos de 0 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 12,5 ; 15 e 17,5 minutos. Após cada tempo de irradiação foram retiradas alíquotas de 0,1ml para semear placas de Petri com MC. Após 4 dias de incubação as colônias foram contadas e calculada a porcentagem de sobrevivência para cada tempo, tomando-se o tempo zero como 100%.

3.7.1.2. Mutagênico EMS

Foi usada uma suspensão de conídios da linhagem pab₁fwn₁ ajustada para $2 \cdot 10^7$ conídios/ml. Alíquotas de 0,5ml desta suspensão foram adicionadas à 0,5ml de solução de EMS em água destilada esterilizada resultando as concentrações finais de 0 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 e 5% do mutagênico (v/v). Após 2 horas de incubação, estas suspensões foram diluídas convenientemente para que se pudesse inocular um

número contável de colônias em placas de Petri com MC. Após 4 dias de incubação as colônias foram contadas e calculada a porcentagem de sobrevivência para cada concentração do mutagênico, tomando-se a concentração zero como 100%.

3.7.2. Tratamento com Luz Ultra-Violeta

Para cada tratamento, uma suspensão de conídios da linhagem pab₁fwn₁, ajustada com solução salina, foi exposta à luz Ultra-Violeta (condições descritas no item 3.4.2.) por 7,5 minutos (determinados de acordo com o item 3.7.1.1.). Após esse tempo a suspensão foi, quando necessário, diluída novamente, e uma alíquota de 0,1ml foi semeada em placas de Petri com MC (a menos que seja especificado de maneira diversa).

3.7.3. Auxonografia de Colônias após Tratamento Mutagênico

As colônias foram testadas em MM + requerimentos nutricionais, como descrito por PONTECORVO e col. (1953 b).

3.7.4. Enriquecimento por Filtração

Quatro mililitros de uma suspensão de conídios da linhagem pab₁fwn₁ com 10^5 conídios/ml foi tratado com luz Ultra-Violeta (item 3.7.2.) e inoculado em Erlenmeyers de 250ml com 50ml de MM + ácido p-aminobenzóico. Este foi então incubado à temperatura ambiente, sob agitação por 24 a 72 horas, dependendo do crescimento

apresentado. Após esse tempo o conteúdo desse frasco foi filtrado e o filtrado centrifugado por 10 minutos na posição 5 (centrifuga Excelsa Baby da Fanen). O sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspenso em solução salina. Foi feita então a contagem de conídios em hematímetro e após diluições convenientes semeou-se 0,1ml dessa suspensão em placas de Petri com MC (SILVEIRA e AZEVEDO, 1984). Com 3 a 4 dias de crescimento, as colônias foram inoculadas em placas de Petri com MM + ácido p-aminobenzóico por ponto, e aquelas que não apresentaram crescimento após 2 dias de incubação foram testadas para auxotrofia (item 3.7.3.).

3.7.5. Tratamento com EMS

Suspensões que variaram de 10^4 a 10^5 conídios da linhagem pab₁fwn₁ foram tratadas com uma solução 8% de EMS (determinado de acordo com o item 3.7.1.2.) na proporção de 1:1 (0,5ml da suspensão de conídios e 0,5ml de solução de EMS - concentração final de 4% do mutagênico). Após incubação por 2 horas, a suspensão foi convenientemente diluída e 0,1ml foi então semeado em placas de Petri com MC. Após 4 dias de incubação, as colônias crescidas foram inoculadas em placas de Petri com MM + ácido p-aminobenzóico e aquelas que não apresentaram crescimento após 2 dias de incubação foram testadas para auxotrofia (item 3.7.3.).

3.7.6. Mutante Resistente ao Verde Malaquita

3.7.6.1. Curva de Sobrevivência

Foi feita uma suspensão de conídios da linhagem pab_1fwn_1 ajustada para 10^3 conídios/ml. Semeou-se 0,1ml dessa suspensão em placas de Petri com MC e MC + Verde Malaquita nas concentrações de 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 0,8 e 1 μ g/ml. Após 4 a 6 dias de incubação contou-se o número de colônias.

3.7.6.2. Obtenção de Mutante Espontâneo e Induzido

Placas de Petri com MC + Verde Malaquita, na concentração de 0,5 μ g/ml foram semeadas com 0,1ml de uma suspensão de 10^5 conídios/ml e 0,3ml de uma suspensão de 3.10^4 conídios/ml da linhagem pab_1fwn_1 , previamente exposta a tratamento com luz Ultra-Violeta (item 3.7.2.) (3.10^4 conídios/ml = número de conídios sobreviventes). Após 6 a 8 dias de incubação as colônias presentes foram inoculadas em placas de Petri com MC + droga, por estriamento, e seu crescimento comparado ao da linhagem parental sensível.

3.7.6.3. Caracterização do Mutante

O mutante mgr_2 e a linhagem pab_1fwn_1 foram inoculados por ponto em placas de Petri com MC + Verde Malaquita, nas concentrações de 10 ; 15 ; 20 ; 25 ; 30 ; 35 ; 40 ; 45 e 50 μ g/ml. Após 6 dias de incubação foi verificado o crescimento das colônias.

3.7.6.4. Interação Alélica da Marca de Resistência

Foram feitas suspensões de conídios das linhagens pab_1fwn_1 , mgr_2 e $mgr_2//nic_1olv_3$, ajustadas para 10^3 conídios/ml, e alíquotas de 0,1ml foram semeadas em placas de Petri com MC e MC



+ Verde Malaquita, nas concentrações de 1 ; 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$. Após 7 dias de incubação as colônias presentes foram contadas e calculada a porcentagem de crescimento nas placas com a droga, tomando-se aquelas sem a droga como 100%.

3.7.7. Mutante Resistente ao Brometo de Etídio

3.7.7.1. Curva de Sobrevivência

Foi feita uma suspensão de conídios da linhagem pab₁fwn₁, ajustada para 10^3 conídios/ml e 0,1ml foi semeado em placas de Petri com MC e MC + Brometo de Etídio nas concentrações de 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 e 40 $\mu\text{g/ml}$. Após 6 dias de incubação contou-se o número de colônias.

3.7.7.2. Obtenção de Mutantes Espontâneo e Induzido

Placas de Petri com MC + Brometo de Etídio na concentração de 15 $\mu\text{g/ml}$, foram semeadas com 0,1ml de uma suspensão de 10^4 conídios/ml e 0,3ml de uma suspensão de 4.10^4 conídios/ml da linhagem pab₁fwn₁, previamente exposta ao tratamento com luz Ultra Violeta (item 3.7.2.) (4.10^4 conídios/ml = número de conídios sobreviventes). Após 6 dias de incubação as colônias presentes foram inoculadas em placas de Petri com MC + droga, por estriamento, e seu crescimento comparado ao da linhagem parental sensível.

3.7.7.3. Caracterização do Mutante



O mutante ebr₅ e a linhagem parental pab₁fwn₁ foram inoculados por estria, em placas de Petri com MC e MC + Brometo de Etídio, nas concentrações de 5 ; 10 ; 30 ; 50 ; 65 ; 80 ; 95 ; 100 ; 120 e 140 µg/ml. Após 7 dias de incubação, verificou-se o crescimento das colônias.

3.7.7.4. Interação Alélica da marca de Resistência

O mutante ebr₅, a linhagem pab₁fwn₁ e o diplóide ebr₅//nic₁olv₃ foram inoculados, por ponto, em placas de Petri com MC e MC + Brometo de Etídio, nas concentrações 40 ; 100 e 140 µg/ml. Após 2 dias de incubação, as colônias presentes foram medidas.

3.8. Obtenção de Diplóides

3.8.1. Isolamento

Os diplóides foram obtidos através do método de ROPER (1952) modificado. Misturou-se conídios de cada uma das linhagens selecionadas para o cruzamento, com marcas auxotróficas e/ou coloração de conídios diferentes, em tubo de ensaio com MM + 4% de MC líquido. Após 5 a 7 dias de crescimento, a película desenvolvida foi cortada em 4 partes e transferida para placas de Petri com MM. Do heterocário formado foram transferidos conídios para solução Tween 80, diluídos em solução salina e semeados em placas de Petri com MM para isolamento de possíveis diplóides. Após 5 dias de crescimento as colônias isoladas foram purificadas através de estrias em placas de Petri com MM e posteriormente caracterizadas quanto a ploidia.

3.8.2. Caracterização

Os critérios para caracterização dos diplóides foram os seguintes:

- prototrofia: cruzando-se linhagens com diferentes marcas genéticas, os diplóides devem ser prototróficos devido à complementação, apresentando crescimento em MM.

- coloração de Conídios: cruzando-se linhagens de coloração de conídios diferentes, os diplóides devem apresentar conídios de coloração selvagem (preta), devido à complementação.

- diâmetro de Conídios: o diâmetro de conídios do diplóide deve ser maior que dos haplóides (BONATELLI JR e col., 1983). O diâmetro de conídios foi medido com objetiva micrométrica, e a montagem da lâmina com lísol foi feita após 6 dias de crescimento das linhagens em placas de Petri com MM ou, quando necessário, MM + requerimentos nutricionais. Foram medidos 30 conídios por linhagem.

- teste com Benlate (item 3.3.5.): os diplóides devem produzir setores haplóides e aneuplóides na presença desse agente haploidizante (HASTIE, 1970, UPSHALL e col., 1977). Os possíveis diplóides foram inoculados por ponto em placas de Petri com MC + Benlate (1 a 1,5 µg/ml). Após 7 a 10 dias de crescimento verificou-se a formação ou não de setores segregantes.

3.8.3. Manutenção dos Diplóides

Os diplóides foram inoculados em tubos de ensaio com MM inclinado, e após 7 dias de crescimento foram estocados no refrigerador.

3.9. Obtenção de Segregantes

3.9.1. Isolamento

Inoculou-se o diplóide por ponto em placas de Petri com MC ou MM + requerimentos nutricionais, mais Benlate na concentração de 1 a 1,5 $\mu\text{g/ml}$. Após 5 a 7 dias de crescimento quando em MC e 8 a 10 dias quando em MM, os setores formados nas colônias foram purificados por estrias em placas de Petri com MC e estocados em tubos de ensaio com MC inclinado.

3.9.2. Caracterização

Os segregantes foram caracterizados quanto a coloração e auxotrofia. Para se determinar as marcas auxotróficas dos segregantes utilizou-se uma bateria de placas de Petri com MC, MM, MM+ todos os requerimentos nutricionais envolvidos e MM menos cada um dos requerimentos separadamente, onde os segregantes foram inoculados por ponto. Após 2 dias de crescimento para os segregantes marrons, e 3 dias para os verdes, verificou-se o crescimento ou não da colônia.

3.10. Análises Estatísticas

Os dados de produção foram analisados pelos testes F e Tukey (PIMENTEL GOMES, 1966).

4. RESULTADOS

4.1. Curva de Sobrevivência à Luz Ultra Violeta

Os resultados de sobrevivência, determinados de acordo com o item 3.7.1.1., estão na TABELA 1.

O tempo de 7,5 minutos conferiu uma sobrevivência entre 3-4%, adequada para obtenção de mutantes.

A viabilidade calculada para a linhagem pab₁fwn₁ foi de 25%.

4.2. Curva de Sobrevivência ao EMS

Os resultados de sobrevivência, determinados de acordo com o item 3.7.1.2., estão na TABELA 2.

A concentração de 4% de EMS conferiu uma sobrevivência entre 2-3%, adequada para obtenção de mutantes.

A viabilidade calculada para a linhagem pab₁fwn₁ foi de 30%.

TABELA 1 Porcentagem de Sobrevivência da
linhagem pab₁fw₁ ao agente muta-
gênico luz Ultra-Violeta.

| tempo (min) | \bar{x} de colônias sobreviventes | % de sobrevi- vência |
|----------------|--|-------------------------|
| 0,0 | 82,6 | 100,0 |
| 2,5 | 40,0 | 48,4 |
| 5,0 | 13,0 | 15,7 |
| 7,5 | 3,0 | 3,6 |
| 10,0 | 1,6 | 1,9 |
| 12,5 | 0,0 | 0,0 |
| 17,5 | 0,0 | 0,0 |

TABELA 2 Porcentagem de Sobrevivência da
linhagem pab₁fw₁ ao agente muta-
gênico EMS.

| Concen- tração (%) | \bar{x} de colônias sobreviventes | % de sobrevi- vência |
|--------------------------|--|-------------------------|
| 0 | 30,00 | 100,00 |
| 1 | 18,00 | 60,00 |
| 2 | 16,00 | 53,30 |
| 3 | 2,00 | 6,60 |
| 4 | 0,70 | 2,30 |
| 5 | 0,01 | 0,04 |



4.3. Enriquecimento por Filtração

Foram feitas 19 filtrações segundo item 3.7.4.. A TABELA 3 mostra o número de colônias testadas, o tempo de incubação e os mutantes obtidos em cada filtração.

Obteve-se mutantes em tempos de incubação de 24 , 48 e 72 horas. A frequência de mutantes foi de $7,5.10^{-4}$, sendo que a partir da filtração de número 13 nenhum mutante foi obtido. Este fato pode ser explicado devido a lâmpada de luz Ultra-Violeta usada ter, provavelmente, perdido a potência ao longo do tempo. Isso poderia ser confirmado com dados de sobrevivência em cada experimento, mas estes não foram calculados por ausência de controle sem irradiação. De qualquer forma outros trabalhos no laboratório, com essa mesma lâmpada apresentaram os mesmos problemas. Se a frequência de mutantes for calculada com apenas as 12 primeiras filtrações a taxa aumenta para $1,6.10^{-3}$ ficando semelhante ao obtido em trabalhos anteriores (BONATELLI JR e col., 1982).

Os mutantes obtidos foram:

- pab₁fwn₁mys₁ (mys₁) : conídios marrons e deficiências para ácido p-aminobenzóico e metionina ou cisteína ou cistina.
- pab₁fwn₁tio₁ (tio₁) : conídios marrons e deficiências para ácido p-aminobenzóico e tiosulfato.
- pab₁fwn₁met₁ (met₁) : conídios marrons e deficiências para ácido p-aminobenzóico e metionina.
- pab₁fwn₁nic₁ (nic₁) : conídios marrons e deficiências para ácido p-aminobenzóico e ácido nicotínico.

TABELA 3 Condições e mutantes obtidos por filtração

| Filtração | Número de colônias | Mutantes | Tempo de incubação (horas) |
|-----------|--------------------|-------------------------|----------------------------|
| 01 | 250 | <u>lys</u> ₁ | 24 |
| 02 | 105 | - | 24 |
| 03 | 81 | - | 24 |
| 04 | 242 | - | 24 |
| 05 | 225 | - | 48 |
| 06 | 225 | - | 48 |
| 07 | 125 | - | 48 |
| 08 | 364 | <u>trp</u> ₁ | 48 |
| 09 | 211 | - | 48 |
| 10 | 303 | - | 48 |
| 11 | 250 | <u>met</u> ₁ | 48 |
| 12 | 109 | <u>nic</u> ₃ | 72 |
| 13 | 300 | - | 48 |
| 14 | 10 | - | 48 |
| 15 | 500 | - | 72 |
| 16 | 500 | - | 48 |
| 17 | 600 | - | 48 |
| 18 | 575 | - | 48 |
| 19 | 375 | - | 48 |
| total | 5350 | 4 | |



4.4. Mutantes Obtidos com EMS

Foram realizados 13 tratamentos com EMS como descrito no item 3.7.5.. A TABELA 4 mostra o número de colônias testadas, a porcentagem de sobrevivência e os mutantes obtidos para cada tratamento.

O único mutante obtido ocorreu em baixa porcentagem de sobrevivência. A frequência de mutantes foi de $2,2 \cdot 10^{-4}$. Essa baixa frequência pode ser devido a alta porcentagem de sobrevivência (acima de 15%) na maioria dos ensaios (números 5 ; 7 ; 8 ; 10 ; 11 ; 12 e 13), sendo que isso deve ter ocorrido em consequência ao EMS ser altamente volátil e a solução estoque com água estéril ser renovada apenas de tempos em tempos. Assim, pode ter ocorrido variação da concentração final de EMS nos ensaios para obtenção de mutantes.

A frequência de mutantes aumenta para $8 \cdot 10^{-4}$ se for calculada a partir dos ensaios com porcentagem de sobrevivência abaixo de 7% (números 3 ; 4 ; 6 e 9)..

O mutante abaixo descrito foi obtido no ensaio número 3, com 1,1% de sobrevivência:

pab₁ fwn₁ pur₁ (pur₁) : mutante deficiente para ácido p-aminobenzóico e purinas (guanina ou adenina) e colônias marrons.

TABELA 4 Condições e mutantes obtidos com EMS.

| Ensaio | % de sobre- vivência | número de colônias | Mutantes |
|--------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 01 | — * | 29 | — |
| 02 | — * | 5 | — |
| 03 | 1,1 | 425 | <u>pur</u> ₁ |
| 04 | 2,4 | 150 | — |
| 05 | 15,2 | 50 | — |
| 06 | 6,8 | 500 | — |
| 07 | 20,6 | 125 | — |
| 08 | 29,1 | 550 | — |
| 09 | 1,1 | 150 | — |
| 10 | 19,3 | 625 | — |
| 11 | 19,7 | 375 | — |
| 12 | 23,9 | 675 | — |
| 13 | 19,4 | 800 | — |
| total | | 4459 | 1 |

* Dados não obtidos.



4.5. Curva de Sobrevivência ao Verde Malaquita

De acordo com o item 3.7.6.1., foi feita a curva de sobrevivência da linhagem pab₁fwn₁ ao Verde Malaquita e os resultados estão na TABELA 5. Devido a esses resultados foi escolhida a concentração de 0,5 µg/ml de Verde Malaquita para selecionar mutantes resistentes.

4.6. Caracterização do Mutante Resistente ao Verde Malaquita

Obteve-se uma frequência de $1,1 \cdot 10^{-2}$ mutantes induzidos resistentes ao Verde Malaquita e nenhum mutante espontâneo, através da metodologia descrita no item 3.7.6.2.

Foi escolhido um dos mutantes resistentes obtidos, o pab₁fwn₁mgr₂ (mgr₂) (mutante deficiente para ácido p-aminobenzóico, colônias marrons e resistência ao Verde Malaquita), para dar prosseguimento ao trabalho. Este foi caracterizado segundo o item 3.7.6.3., e os resultados estão na TABELA 6. Observa-se que a linhagem parental não é capaz de crescer em concentrações de 10 µg/ml da droga. O mutante apresenta crescimento até a concentração de 30 µg/ml; em concentrações de 35 a 45 µg/ml apresenta colônias menores, e é incapaz de crescer na concentração de 50 µg/ml.

TABELA 5 Número de colônias crescidas da linhagem pab₁ fun₁ nas diferentes concentrações de Verde Malaquita.

| Concentração ($\mu\text{g/ml}$) | \bar{X} do número de colônias |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| 0,0 | 91,5 |
| 0,1 | 133,5 |
| 0,2 | 114,5 |
| 0,5 | 0,0 |
| 0,8 | 0,0 |
| 1,0 | 0,0 |

TABELA 6 Crescimento das linhagens em diferentes concentrações de Verde Malaquita.

| Concentração ($\mu\text{g/ml}$) | <u>pab</u> ₁ <u>fun</u> ₁ | <u>ngr</u> ₂ |
|--------------------------------------|---|-------------------------|
| 10 | - | + |
| 15 | - | + |
| 20 | - | + |
| 25 | - | + |
| 30 | - | + |
| 35 | - | + - |
| 40 | - | + - |
| 45 | - | + - |
| 50 | - | - |

+ crescimento
 - ausência de crescimento
 + - crescimento reduzido

4.7. Interação Alélica da Marca de Resistência ao Verde Malaquita

Para se verificar a interação alélica da marca de resistência, procedeu-se segundo o ítem 3.7.6.4. Os resultados estão na TABELA 7 e na FIGURA 1.

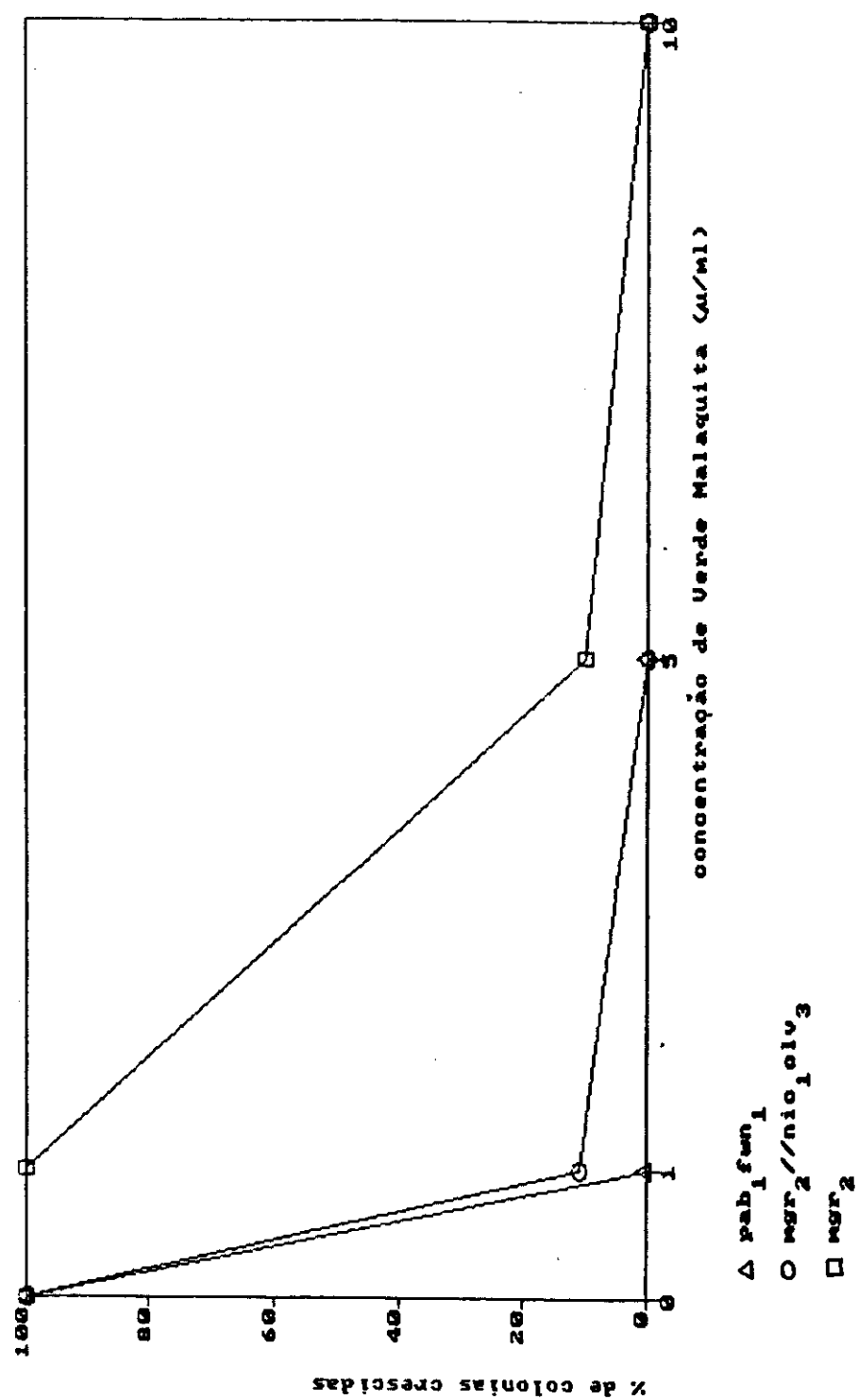
Devido a haploidização do diplóide, mesmo em concentrações baixas da droga, optou-se por uma comparação a nível de número de conídios resistentes e não por tamanho de colônia.

Observa-se que o mutante resistente mgr_2 apresenta 100% de crescimento apenas na concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$, caindo para 10% em 5 $\mu\text{g/ml}$. O parental pab_1fwn_1 não apresenta crescimento em nenhuma das concentrações testadas e o diplóide parece ter características semelhantes ao parental (FIGURA 1).

TABELA 7 Número e porcentagem de colônias crescidas nas diferentes concentrações de Verde Malaquita.

| concentração ($\mu\text{g/ml}$) | <u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁ | | <u>mgr</u> ₂ | | <u>mgr</u> ₂ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | |
|--------------------------------------|---|-----|-------------------------|-----|--|-----|
| | número de colônias | % | número de colônias | % | número de colônias | % |
| 0 | 124 | 100 | 111 | 100 | 109 | 100 |
| 1 | 0 | 0 | 112 | 100 | 12 | 11 |
| 5 | 0 | 0 | 11 | 10 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

FIGURA I Porcentagem de crescimento do mutante resistente do parental sensível e do diplóide nas diferentes concentrações de Verde Malaquita.





4.8. Curva de Sobrevivência ao Brometo de Etídio

De acordo com o ítem 3.7.7.1., foi feita a curva de sobrevivência da linhagem pab₁fwn₁ ao Brometo de Etídio e os resultados estão na TABELA 8. Foi escolhida a concentração de 15 µg/ml da droga para selecionar mutantes resistentes.

4.9. Caracterização do Mutante Resistente ao Brometo de Etídio

Obteve-se uma frequência de $1,4 \cdot 10^{-4}$ mutantes induzidos resistentes ao Brometo de Etídio e nenhum mutante espontâneo, através da metodologia descrita no ítem 3.7.7.2.

Foi escolhido um dos mutantes resistentes obtidos, o pab₁fwn₁ ebr₅ (ebr₅) (mutante deficiente para ácido p-aminobenzóico, confídios marrons e resistência ao Brometo de Etídio) para dar prosseguimento ao trabalho. Este foi caracterizado segundo o ítem 3.7.7.3., e os resultados estão na TABELA 9.

Observa-se que a linhagem parental pab₁fwn₁ não é capaz de crescer em concentrações de 10 µg/ml da droga. O mutante ebr₅ apresenta crescimento em concentrações de até 140 µg/ml (concentração máxima testada).

TABELA 8 Número de colônias crescidas da linhagem pab₁fw₁ em diferentes concentrações de Brometo de Etídio.

| Concentração (µg/ml) | Número de Colônias |
|-------------------------|-----------------------|
| 0 | 107 |
| 5 | 4 |
| 10 | 0 |
| 15 | 0 |
| 20 | 0 |
| 30 | 0 |
| 40 | 0 |

TABELA 9 Crescimento do mutante ebr₅ comparado com a linhagem parental pab₁fw₁ nas diferentes concentrações de Brometo de Etídio.

| Concentrações (µg/ml) | <u>pab₁fw₁</u> | <u>ebr₅</u> |
|--------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| 0 | + | + |
| 5 | + | + |
| 10 | - | + |
| 30 | - | + |
| 50 | - | + |
| 65 | - | + |
| 80 | - | + |
| 95 | - | + |
| 100 | - | + |
| 120 | - | + |
| 140 | - | + |

+ crescimento

- ausência de crescimento

4.10. Interação Alélica da Marca de Resistência ao Brometo de Etí- dio

Para se verificar a interação alélica da marca de resistência, procedeu-se segundo o item 3.7.7.4. Os resultados estão na TABELA 10 e na FIGURA 2. Optou-se por uma comparação de crescimento após 2 dias de incubação, porque a partir daí havia haploidização do diplóide.

Observa-se que o mutante resistente abr₅ teve seu crescimento reduzido para 79% na concentração de 40 µg/ml de Brometo de Etídio, e de 52 e 34% nas concentrações de 100 e 140 µg/ml respectivamente. O parental pab₁fwn₁ teve seu crescimento reduzido a zero na concentração de 40 µg/ml. O diplóide abr₅/nic₁olv₃, entretanto, parece ter características intermediárias (FIGURA 2).

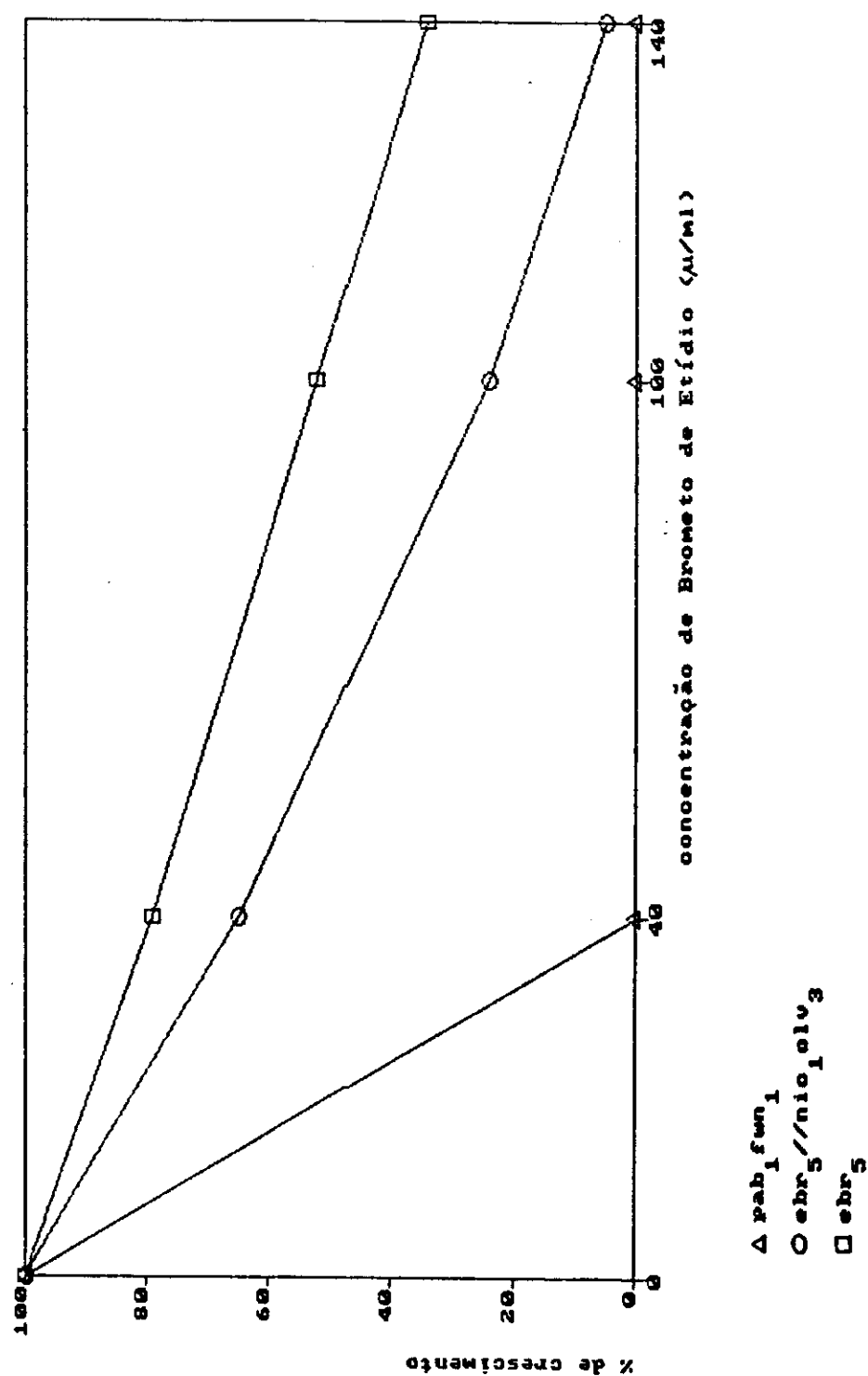


TABELA 10 Tamanho da colônia e porcentagem de crescimento nas diferentes concentrações de Brometo de Etídio.

| Concen- tração (µg/ml) | <u>pab</u> ₁ <u>fwn</u> ₁ | | <u>ebr</u> ₅ | | <u>ebr</u> ₅ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | |
|------------------------------|---|-----|-------------------------|-----|--|-----|
| | tamanho (cm) | % | tamanho (cm) | % | tamanho (cm) | % |
| 0 | 2,25 | 100 | 2,22 | 100 | 2,27 | 100 |
| 40 | - | 0 | 1,75 | 79 | 1,49 | 65 |
| 100 | - | 0 | 1,16 | 52 | 0,55 | 24 |
| 140 | - | 0 | 0,77 | 34 | 0,12 | 5 |

- ausência de crescimento

FIGURA II Porcentagem de crescimento do mutante resistente, do parental sensível e do diplóide nas diferentes concentrações de Brometo de Etfídio.



4.11. Obtenção e Caracterização de Diplóides

Todos os mutantes auxotróficos e de resistência obtidos, foram cruzados com a linhagem nic_1olv_3 , segundo a metodologia descrita no item 3.8.1.. Foram cruzados também os segregantes lys_1nic_1 (segregante número 46 do diplóide $lys_1//nic_1olv_3$) com a linhagem arg_1 ; o segregante met_1nic_1 (segregante número 37 do diplóide $met_1//nic_1olv_3$) com o segregante arg_1lys_1 (segregante número 11 do diplóide $arg_1//lys_1nic_1$), segundo a mesma metodologia (item 3.8.1.)

Os diplóides obtidos foram caracterizados conforme descrito no item 3.8.2., e os resultados estão relacionados na TABELA 11. Na TABELA 12 estão as siglas usadas para os diplóides.

Verifica-se (TABELA 11) que todos os diplóides se encontram dentro dos padrões de caracterização de linhagem 2n descrito no item 3.8.2..

Após caracterização, estes foram tratados segundo a metodologia descrita no item 3.9. para se obter segregantes, com o objetivo de se estudar a segregação das marcas genéticas envolvidas nos cruzamentos.

TABELA 11 Caracterização dos Diplóides.

| Linhagens Haploides | Coloração de Conídios | Segregação em Benlate ** | Diâmetro de conídios (μ) ** | Relação 2n/parental |
|---|-----------------------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| 1- <u>pab</u> ₁ <u>fun</u> ₁ | marrom claro | - | 4,47 | |
| 2- <u>nic</u> ₁ <u>oly</u> ₃ | verde oliva | - | 4,76 | |
| 3- <u>mgr</u> ₂ | marrom claro | - | 4,53 | |
| 4- <u>ehr</u> ₅ | marrom claro | - | 4,93 | |
| 5- <u>lys</u> ₁ | marrom claro | - | 4,65 | |
| 6- <u>tio</u> ₁ | marrom claro | - | 4,59 | |
| 7- <u>mys</u> ₁ | marrom claro | - | 4,65 | |
| 8- <u>met</u> ₁ | marrom claro | - | 4,39 | |
| 9- <u>pur</u> ₁ | marrom claro | - | 4,39 | |
| 10- <u>arg</u> ₁ | marrom claro | - | 4,42 | |
| 11- <u>lys</u> ₁ <u>nic</u> ₁ | verde oliva | - | 4,65 | |
| 12- <u>arg</u> ₁ <u>lys</u> ₁ | marrom claro | - | 4,19 | |
| 13- <u>met</u> <u>nic</u> | verde oliva | - | 4,79 | |
| Cruzamentos | | | | Primeiro Segundo parental parental |
| 1x2 * | preto | + | 5,58 | 1,25 1,17 |
| 3x2 | preto | + | 5,49 | 1,21 1,15 |
| 4x2 | preto | + | 6,18 | 1,25 1,30 |
| 5x2 | preto | + | 5,85 | 1,26 1,23 |
| 6x2 | preto | + | 6,53 | 1,42 1,37 |
| 7x2 | preto | + | 5,45 | 1,17 1,14 |
| 8x2 | preto | + | 5,72 | 1,30 1,20 |
| 9x2 | preto | + | 5,72 | 1,30 1,20 |
| 10x2 | preto | + | 6,12 | 1,38 1,28 |
| 10X11 | preto | + | 5,91 | 1,33 1,27 |
| 12X13 | preto | + | 5,85 | 1,39 1,22 |

* simbologia dos diplóides TABELA 12

** para condições ver item 3.8.2.

TABELA 12 Símbolos dos diplóides.

| Cruzamentos | Símbolo |
|-------------|--|
| 1X2 | <u>pab</u> ₁ <u>fw</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ |
| 3X2 | <u>mgr</u> ₂ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ |
| 4X2 | <u>ebr</u> ₅ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ |
| 5X2 | <u>lys</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ |
| 6X2 | <u>tio</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ |
| 7X2 | <u>mys</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ |
| 8X2 | <u>met</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ |
| 9X2 | <u>pur</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ |
| 10X2 | <u>arg</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ |
| 10X11 | <u>arg</u> ₁ // <u>lys</u> ₁ <u>nic</u> ₁ |
| 12X13 | <u>arg</u> ₁ <u>lys</u> ₁ // <u>met</u> ₁ <u>nic</u> ₁ |

4.11.1. Diplóide $\underline{mgr}_2//\underline{nic}_1\underline{olv}_3$

Foram obtidos 50 segregantes através da metodologia descrita no item 3.9.1. (MC + Benlate), caracterizados segundo o item 3.9.2. e os resultados estão na TABELA 13.

Através dos dados da TABELA 13 foi feita a análise mitótica (TABELA 14) que mostra que os genes \underline{mgr}_2 , \underline{olv}_3 , \underline{nic}_1 e \underline{fwn}_1 devem estar no mesmo grupo de ligação.

4.11.2. Diplóide $\underline{ebr}_5//\underline{nic}_1\underline{olv}_3$

Foram obtidos 50 segregantes através da metodologia descrita no item 3.9.1. (MC + Benlate), caracterizados segundo o item 3.9.2. e os resultados estão na TABELA 15

Através dos dados da TABELA 15 foi feita a análise mitótica (TABELA 16) que mostra que os genes \underline{ebr}_5 , \underline{olv}_3 , \underline{nic}_1 e \underline{fwn}_1 devem estar no mesmo grupo de ligação.

TABELA 13 Marcas auxotróficas, morfológicas e de resistência ao Verde Malaquita dos segregantes do diplóide

$\frac{mgr_2}{nic_1} \frac{olv_3}{_3}$

| SEGREGANTE | pab | nic | mgr | COR | SEGREGANTE | pab | nic | mgr | COR |
|------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|
| 01 | - | + | + | fun | 26 | - | - | - | olv |
| 02 | - | + | + | fun | 27 | + | - | - | olv |
| 03 | + | + | + | fun | 28 | - | - | - | olv |
| 04 | - | + | + | fun | 29 | - | - | - | olv |
| 05 | - | + | + | fun | 30 | + | - | - | olv |
| 06 | + | + | + | fun | 31 | + | - | - | olv |
| 07 | + | + | + | fun | 32 | + | - | - | olv |
| 08 | - | + | + | fun | 33 | + | - | - | olv |
| 09 | + | + | + | fun | 34 | + | - | - | olv |
| 10 | - | + | + | fun | 35 | + | - | - | olv |
| 11 | + | + | + | fun | 36 | + | - | - | olv |
| 12 | + | + | + | fun | 37 | - | - | - | olv |
| 13 | - | + | + | fun | 38 | - | - | - | olv |
| 14 | + | + | + | fun | 39 | - | - | - | olv |
| 15 | + | + | + | fun | 40 | + | - | - | olv |
| 16 | + | + | + | fun | 41 | + | - | - | olv |
| 17 | + | + | + | fun | 42 | + | - | - | olv |
| 18 | + | + | + | fun | 43 | + | - | - | olv |
| 19 | + | + | + | fun | 44 | + | - | - | olv |
| 20 | + | + | + | fun | 45 | + | - | - | olv |
| 21 | + | + | + | fun | 46 | + | - | - | olv |
| 22 | + | + | + | fun | 47 | - | - | - | olv |
| 23 | + | + | + | fun | 48 | + | - | - | olv |
| 24 | + | + | + | fun | 49 | + | - | - | olv |
| 25 | + | + | + | fun | 50 | + | - | - | olv |

TABELA 14 Análise Mitótica do diplóide

$\frac{mgr_2}{nic_1} \frac{olv_3}{_3}$

PARENTAIS: $\frac{mgr_2}{nic_1} \frac{olv_3}{_3}$ $\frac{pab^+ nic^+ fun^+ olv^+ mgr^+}{pab^+ nic^+ fun^+ olv^+ mgr^+}$

| | | | |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | $\frac{pab^+}{pab^-}$ | | $\frac{pab^+}{pab^-}$ |
| $\frac{mgr^+}{mgr^-}$ | 18 7 | $\frac{fun^+}{fun^-}$ | 18 7 |
| | 18 7 | $\frac{fun^-}{fun^+}$ | 18 7 |
| | $\frac{fun^+}{fun^-}$ | | $\frac{olv^+}{olv^-}$ |
| $\frac{mgr^+}{mgr^-}$ | 0 25 | $\frac{nic^+}{nic^-}$ | 25 0 |
| | 25 0 | $\frac{nic^-}{nic^+}$ | 0 25 |
| | $\frac{olv^+}{olv^-}$ | | $\frac{pab^+}{pab^-}$ |
| $\frac{mgr^+}{mgr^-}$ | 25 0 | $\frac{nic^+}{nic^-}$ | 18 7 |
| | 0 25 | $\frac{nic^-}{nic^+}$ | 18 7 |
| | $\frac{nic^+}{nic^-}$ | | $\frac{fun^+}{fun^-}$ |
| $\frac{mgr^+}{mgr^-}$ | 25 0 | $\frac{nic^+}{nic^-}$ | 0 25 |
| | 0 25 | $\frac{nic^-}{nic^+}$ | 25 0 |
| | $\frac{pab^+}{pab^-}$ | | $\frac{pab^+}{pab^-}$ |
| $\frac{olv^+}{olv^-}$ | 18 7 | | |
| $\frac{olv^-}{olv^+}$ | 18 7 | | |

Total de 50 segregantes.

TABELA 15 Marcas auxotróficas, morfológicas e de resistência ao Brometo de Etídio dos segregantes do diplóide

$\frac{ebr}{5} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$

| SEGREGANTE | pab | nic | ebr | COR | SEGREGANTE | pab | nic | ebr | COR |
|------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|
| 01 | + | + | + | fun | 26 | + | - | - | olv |
| 02 | - | + | + | fun | 27 | + | - | - | olv |
| 03 | + | + | + | fun | 28 | - | - | - | olv |
| 04 | + | + | + | fun | 29 | - | - | - | olv |
| 05 | + | + | + | fun | 30 | - | - | - | olv |
| 06 | - | + | + | fun | 31 | + | - | - | olv |
| 07 | - | + | + | fun | 32 | - | - | - | olv |
| 08 | + | + | + | fun | 33 | - | - | - | olv |
| 09 | - | + | + | fun | 34 | - | - | - | olv |
| 10 | - | + | + | fun | 35 | - | - | - | olv |
| 11 | + | + | + | fun | 36 | + | - | - | olv |
| 12 | + | + | + | fun | 37 | + | - | - | olv |
| 13 | - | + | + | fun | 38 | - | - | - | olv |
| 14 | - | + | + | fun | 39 | + | - | - | olv |
| 15 | - | + | + | fun | 40 | - | - | - | olv |
| 16 | - | + | + | fun | 41 | + | - | - | olv |
| 17 | - | + | + | fun | 42 | - | - | - | olv |
| 18 | + | + | + | fun | 43 | + | - | - | olv |
| 19 | + | + | + | fun | 44 | + | - | - | olv |
| 20 | - | + | + | fun | 45 | + | - | - | olv |
| 21 | - | + | + | fun | 46 | + | - | - | olv |
| 22 | - | + | + | fun | 47 | - | - | - | olv |
| 23 | - | + | + | fun | 48 | + | - | - | olv |
| 24 | - | + | + | fun | 49 | + | - | - | olv |
| 25 | + | + | + | fun | 50 | + | - | - | olv |

TABELA 16 Análise Mitótica do diplóide

$\frac{ebr}{5} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$

PARENTAIS: $\frac{ebr}{5}$ $\frac{pab^{+} nic^{+} fun^{+} olv^{+} ebr^{+}}{pab^{+} nic^{+} fun^{+} olv^{+} ebr^{+}}$
 $\frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$

| | | | | | |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | pab ⁺ | pab ⁻ | | pab ⁺ | pab ⁻ |
| ebr ⁺ | 10 | 15 | fun ⁺ | 14 | 11 |
| ebr ⁻ | 14 | 11 | fun ⁻ | 10 | 15 |

| | | | | | |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | fun ⁺ | fun ⁻ | | olv ⁺ | olv ⁻ |
| ebr ⁺ | 0 | 25 | nic ⁺ | 25 | 0 |
| ebr ⁻ | 25 | 0 | nic ⁻ | 0 | 25 |

| | | | | | |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | olv ⁺ | olv ⁻ | | pab ⁺ | pab ⁻ |
| ebr ⁺ | 25 | 0 | nic ⁺ | 10 | 15 |
| ebr ⁻ | 0 | 25 | nic ⁻ | 14 | 11 |

| | | | | | |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | nic ⁺ | nic ⁻ | | fun ⁺ | fun ⁻ |
| ebr ⁺ | 25 | 0 | nic ⁺ | 0 | 25 |
| ebr ⁻ | 0 | 25 | nic ⁻ | 25 | 0 |

| | | |
|------------------|------------------|------------------|
| | pab ⁺ | pab ⁻ |
| olv ⁺ | 10 | 15 |
| olv ⁻ | 14 | 11 |

Total de 50 segregantes

4.11.3. Diploide lys₁//nic₁olv₃

Foram obtidos 50 segregantes através da metodologia descrita no item 3.9.1.(MC + Benlate), caracterizados segundo o item 3.9.2. e os resultados estão na TABELA 17.

Através dos dados da TABELA 17 foi feita a análise mitótica (TABELA 18) que mostra que o gene lys₁ não deve estar ligado aos demais genes envolvidos no cruzamento.

4.11.4. Diploide tio₁//nic₁olv₃

Foram obtidos 50 segregantes através da metodologia descrita no item 3.9.1.(MC + Benlate), caracterizados segundo o item 3.9.2. e os resultados estão na TABELA 19.

Através dos dados da TABELA 19 foi feita a análise mitótica (TABELA 20) que mostra que os genes tio₁, nic₁, olv₃ e fwn₁ devem estar no mesmo grupo de ligação.

TABELA 17 Marcas auxotróficas e morfológicas dos segregantes do diplóide

$\underline{\text{lys}}_1 // \underline{\text{nic}}_1 \underline{\text{olv}}_3$.

| SEGREGANTE | pab | nic | lys | COR | SEGREGANTE | pab | nic | lys | COR |
|------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|
| 01 | - | + | + | fwn | 26 | + | - | + | olv |
| 02 | - | + | + | fwn | 27 | + | - | + | olv |
| 03 | + | + | - | fwn | 28 | + | - | - | olv |
| 04 | - | + | + | fwn | 29 | + | - | - | olv |
| 05 | + | + | - | fwn | 30 | - | - | - | olv |
| 06 | + | + | + | fwn | 31 | + | - | + | olv |
| 07 | + | + | - | fwn | 32 | + | - | + | olv |
| 08 | + | + | + | fwn | 33 | + | - | + | olv |
| 09 | + | + | - | fwn | 34 | + | - | - | olv |
| 10 | - | + | + | fwn | 35 | + | - | + | olv |
| 11 | - | + | + | fwn | 36 | + | - | + | olv |
| 12 | - | + | + | fwn | 37 | + | - | + | olv |
| 13 | + | + | + | fwn | 38 | + | - | - | olv |
| 14 | + | + | - | fwn | 39 | - | - | - | olv |
| 15 | + | + | - | fwn | 40 | + | - | + | olv |
| 16 | + | + | + | fwn | 41 | + | - | + | olv |
| 17 | + | + | + | fwn | 42 | + | - | - | olv |
| 18 | + | + | - | fwn | 43 | - | - | - | olv |
| 19 | + | + | - | fwn | 44 | + | - | + | olv |
| 20 | + | + | + | fwn | 45 | + | - | - | olv |
| 21 | + | + | - | fwn | 46 | + | - | - | olv |
| 22 | + | + | - | fwn | 47 | + | - | + | olv |
| 23 | + | + | + | fwn | 48 | - | - | + | olv |
| 24 | - | + | + | fwn | 49 | + | - | + | olv |
| 25 | + | + | - | fwn | 50 | + | - | + | olv |

TABELA 18 Análise Mitótica do diplóide

$\underline{\text{lys}}_1 // \underline{\text{nic}}_1 \underline{\text{olv}}_3$.

PARENTAIS: $\underline{\text{lys}}_1$ $\underline{\text{nic}}_1 \underline{\text{olv}}_3$ $\text{pab}^+ \text{nic}^- \text{fwn}^+ \text{olv}^- \text{lys}^+$ $\text{pab}^- \text{nic}^+ \text{fwn}^- \text{olv}^+ \text{lys}^-$

| | | | | | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | pab^+ | pab^- | | pab^+ | pab^- |
| lys^+ | 21 | 8 | fwn^+ | 21 | 4 |
| lys^- | 18 | 3 | fwn^- | 18 | 7 |
| | fwn^+ | fwn^- | | olv^+ | olv^- |
| lys^+ | 15 | 14 | nic^+ | 25 | 0 |
| lys^- | 10 | 11 | nic^- | 0 | 25 |
| | olv^+ | olv^- | | pab^+ | pab^- |
| lys^+ | 14 | 15 | nic^+ | 18 | 7 |
| lys^- | 11 | 10 | nic^- | 21 | 4 |
| | nic^+ | nic^- | | fwn^+ | fwn^- |
| lys^+ | 14 | 15 | nic^+ | 0 | 25 |
| lys^- | 11 | 10 | nic^- | 25 | 0 |
| | pab^+ | pab^- | | pab^+ | pab^- |
| olv^+ | 18 | 7 | | | |
| olv^- | 21 | 4 | | | |

Total de 50 segregantes

TABELA 19 Marcas auxotróficas e morfológicas dos segregantes do diplóide

$\frac{tio}{1} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$

| SEGREGANTE | pab | nic | tio | COR | SEGREGANTE | pab | nic | tio | COR |
|------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|
| 01 | + | + | + | fun | 26 | + | - | + | olv |
| 02 | + | + | - | fun | 27 | - | - | + | olv |
| 03 | + | + | - | fun | 28 | - | - | + | olv |
| 04 | + | + | - | fun | 29 | + | - | + | olv |
| 05 | + | + | - | fun | 30 | - | - | + | olv |
| 06 | + | + | - | fun | 31 | - | - | + | olv |
| 07 | + | + | - | fun | 32 | + | - | - | olv |
| 08 | + | + | - | fun | 33 | - | - | + | olv |
| 09 | - | + | - | fun | 34 | - | - | + | olv |
| 10 | - | + | - | fun | 35 | - | - | + | olv |
| 11 | - | + | - | fun | 36 | + | - | - | olv |
| 12 | + | + | - | fun | 37 | + | - | + | olv |
| 13 | + | + | - | fun | 38 | + | - | + | olv |
| 14 | - | + | - | fun | 39 | + | - | + | olv |
| 15 | + | + | - | fun | 40 | + | - | + | olv |
| 16 | + | + | - | fun | 41 | - | - | + | olv |
| 17 | + | + | - | fun | 42 | - | - | - | olv |
| 18 | + | + | - | fun | 43 | - | - | - | olv |
| 19 | - | + | - | fun | 44 | + | + | + | olv |
| 20 | + | + | - | fun | 45 | + | - | + | olv |
| 21 | + | + | - | fun | 46 | + | - | + | olv |
| 22 | + | + | - | fun | 47 | + | - | + | olv |
| 23 | - | + | - | fun | 48 | + | - | + | olv |
| 24 | + | + | - | fun | 49 | - | - | + | olv |
| 25 | - | + | - | fun | 50 | - | - | + | olv |

TABELA 20 Análise Mitótica do diplóide

$\frac{tio}{1} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$

PARENTAIS: $\frac{tio}{1}$ $\frac{pab}{+} \frac{nic}{-} \frac{fun}{+} \frac{olv}{-} \frac{tio}{+}$
 $\frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$ $\frac{pab}{+} \frac{nic}{-} \frac{fun}{+} \frac{olv}{-} \frac{tio}{+}$

| | pab ⁺ | pab ⁻ | | pab ⁺ | pab ⁻ |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| tio ⁺ | 11 | 11 | fun ⁺ | 13 | 12 |
| tio ⁻ | 20 | 8 | fun ⁻ | 18 | 7 |

| | fun ⁺ | fun ⁻ | | olv ⁺ | olv ⁻ |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| tio ⁺ | 21 | 1 | nic ⁺ | 25 | 1 |
| tio ⁻ | 4 | 24 | nic ⁻ | 0 | 24 |

| | olv ⁺ | olv ⁻ | | pab ⁺ | pab ⁻ |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| tio ⁺ | 1 | 21 | nic ⁺ | 19 | 7 |
| tio ⁻ | 24 | 4 | nic ⁻ | 12 | 12 |

| | nic ⁺ | nic ⁻ | | fun ⁺ | fun ⁻ |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| tio ⁺ | 2 | 20 | nic ⁺ | 1 | 25 |
| tio ⁻ | 24 | 4 | nic ⁻ | 24 | 0 |

| | pab ⁺ | pab ⁻ |
|------------------|------------------|------------------|
| olv ⁺ | 18 | 7 |
| olv ⁻ | 13 | 12 |

Total de 50 segregantes

4.11.5. Diplóide mys₁//nic₁olv₃

Foram obtidos 50 segregantes através da metodologia descrita no item 3.9.1.(MC + Benlate), caracterizados segundo o item 3.9.2. e os resultados estão na TABELA 21.

Através dos dados da TABELA 21 foi feita a análise mitótica (TABELA 22) que mostra que os genes mys₁, nic₁, olv₃ e fwn₁ devem estar no mesmo grupo de ligação.

4.11.6. Diplóide met₁//nic₁olv₃

Foram obtidos 50 segregantes através da metodologia descrita no item 3.9.1.(25 segregantes fwn em MC + Benlate e 25 segregantes olv em MM + Benlate + requerimentos nutricionais), caracterizados segundo o item 3.9.2. e os resultados estão na TABELA 23.

Através dos dados da TABELA 23 foi feita a análise mitótica (TABELA 24) que mostra que o gene met₁ não deve estar ligado aos demais genes envolvidos no cruzamento.

TABELA 21 Marcas auxotróficas e morfológicas dos segregantes do diplóide

$\frac{mys}{1} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$

| SEGREGANTE | pab | nic | mys | COR | SEGREGANTE | pab | nic | mys | COR |
|------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|
| 01 | - | + | - | fun | 26 | - | - | - | olv |
| 02 | + | + | - | fun | 27 | + | - | - | olv |
| 03 | + | + | - | fun | 28 | - | - | + | olv |
| 04 | - | + | - | fun | 29 | + | - | + | olv |
| 05 | + | + | - | fun | 30 | + | - | + | olv |
| 06 | + | + | - | fun | 31 | - | - | + | olv |
| 07 | - | + | - | fun | 32 | + | - | + | olv |
| 08 | - | + | - | fun | 33 | + | - | + | olv |
| 09 | + | + | - | fun | 34 | + | - | + | olv |
| 10 | - | + | - | fun | 35 | - | - | + | olv |
| 11 | + | + | - | fun | 36 | + | - | - | olv |
| 12 | + | + | - | fun | 37 | + | - | + | olv |
| 13 | + | + | - | fun | 38 | + | - | + | olv |
| 14 | + | + | - | fun | 39 | + | - | + | olv |
| 15 | - | + | - | fun | 40 | + | - | + | olv |
| 16 | - | + | - | fun | 41 | + | - | + | olv |
| 17 | + | + | - | fun | 42 | - | - | + | olv |
| 18 | + | + | - | fun | 43 | + | - | + | olv |
| 19 | + | + | - | fun | 44 | - | - | + | olv |
| 20 | + | + | - | fun | 45 | - | - | + | olv |
| 21 | - | + | - | fun | 46 | - | - | + | olv |
| 22 | + | + | - | fun | 47 | + | - | + | olv |
| 23 | + | + | - | fun | 48 | + | - | + | olv |
| 24 | + | + | - | fun | 49 | - | - | + | olv |
| 25 | + | + | - | fun | 50 | + | - | + | olv |

TABELA 22 Análise Mitótica do diplóide

$\frac{mys}{1} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$

PARENTAIS: $\frac{mys}{1} \frac{nic}{1} \frac{olv}{1}$ $\frac{pab}{1} \frac{nic}{1} \frac{fun}{1} \frac{olv}{1} \frac{mys}{1}$

| | | | | | |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | pab ⁺ | pab ⁻ | | pab ⁺ | pab ⁻ |
| mys ⁺ | 14 | 8 | fun ⁺ | 16 | 9 |
| mys ⁻ | 19 | 9 | fun ⁻ | 17 | 8 |
| | fun ⁺ | fun ⁻ | | olv ⁺ | olv ⁻ |
| mys ⁺ | 22 | 0 | nic ⁺ | 25 | 0 |
| mys ⁻ | 3 | 25 | nic ⁻ | 0 | 25 |
| | olv ⁺ | olv ⁻ | | pab ⁺ | pab ⁻ |
| mys ⁺ | 0 | 22 | nic ⁺ | 17 | 8 |
| mys ⁻ | 25 | 3 | nic ⁻ | 16 | 9 |
| | nic ⁺ | nic ⁻ | | fun ⁺ | fun ⁻ |
| mys ⁺ | 0 | 22 | nic ⁺ | 0 | 25 |
| mys ⁻ | 25 | 3 | nic ⁻ | 25 | 0 |
| | pab ⁺ | pab ⁻ | | | |
| olv ⁺ | 17 | 8 | | | |
| olv ⁻ | 16 | 9 | | | |

Total de 50 segregantes

TABELA 23 Marcas auxotróficas e morfológicas dos segregantes do diplóide $\frac{net}{1} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$.

| SEGREGANTE | pab | nic | met | COR | SEGREGANTE | pab | nic | met | COR |
|------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|
| 01 | + | + | - | fun | 26 | - | - | + | olv |
| 02 | + | + | - | fun | 27 | + | - | + | olv |
| 03 | + | + | + | fun | 28 | + | - | + | olv |
| 04 | - | + | + | fun | 29 | + | - | + | olv |
| 05 | - | + | - | fun | 30 | - | - | + | olv |
| 06 | + | + | + | fun | 31 | + | - | + | olv |
| 07 | + | + | - | fun | 32 | + | - | + | olv |
| 08 | - | + | + | fun | 33 | + | - | + | olv |
| 09 | + | + | - | fun | 34 | + | - | + | olv |
| 10 | - | + | + | fun | 35 | + | - | + | olv |
| 11 | + | + | + | fun | 36 | + | - | + | olv |
| 12 | - | + | + | fun | 37 | + | - | - | olv |
| 13 | - | + | + | fun | 38 | + | - | + | olv |
| 14 | - | + | - | fun | 39 | + | - | + | olv |
| 15 | - | + | + | fun | 40 | + | - | + | olv |
| 16 | + | + | + | fun | 41 | - | - | + | olv |
| 17 | - | + | - | fun | 42 | + | - | + | olv |
| 18 | - | + | - | fun | 43 | - | - | + | olv |
| 19 | + | + | - | fun | 44 | + | - | + | olv |
| 20 | + | + | + | fun | 45 | + | - | + | olv |
| 21 | + | + | + | fun | 46 | + | - | + | olv |
| 22 | + | + | + | fun | 47 | + | - | + | olv |
| 23 | - | + | + | fun | 48 | - | - | + | olv |
| 24 | + | + | + | fun | 49 | + | - | + | olv |
| 25 | - | + | - | fun | 50 | + | - | + | olv |

TABELA 24 Análise Mitótica do diplóide $\frac{net}{1} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$.

PARENTAIS: $\frac{net}{1}$ $\frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$ $\frac{pab}{+} \frac{nic}{-} \frac{fun}{+} \frac{olv}{-} \frac{net}{+}$ $\frac{pab}{+} \frac{nic}{-} \frac{fun}{+} \frac{olv}{-} \frac{net}{+}$

| | | | | | |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | pab ⁺ | pab ⁻ | | pab ⁺ | pab ⁻ |
| net ⁺ | 27 | 12 | fun ⁺ | 20 | 5 |
| net ⁻ | 6 | 5 | fun ⁻ | 13 | 12 |
| | fun ⁺ | fun ⁻ | | olv ⁺ | olv ⁻ |
| net ⁺ | 24 | 15 | nic ⁺ | 25 | 0 |
| net ⁻ | 1 | 10 | nic ⁻ | 0 | 25 |
| | olv ⁺ | olv ⁻ | | pab ⁺ | pab ⁻ |
| net ⁺ | 15 | 24 | nic ⁺ | 13 | 12 |
| net ⁻ | 10 | 1 | nic ⁻ | 20 | 5 |
| | nic ⁺ | nic ⁻ | | fun ⁺ | fun ⁻ |
| net ⁺ | 15 | 24 | nic ⁺ | 0 | 25 |
| net ⁻ | 10 | 1 | nic ⁻ | 25 | 0 |
| | pab ⁺ | pab ⁻ | | | |
| olv ⁺ | 13 | 12 | | | |
| olv ⁻ | 20 | 5 | | | |

Total de 50 segregantes

4.11.7. Diploíde arg₁//nic₁olv₃

Foram obtidos 50 segregantes através da metodologia descrita no ítem 3.9.1. (25 segregantes olv em MM + Benlate + requerimentos nutricionais e 25 fwn em MC + Benlate), caracterizados segundo o ítem 3.9.2. e os resultados estão na TABELA 25.

Através dos dados da TABELA 25 foi feita a análise mitótica (TABELA 26) que mostra que o gene arg₁ não deve estar ligado aos demais genes envolvidos no cruzamento.

4.11.8. Diploíde arg₁//lys₁nic₁

Foram obtidos 50 segregantes através da metodologia descrita no ítem 3.9.1. (25 segregantes fwn em MC + Benlate e 25 segregantes olv em MM + Benlate + requerimentos nutricionais), caracterizados segundo o ítem 3.9.2. e os resultados estão na TABELA 27.

Através da TABELA 27 foi feita a análise mitótica (TABELA 28) que mostra que os genes arg₁ e lys₁ não devem estar no mesmo grupo de ligação.

TABELA 25 Marcas auxotróficas e morfológicas dos segregantes do diplóide

$\underline{\text{arg}}_1 // \underline{\text{nic}}_1 \underline{\text{olv}}_3$

| SEGREGANTE | pab | nic | arg | COR | SEGREGANTE | pab | nic | arg | COR |
|------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|
| 01 | - | + | + | fun | 26 | + | - | + | olv |
| 02 | + | + | + | fun | 27 | + | - | + | ovi |
| 03 | + | + | + | fun | 28 | + | - | + | olv |
| 04 | + | + | - | fun | 29 | - | - | + | olv |
| 05 | - | + | + | fun | 30 | - | - | + | olv |
| 06 | + | + | + | fun | 31 | - | - | + | olv |
| 07 | - | + | + | fun | 32 | - | - | + | olv |
| 08 | + | + | + | fun | 33 | - | - | + | olv |
| 09 | - | + | + | fun | 34 | - | - | + | olv |
| 10 | + | + | + | fun | 35 | + | - | + | olv |
| 11 | - | + | + | fun | 36 | - | - | + | olv |
| 12 | - | + | + | fun | 37 | + | - | + | olv |
| 13 | + | + | + | fun | 38 | - | - | + | olv |
| 14 | - | + | + | fun | 39 | - | - | + | olv |
| 15 | + | + | - | fun | 40 | - | - | + | olv |
| 16 | + | + | + | fun | 41 | - | - | + | olv |
| 17 | + | + | + | fun | 42 | + | - | + | olv |
| 18 | - | + | - | fun | 43 | - | - | + | olv |
| 19 | + | + | - | fun | 44 | + | - | + | olv |
| 20 | - | + | - | fun | 45 | + | - | + | olv |
| 21 | - | + | - | fun | 46 | + | - | + | olv |
| 22 | - | + | - | fun | 47 | - | - | + | olv |
| 23 | - | + | - | fun | 48 | - | - | + | olv |
| 24 | + | + | + | fun | 49 | + | - | + | olv |
| 25 | - | + | + | fun | 50 | - | - | + | olv |

TABELA 26 Análise Mitótica do diplóide

$\underline{\text{arg}}_1 // \underline{\text{nic}}_1 \underline{\text{olv}}_3$

PARENTAIS: $\underline{\text{arg}}_1$ $\underline{\text{nic}}_1 \underline{\text{olv}}_3$ $\text{pab}^+ \text{nic}^- \text{fun}^+ \text{olv}^- \text{arg}^+$
 $\text{pab}^- \text{nic}^+ \text{fun}^- \text{olv}^+ \text{arg}^-$

| | | | | | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | pab^+ | pab^- | | pab^+ | pab^- |
| arg^+ | 19 | 23 | fun^+ | 10 | 15 |
| arg^- | 3 | 5 | fun^- | 12 | 13 |
| | fun^+ | fun^- | | olv^+ | olv^- |
| arg^+ | 25 | 17 | nic^+ | 25 | 0 |
| arg^- | 0 | 8 | nic^- | 0 | 25 |
| | olv^+ | olv^- | | pab^+ | pab^- |
| arg^+ | 17 | 25 | nic^+ | 12 | 13 |
| arg^- | 8 | 0 | nic^- | 10 | 15 |
| | nic^+ | nic^- | | fun^+ | fun^- |
| arg^+ | 17 | 25 | nic^+ | 0 | 25 |
| arg^- | 8 | 0 | nic^- | 25 | 0 |
| | pab^+ | pab^- | | | |
| olv^+ | 12 | 13 | | | |
| olv^- | 10 | 15 | | | |

Total de 50 segregantes

TABELA 27 Marcas auxotróficas e morfológicas dos segregantes do diplóide

$\underline{\text{arg}}_1 // \underline{\text{lys}}_1 \underline{\text{nic}}_1$.

| SEGRE GANTE | pab | nic | arg | lys | COR | SEGRE GANTE | pab | nic | arg | lys | COR |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 01 | - | + | + | + | fun | 26 | + | - | + | + | olv |
| 02 | + | + | - | - | fun | 27 | + | - | + | + | olv |
| 03 | - | + | - | + | fun | 28 | + | - | + | + | olv |
| 04 | + | + | + | - | fun | 29 | - | - | + | + | olv |
| 05 | + | + | + | - | fun | 30 | - | - | + | + | olv |
| 06 | - | + | - | + | fun | 31 | - | - | + | - | olv |
| 07 | - | + | + | - | fun | 32 | - | - | + | + | olv |
| 08 | + | + | + | - | fun | 33 | + | - | + | + | olv |
| 09 | + | + | - | - | fun | 34 | + | - | + | + | olv |
| 10 | + | + | + | + | fun | 35 | - | - | + | + | olv |
| 11 | - | + | - | - | fun | 36 | + | - | + | + | olv |
| 12 | + | + | - | - | fun | 37 | - | - | + | - | olv |
| 13 | + | + | - | - | fun | 38 | - | - | + | + | olv |
| 14 | - | + | + | - | fun | 39 | + | - | + | + | olv |
| 15 | - | + | - | - | fun | 40 | + | - | + | + | olv |
| 16 | - | + | - | + | fun | 41 | + | - | + | + | olv |
| 17 | - | + | + | + | fun | 42 | + | - | + | + | olv |
| 18 | + | + | - | - | fun | 43 | + | - | + | + | olv |
| 19 | - | + | - | + | fun | 44 | + | - | + | + | olv |
| 20 | + | + | + | - | fun | 45 | + | - | + | + | olv |
| 21 | + | + | - | + | fun | 46 | + | - | + | + | olv |
| 22 | + | + | + | - | fun | 47 | + | - | + | + | olv |
| 23 | - | + | + | + | fun | 48 | - | - | + | + | olv |
| 24 | + | + | + | - | fun | 49 | + | - | + | + | olv |
| 25 | + | + | + | - | fun | 50 | + | - | + | + | olv |

TABELA 28 Análise Mitótica do diplóide

$\underline{\text{arg}}_1 // \underline{\text{lys}}_1 \underline{\text{nic}}_1$.

PARENTAIS: $\underline{\text{arg}}_1$ $\underline{\text{lys}}_1 \underline{\text{nic}}_1$ $\text{pab}^+ \text{nic}^- \text{fun}^+ \text{olv}^- \text{arg}^- \text{lys}^+$
 $\text{pab}^+ \text{nic}^- \text{fun}^+ \text{olv}^- \text{arg}^- \text{lys}^+$

| | pab ⁺ | pab ⁻ | | pab ⁺ | pab ⁻ |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| arg ⁺ | 25 | 13 | lys ⁺ | 19 | 13 |
| arg ⁻ | 6 | 6 | lys ⁻ | 12 | 6 |

| | fun ⁺ | fun ⁻ | | fun ⁺ | fun ⁻ |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| arg ⁺ | 25 | 13 | lys ⁺ | 23 | 9 |
| arg ⁻ | 0 | 12 | lys ⁻ | 2 | 16 |

| | arg ⁺ | arg ⁻ |
|------------------|------------------|------------------|
| lys ⁺ | 27 | 5 |
| lys ⁻ | 11 | 7 |

4.11.9. Diplóide arg₁lys₁//met₁nic₁

Foram obtidos 50 segregantes através da metodologia descrita no item 3.9.1. (MC + Benlate), caracterizados segundo o item 3.9.2. e os resultados estão na TABELA 29

Através dos dados da TABELA 29 foi feita a análise mitótica (TABELA 30) que mostra que os genes arg₁ e met₁ devem estar no mesmo grupo de ligação.

4.11.10. Recombinação genética entre marcas nos cruzamentos estudados

A TABELA 31 mostra, para cada combinação de marcas em todos os cruzamentos, o número de segregantes do tipo parental e recombinante. Pode-se verificar a ligação das marcas olv₃, nic₁, fw₁, mrc₂, tio₁, abr₅ e mys₁ e das marcas arg₁ e met₁. Verifica-se também que as genes pab₁ e lys₁ não estão ligadas aos demais genes estudados.

TABELA 29 Marcas auxotróficas e morfológicas dos segregantes do diplóide

$\frac{arg_1 lys_1}{net_1 nic_1}$

| SEGREGANTE | pab | nic | arg | lys | net | COR | SEGREGANTE | pab | nic | arg | lys | net | COR |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 01 | + | + | + | - | + | fun | 26 | + | + | + | - | - | fun |
| 02 | - | + | - | + | + | fun | 27 | + | + | + | + | - | fun |
| 03 | + | + | - | + | + | fun | 28 | + | + | - | - | + | fun |
| 04 | - | + | + | + | - | fun | 29 | - | + | + | - | - | fun |
| 05 | + | + | - | + | + | fun | 30 | - | + | + | + | - | fun |
| 06 | + | + | - | + | + | fun | 31 | - | + | + | + | - | fun |
| 07 | - | + | + | - | - | fun | 32 | - | + | + | + | - | fun |
| 08 | - | + | - | + | + | fun | 33 | + | + | + | - | - | fun |
| 09 | - | + | - | + | + | fun | 34 | + | + | + | - | - | fun |
| 10 | + | + | + | + | - | fun | 35 | - | + | - | + | + | fun |
| 11 | + | + | + | - | + | fun | 36 | - | + | + | + | - | fun |
| 12 | - | + | + | + | + | fun | 37 | - | + | - | - | + | fun |
| 13 | + | + | + | - | - | fun | 38 | - | + | - | + | + | fun |
| 14 | - | + | - | + | + | fun | 39 | + | + | + | - | - | fun |
| 15 | + | + | - | + | + | fun | 40 | + | + | - | - | + | fun |
| 16 | + | + | - | - | + | fun | 41 | - | + | + | - | + | fun |
| 17 | - | + | + | + | - | fun | 42 | - | + | - | + | + | fun |
| 18 | + | + | + | + | - | fun | 43 | + | + | + | - | - | fun |
| 19 | - | + | + | + | - | fun | 44 | + | + | + | - | + | fun |
| 20 | - | + | - | + | + | fun | 45 | - | + | + | + | - | fun |
| 21 | + | + | - | + | + | fun | 46 | + | + | + | + | - | fun |
| 22 | + | + | - | - | + | fun | 47 | + | + | + | + | - | fun |
| 23 | + | + | - | - | + | fun | 48 | + | + | + | + | - | fun |
| 24 | - | + | - | + | + | fun | 49 | + | + | + | - | - | fun |
| 25 | + | + | + | + | - | fun | 50 | - | - | + | + | - | olv |

TABELA 30 Análise Mitótica do diplóide

$\frac{arg_1 lys_1}{net_1 nic_1}$

PARENTÉCIS

$\frac{arg_1 lys_1}{net_1 nic_1}$: pab⁻ nic⁺ fun⁻ olv⁺ arg⁻ lys⁻ net⁺
 $\frac{net_1 nic_1}{arg_1 lys_1}$: pab⁺ nic⁻ fun⁺ olv⁻ arg⁺ lys⁺ net⁻

| | lys ⁺ | lys ⁻ | | arg ⁺ | arg ⁻ |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| net ⁺ | 15 | 10 | lys ⁺ | 17 | 14 |
| net ⁻ | 16 | 9 | lys ⁻ | 13 | 6 |

| | arg ⁺ | arg ⁻ |
|------------------|------------------|------------------|
| net ⁺ | 5 | 20 |
| net ⁻ | 25 | 0 |



MP

TABELA 31 Resultados combinados de recombinação genética entre marcas nos cruzamentos estudados.

| | <u>nic</u> ₁ | | <u>met</u> ₁ | | <u>arg</u> ₁ | | <u>mgr</u> ₂ | | <u>ebr</u> ₅ | | <u>tio</u> ₁ | | <u>mys</u> ₁ | | <u>lys</u> ₁ | | <u>fw</u> ₁ | | <u>olv</u> ₃ | |
|-------------------------|-------------------------|-----|-------------------------|----|-------------------------|----|-------------------------|----|-------------------------|----|-------------------------|----|-------------------------|----|-------------------------|----|------------------------|-----|-------------------------|-----|
| | * | ** | P | R | P | R | P | R | P | R | P | R | P | R | P | R | P | R | P | R |
| <u>pab</u> ₁ | 238 | 228 | 58 | 42 | 72 | 78 | 25 | 25 | 29 | 21 | 19 | 31 | 23 | 27 | 65 | 85 | 231 | 219 | 231 | 219 |
| <u>olv</u> ₃ | 449 | 1 | 60 | 40 | 91 | 59 | 50 | 0 | 50 | 0 | 45 | 5 | 47 | 3 | 65 | 85 | ### | | | |
| <u>fw</u> ₁ | 449 | 1 | 60 | 40 | 91 | 59 | 50 | 0 | 50 | 0 | 45 | 5 | 47 | 3 | 57 | 93 | | | | |
| <u>lys</u> ₁ | 85 | 65 | 26 | 24 | 62 | 88 | *** | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | | | | | | |
| <u>mys</u> ₁ | 47 | 3 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | | | | | | | | |
| <u>tio</u> ₁ | 44 | 6 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | | | | | | | | | | |
| <u>ebr</u> ₅ | 50 | 0 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | | | | | | | | | | | | |
| <u>mgr</u> ₂ | 50 | 0 | -- | -- | -- | -- | | | | | | | | | | | | | | |
| <u>arg</u> ₁ | 91 | 59 | 45 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <u>met</u> ₁ | 60 | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

* segregantes do tipo parental

** segregantes recombinantes

*** cruzamentos não realizados

marcas epistáticas

4.12. Produção de Amiloglicosidase

Com o objetivo de se verificar se as mutações introduzidas afetavam a produção da enzima nos mutantes, foram realizados os experimentos como descrito no item 3.6., e os resultados analisados segundo o item 3.10..

4.12.1. Experimentos 1 e 2.

As TABELAS A1 e A2 do Apêndice de tabelas (Experimentos 1 e 2 respectivamente) mostram os resultados obtidos relativos a produção dos mutantes ebr₅ e tio₁, seus respectivos diplóides, diplóide controle pab₁fwn₁//nic₁olv₃ (1) (diplóide controle número 1) e respectivos parentais. As análises estatísticas estão nas TABELAS 32 e 33.

Através da TABELA 32 verifica-se que, embora haja interação significativa entre linhagens x Experimentos, isto é, embora o comportamento relativo das linhagens varie significativamente de um experimento para outro, há diferenças gerais de linhagens que se sobrepõem a essas variações, de maneira que se pode indicar linhagens com produção de amiloglicosidase maior ou menor que outras para ambos os experimentos. Assim, na TABELA 33 verifica-se que ambos os mutantes apresentam produção significativamente menor que a linhagem parental pab₁ fwn₁, contudo a produção dos diplóides tio₁ // nic₁ olv₃ e ebr₅ // nic₁ olv₃ não diferem significativamente da linhagem parental

nic₁olv₃ , nem da linhagem pab₁fwn₁ , sugerindo que as mutações introduzidas nos mutantes afetam a produção e são complementadas nos respectivos diplóides.

O diplóide controle número 1 apresenta produção significativamente menor que todas as demais linhagens testadas.

TABELA 32 Análise de variância dos dados dos Experimentos 1 e 2.

| Causa da Variação | Graus de Liberdade | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------|
| Experimento | 1 | 2,9 | 2,9 | |
| Linhagem | 6 | 482,9 | 80,5 | 5,7* |
| Exper.x Linhagem | 6 | 84,8 | 14,0 | 4,0** |
| Resíduo | 56 | 197,3 | 3,5 | |
| Total | 69 | 767,1 | | |

* significativo a nível de 5%.

** significativo a nível de 1%.

TABELA 33 Comparação das médias pelo teste de Tukey dos dados da TABELA 32.

| Linhagens | AG (U/ml) | |
|--|-----------|-----|
| $\frac{pab}{1} \frac{fwn}{1}$ | 14,1 | a |
| $\frac{tio}{1} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$ | 13,2 | a |
| $\frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$ | 12,0 | a b |
| $\frac{ebr}{5} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$ | 11,9 | a b |
| $\frac{ebr}{5}$ | 9,9 | b |
| $\frac{tio}{1}$ | 9,1 | b |
| $\frac{pab}{1} \frac{fwn}{1} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3} \quad (1)$ | 5,7 | c |

DMS = 2,9
1%

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

4.12.2. Experimentos 3 e 4.

As TABELAS A3 e A4 do Apêndice de tabelas (Experimento 3 e 4 respectivamente) mostram os resultados obtidos de produção do mutante \underline{mgr}_2 , do parental $\underline{pab}_1 \underline{fwn}_1$, da linhagem $\underline{nic}_1 \underline{olv}_3$ e dos diplóides $\underline{mgr}_2 // \underline{nic}_1 \underline{olv}_3$ e $\underline{pab}_1 \underline{fwn}_1 // \underline{nic}_1 \underline{olv}_3$ (2) (diplóide controle número 2). As análises estatísticas estão nas TABELAS 34 e 35.

Através da TABELA 34 verifica-se que embora haja um efeito significativo de experimento, isto é, embora o comportamento relativo das linhagens varie de um experimento para outro, há diferenças gerais entre linhagens que se sobrepõem as variações entre experimentos, de maneira que se pode indicar linhagens com produção de amiloglicosidase maior ou menor que outras em ambos os experimentos.

Pode-se verificar na TABELA 35 que a produção do mutante \underline{mgr}_2 , parentais e diplóide $\underline{mgr}_2 // \underline{nic}_1 \underline{olv}_3$ não diferem significativamente entre si, sugerindo que a mutação \underline{mgr}_2 não afeta produção. Por outro lado, o diplóide controle número 2, apresenta produção significativamente maior que as linhagens $\underline{nic}_1 \underline{olv}_3$ e \underline{mgr}_2 .

TABELA 34 Análise de variância dos dados dos Experimentos 3 e 4.

| Causa da Variação | Graus de Liberdade | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------|
| Experimentos | 1 | 36,1 | 36,1 | 8,2** |
| Linhagem | 4 | 106,8 | 26,7 | 6,8* |
| Exper.x Linhagem | 4 | 15,8 | 3,9 | |
| Resíduo | 40 | 177,2 | 4,4 | |
| Total | 49 | 335,9 | | |

* significativo a nível de 5%.

** significativo a nível de 1%.

TABELA 35 Comparação das médias pelo teste de Tukey dos dados da TABELA 34.

| linhagens | AG (U/ml) | | |
|---|-----------|---|---|
| $\frac{pab}{1} \frac{fm}{1} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3} (2)$ | 13,3 | a | |
| $\frac{pab}{1} \frac{fm}{1}$ | 12,0 | a | b |
| $\frac{mgr}{2} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$ | 11,7 | a | b |
| $\frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$ | 9,8 | | b |
| $\frac{mgr}{2}$ | 9,4 | | b |

DMS_{1%} = 3,2

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

4.12.3. Experimentos 5 e 6 .

As TABELAS A5 e A6 do Apêndice de tabelas (Experimentos 5 e 6 respectivamente) mostram os resultados obtidos de produção dos mutantes \underline{pur}_1 , \underline{arg}_1 , \underline{lys}_1 , do parental $\underline{pab}_1 \underline{fwn}_1$, da linhagem $\underline{nic}_1 \underline{olv}_3$ e dos diplóides $\underline{pur}_1 // \underline{nic}_1 \underline{olv}_3$, $\underline{pab}_1 \underline{fwn}_1 // \underline{nic}_1 \underline{olv}_3$ (1) e (2) (diplóides controle número 1 e 2). As análises estatísticas estão nas TABELAS 36 e 37.

Através da TABELA 36 verifica-se que embora haja efeito de experimento e interação significativa de linhagens x experimentos, as diferenças entre linhagens se sobrepõem a essas variações.

Assim, pode-se verificar na TABELA 37 que a produção média do mutante \underline{lys}_1 é significativamente menor que as outras linhagens testadas. O diplóide $\underline{lys}_1 // \underline{nic}_1 \underline{olv}_3$ apresenta produção semelhante aos demais diplóides (com exceção do diplóide controle número 1), apenas diferindo ligeiramente da linhagem $\underline{pab}_1 \underline{fwn}_1$ (maior produtora nestes testes). Desta forma pode-se sugerir que a mutação \underline{lys}_1 deve ter efeito pleiotrópico na produção da enzima amiloglicosidase, sendo este complementado no diplóide.

O mutante \underline{arg}_1 (TABELA 37), apresenta média de produção que difere significativamente tanto da parental $\underline{pab}_1 \underline{fwn}_1$ quanto do diplóide $\underline{arg}_1 // \underline{nic}_1 \underline{olv}_3$, sendo que este último tem produção semelhante a do parental $\underline{nic}_1 \underline{olv}_3$ e da linhagem $\underline{pab}_1 \underline{fwn}_1$. Assim, a mutação introduzida parece ter efeito pleiotrópico na produção da enzima, sendo complementada no diplóide.



O mutante pur₁ (TABELA 37) apresenta produção semelhante a do diplóide pur₁//nic₁olv₃, diferindo significativamente, contudo da produção da parental pab₁fwn₁. Este diplóide, no entanto tem produção semelhante a da parental nic₁olv₃ e da linhagem pab₁fwn₁. Pode-se sugerir então, que há uma alteração que afeta ligeiramente a produção de amiloglicosidase do mutante pur₁, e essa alteração é complementada no diplóide pur₁//nic₁olv₃.



CAMP

TABELA 36 Análise de variância dos dados dos Experimentos 5 e 6.

| Causa da Variação | Graus de Liberdade | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|--------|
| Experimento | 1 | 123,4 | 123,4 | 21,6** |
| Linhagem | 9 | 1836,3 | 204,0 | 16,2** |
| Exper.x Linhagem | 9 | 114,0 | 12,6 | 2,2* |
| Resíduo | 80 | 460,6 | 5,7 | |
| Total | 99 | 2534,3 | | |

* significativo a nível de 5%.

** significativo a nível de 1%.

TABELA 37 Comparação das médias pelo teste de Tukey dos dados da TABELA 36.

| Linhagens | AG | (U/ml) |
|--|------|--------|
| $\underline{\text{pab}}_1 \underline{\text{fun}}_1$ | 15,9 | a |
| $\underline{\text{arg}}_1 // \underline{\text{nic}}_1 \underline{\text{olv}}_3$ | 13,5 | a b |
| $\underline{\text{pur}}_1 // \underline{\text{nic}}_1 \underline{\text{olv}}_3$ | 12,4 | a b |
| $\underline{\text{nic}}_1 \underline{\text{olv}}_1$ | 11,7 | a b |
| $\underline{\text{pur}}_1$ | 10,9 | b |
| $\underline{\text{lys}}_1 // \underline{\text{nic}}_1 \underline{\text{olv}}_3$ | 10,3 | b |
| $\underline{\text{pab}}_1 \underline{\text{fun}}_1 // \underline{\text{nic}}_1 \underline{\text{olv}}_3$ (2) | 9,8 | b |
| $\underline{\text{arg}}_1$ | 5,3 | c |
| $\underline{\text{pab}}_1 \underline{\text{fun}}_1 // \underline{\text{nic}}_1 \underline{\text{olv}}_3$ (1) | 5,1 | c |
| $\underline{\text{lys}}_1$ | 0,9 | d |

DMS = 4,0
1%

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

4.12.4. Experimento 7.

A TABELA A7 do Apêndice de Tabelas (Experimento 7) mostra os resultados de produção obtidos para os mutantes met₁, lys₁, arg₁; dos segregantes arg₁lys₁ (segregante número 11 do diplóide arg₁ // lys₁ nic₁), met₁ nic₁ (segregante número 37 do diplóide met₁ // nic₁ olv₃), lys₁ nic₁ (segregante número 46 do diplóide lys₁ // nic₁ olv₃), dos diplóides formados entre eles, parentais pab₁ fwn₁ e nic₁ olv₃ e diplóide controle número 2. As análises estatísticas desses dados estão nas TABELAS 38 e 39.

Através da TABELA 38 verifica-se que apesar das grandes variações de produção ocorridas entre repetições da mesma linhagem, houve diferenças significativas entre linhagens.

Na TABELA 39 pode-se verificar que a produção do mutante lys₁ e do diplóide lys₁ // nic₁ olv₃ ^{NÃO} diferiu significativamente da parental pab₁ fwn₁. O mesmo ocorreu com o mutante met₁ e seu diplóide correspondente met₁ // nic₁ olv₃, sugerindo que estas mutações não afetam significativamente a produção da enzima amiloglicosidase.

Para se fazer análise mitótica entre as marcas arg₁, lys₁ e met₁ foram cruzados o mutante arg₁ e o segregante lys₁ nic₁, e ainda os segregantes arg₁lys₁ e met₁nic₁, sendo também analisada sua produção. Desta maneira pode-se confirmar os resultados obtidos nos Experimentos 3 e 4 quanto as marcas arg₁ e lys₁ e quanto a marca met₁ neste mesmo teste, sendo que os segregantes que tem a marca arg₁ e/ou lys₁ apresentaram produção significativamente inferior à parental, e o que tem a marca met₁ não diferiu.

A produção de todos os diplóides não diferiu entre si, nem da parental pab₁fwn₁. Nota-se, em relação ao diplóide controle número 2, que a sua produção foi mais elevada se comparado aos experimentos anteriores (Experimentos 3; 4; 5 e 6).

4.12.5. Produção de amiloglicosidase das linhagens analisadas

A TABELA 40 mostra a média de produção de amiloglicosidase das linhagens analisadas neste trabalho, e a distribuição de todas as repetições em classes de 1 unidade de AG. Observa-se assim a grande variação de produção tanto inter quanto intra linhagem, podendo-se distinguir bem as aquelas de produção inferior tais como as com marcas arg₁ e lys₁ e o diplóide controle número 1.

TABELA 38 Análise de variância dos dados dos Experimento 7.

| Causa da Variação | Graus de Liberdade | Soma dos Quadrados | Quadrado Medio | F |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|--------|
| Linhagem | 12 | 2589 | 209,1 | 22,9** |
| Resíduo | 52 | 473 | 9,1 | |
| Total | 64 | 2982 | | |

** significativo a nível de 1%.

TABELA 39 Comparação das médias pelo teste de Tukey dos dados da TABELA 38.

| Linhagens | AG (U/ml) | | |
|--|-----------|---|---|
| $\frac{pab}{1} \frac{fun}{1} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$ (2) | 18,5 | a | |
| $\frac{arg}{1} \frac{lys}{1} // \frac{met}{1} \frac{nic}{1}$ | 18,3 | a | |
| $\frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$ | 18,0 | a | |
| $\frac{met}{1}$ | 15,9 | a | b |
| $\frac{met}{1} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$ | 15,0 | a | b |
| $\frac{pab}{1} \frac{fun}{1}$ | 14,9 | a | b |
| $\frac{mys}{1} // \frac{nic}{1} \frac{olv}{3}$ | 14,7 | a | b |
| $\frac{arg}{1} // \frac{lys}{1} \frac{nic}{1}$ | 14,2 | a | b |
| $\frac{met}{1} \frac{nic}{1}$ | 10,4 | b | c |
| $\frac{mys}{1}$ | 9,4 | b | c |
| $\frac{arg}{1}$ | 3,6 | c | d |
| $\frac{lys}{1} \frac{nic}{1}$ | 0,9 | | d |
| $\frac{arg}{1} \frac{lys}{1}$ | 0,3 | | d |

DMS = 7,5
1%

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



UNICAMP

TABELA 40 Produção média de amiloglicosidase (U/ml) dos mutantes, parentais e diplóides e a distribuição das repetições em classes de 1 unidade.

| Linagem | média | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | | | | | |
|---|-------|---|---|--|----|--|--|--|---|--|--|---------------------------------|
| <u>pab fwn</u> ₁ | 15,16 | . | . | . | . | . | 1. 1. 3. 2. 7. 4. 4. 5. 2. 1. 2. 2. . 1. . . | | | | | |
| <u>nic olv</u> ₃ | 12,18 | . | . | . | . | . | 1. 3. 2. 2. 5. 5. 4. 4. 2. 2. 1. . 1. . 2. . . | | | | | |
| <u>tio</u> ₁ | 9,19 | . | . | . | . | 1. 2. . 2. 1. 2. . 1. 1. | | | | | | |
| <u>lys</u> ₁ | 8,92 | 5. 5. | | | | | | | | | | |
| <u>arg</u> ₁ | 4,76 | . | . | 4. 4. 3. 1. 1. . . 1. . 1. | | | | | | | | |
| <u>net</u> ₁ | 15,96 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1. 1. . 1. 2. |
| <u>pur</u> ₁ | 10,97 | . | . | . | . | 1. . . 3. 2. 1. . . . 1. 1. . . . 1. | | | | | | |
| <u>wys</u> ₁ | 9,46 | 1. 1. 1. 2. | | | | | | | | | | |
| <u>ehr</u> ₅ | 9,98 | . | . | . | . | . | 2. 2. 1. . . 2. 1. 1. 1. | | | | | |
| <u>wgr</u> ₂ | 9,45 | . | . | . | . | . | 1. . 3. 3. 2. . . 1. | | | | | |
| <u>arg lys</u> ₁ | 8,37 | 5. | | | | | | | | | | |
| <u>lys nic</u> ₁ | 8,93 | 3. 2. | | | | | | | | | | |
| <u>net nic</u> ₁ | 10,44 | . | . | . | . | . | . | 1. 1. 2. . . 1. | | | | |
| <u>pab fwn</u> // <u>nic olv</u> ₃ (1) | 5,46 | . | . | 1. 4. 2. 6. 3. 4. | | | | | | | | |
| <u>pab fwn</u> // <u>nic olv</u> ₃ (2) | 12,99 | . | . | . | . | . | 1. . 2. 1. 2. 4. 3. 2. 1. 2. 3. . . 1. 1. . 1. . . 1 | | | | | |
| <u>tio</u> // <u>nic olv</u> ₃ | 13,28 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 2. 2. 3. 2. 1. | |
| <u>lys</u> // <u>nic olv</u> ₃ | 9,97 | . | . | . | . | . | 2. . . 2. 2. 1. 3. | | | | | |
| <u>arg</u> // <u>nic olv</u> ₃ | 13,49 | . | . | . | . | . | . | 1. 1. 2. 1. 4. . . . 1. | | | | |
| <u>net</u> // <u>nic olv</u> ₃ | 15,89 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1. 1. . . 3. | |
| <u>pur</u> // <u>nic olv</u> ₃ | 12,38 | . | . | . | . | . | . | 1. . 2. 2. 1. 2. . 1. 1. | | | | |
| <u>wys</u> // <u>nic olv</u> ₃ | 14,75 | . | . | . | . | . | . | . | . | 1. . . . 3. 1. | | |
| <u>ehr</u> // <u>nic olv</u> ₃ | 11,95 | . | . | . | . | . | . | 1. 3. 1. 1. 3. 1. | | | | |
| <u>wgr</u> // <u>nic olv</u> ₃ | 11,75 | . | . | . | . | . | . | . | 3. 1. 1. 1. 3. 1. | | | |
| <u>arg</u> // <u>nic olv</u> ₃ | 14,24 | . | . | . | . | . | . | . | . | 1. . 2. . . 2. | | |
| <u>arg lys</u> // <u>net nic</u> ₁ | 18,38 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1. . 1. 2. . 1. |

5. DISCUSSÃO

5.1. Obtenção de Mutantes

5.1.1. Auxotróficos

O enriquecimento de mutantes auxotróficos por filtração não se mostrou eficaz, resultando em baixa frequência de mutantes ($7,5 \cdot 10^{-4}$), o que deve ter ocorrido devido a de perda de potência da lâmpada de luz Ultra-Violeta usada. Este fato justificaria a ausência de obtenção de mutantes a partir do ensaio número 13, quando foi testado o maior número de colônias (2860 colônias).

OLSON e NIELSEN (1981) também utilizaram filtração e selecionaram 5 mutantes auxotróficos em 997 colônias testadas do Ficomíceto *Allomyces macrogynus*, irradiado com luz Ultra Violeta. BOS (1985) também obteve resultados positivos utilizando filtração para obter mutantes de *Aspergillus niger*.

A baixa frequência de mutantes obtidos com EMS ($2,2 \cdot 10^{-4}$) deve ter sido devido a variação da concentração final do mutagênico nos ensaios, e consequente aumento da porcentagem de sobrevivência dos confídios, pois grande parte das colônias testadas foram provenientes de ensaios com sobrevivência maiores que 15%.

5.1.2. Resistentes

A concentração de 0,5 µg/ml de Verde Malaquita foi suficiente para selecionar mutantes resistentes à concentrações superiores (30 µg/ml), sendo que com 10 µg/ml a linhagem parental sensível não apresenta crescimento. O mutante mgr₂ apresenta redução de crescimento com 35 µg/ml e não cresce com 50 µg/ml. WARR e ROPER (1965), trabalhando com *Aspergillus nidulans*, obtiveram mutante resistente à concentrações de 10 µg/ml de Verde Malaquita em concentrações de 0,27 µg/ml. Foi usada a concentração de 30 µg/ml dessa droga nos testes para análise genética dessa marca.

O Verde Malaquita parece apresentar efeito haploidizante em *Aspergillus niger*, pois foi observada haploidização mesmo em diplóides sem marcas de resistência à droga. AZEVEDO e col. (1977) verificaram efeito semelhante do fungicida Cloroneb em diplóides de *A. nidulans*.

A concentração de 15 µg/ml de Brometo de Etí-dio foi suficiente para selecionar mutantes resistentes à concentrações de 40 µg/ml.

A linhagem pab₁fwn₁ não cresceu em concentrações de 10 µg/ml da droga e o mutante ebr₅ foi capaz de crescer bem até 140 µg/ml. A concentração de 100 µg/ml foi usada nos testes para análises genéticas da marca ebr₅.

5.2. Teste de interação Alélica e Complementação em Diplóides.

A marca de resistência ao Verde Malaquita parece ser recessiva (FIGURA 1), pois o diplóide apresenta resistência muito infe-

rior ao mutante e semelhante a linhagem parental. WARR e ROPER (1965) também obtiveram mutante resistente ao Verde Malaquita em *Aspergillus nidulans* com características recessivas.

A marca de resistência ao Brometo de Etídio parece ser semi-dominante (FIGURA 2), pois o diplóide apresenta resistência inferior à do mutante e superior ao parental pab_1fwn_1 .

AZEVEDO e col. (1977), SCARAZZATTI e col. (1979), BEHARA e GARBER (1980) e BIANCHI e col. (1981) também isolaram mutantes resistentes com características semi-dominantes, respectivamente em *Aspergillus nidulans* para Cloroneb e Brometo de Etídio, *Penicillium italicum* para tiabendazol e *Saccharomyces cerevisiae* para Manganês. Ainda em relação ao Cloroneb, TUYLL (1977), MARTINEZ-ROSSI (1979), GROSSI (1980) e BARACHO (1987) estudaram genes que eles consideraram recessivos.

Todas as marcas auxotróficas estudadas que segregaram parecem ser recessivas pois os diplóides obtidos cresceram em MM. A marca pur_1 não foi recuperada em nenhum segregante obtido de dois diplóides sintetizados entre as linhagens pur_1 e nic_1olv_3 . Assim estes dois diplóides podem ser classificados como do tipo CS II, segundo BONATELLI JR e col. (1983) por não segregarem todas as marcas envolvidas no cruzamento, e os demais diplóides obtidos neste trabalho como do tipo CS I por segregarem todas as marcas.

O fato de não ser recuperadas certas marcas genéticas poderia ser explicado pela ocorrência de crossing-over ou não disjunção mitótica, com perda do alelo mutante estudado, ficando o diplóide em homozigose para o alelo selvagem. Este fato foi comentado por LHOAS (1967) e BOS (1985) como uma possibilidade quando se replica muitas ve-



zes o diplóide antes da haploidização, o que não ocorreu no presente trabalho.

Não foi possível isolar heterocário ou diplóide entre as linhagens nic₃ e nic₁olv₁, o que sugere que nic₃ e nic₁ são alelos, sendo denominados nic A₃ e nic A₁.

5.3. Análises Genéticas

Através das análises mitóticas realizadas pode-se sugerir que os genes mgr₂, ebr₅, tio₁, mys₁, nic₁, olv₃ e fwn₁ devem estar ligados (TABELAS 14, 16, 20 e 22)

Os genes lys₁, arg₁ e met₁ parecem não estar ligados aos demais genes marcadores utilizados (TABELAS 18, 24 e 26), sendo que arg₁ e met₁ parecem estar no mesmo grupo de ligação (TABELAS 28 e 30).

Os desvios da proporção 1:1 de segregantes encontrados principalmente nos cruzamentos que envolveram a marca arg₁ e a marca met₁ em relação a marca olv₃ (segregantes oliva deficientes para arginina ou metionina) não afetaram a determinação dos grupos de ligação pois foram encontrados grande número de segregantes marrons prototróficos que mostraram inequivocamente que aquelas marcas não estão ligadas as de coloração de conídios.

Desvios na proporção 1:1 de segregantes também foram observados por LHOAS (1967) em *Aspergillus niger*, principalmente para a marca leu 3, por PAPA (1982) em *A.flavus*, em relação a marca nor e por HAMLYN e col.(1985) em *Cephalosporium acremonium*, em relação a marca leu.

No presente trabalho também foi verificado uma menor frequência de aparecimento de setores verde oliva em geral, o que concorda com o observado por PONTECORVO e col.(1953 a), BALL e col. (1978) e UMBUZEIRO VALENT (1985).

Através dos dados obtidos de todos os cruzamentos realizados (TABELA 31) pode-se identificar 4 grupos de ligação nessa linhagem designados a seguir:

- I nic A_{1,3} fwn₁ olv₃ mgr₂ ebr₅ tio₁ lys₁
- II pab₁
- III lys₁
- IV arg₁ met₁

A ordem dos genes no grupo I e IV não foi determinada.

5.4. Produção de Amiloglicosidase

As marcas arg₁, lys₁, ebr₅, tio₁, e pur₁ parecem ter efeito pleiotrópico na produção de amiloglicosidase, pois mutantes ou segregantes com estas marcas apresentaram produção significativamente menor que a linhagem parental pab₁fwn₁ (TABELAS 33, 37 e 39). Outra possibilidade seria a existência de uma segunda mutação responsável pela diminuição de produção, como sugerido por MACDONALD (1963) para produção de penicilina em *Penicillium chrysogenum*. Este autor verificou que a baixa produção de mutantes auxotróficos era devido principalmente a efeito pleiotrópico, mas que havia também outro efeito adicional envolvido. No presente trabalho não há evidências suficientes para eliminar quaisquer das duas possibilidades.

CHANG e TERRY (1973) observaram diminuição na produção de amiloglicosidase e ácido cítrico em mutantes de *Aspergillus niger* e *A. foetidus*, BALL e col. (1978) de amiloglicosidase em mutantes de *A. niger* e MACDONALD e col. (1972) de penicilina em mutantes de *A. nidulans*.

De acordo com UMBUZEIRO VALENT (1985) os mutantes arg e lys poderiam ser classificados como de baixa e o mutante tio₁ como de média produção, sendo que os mutantes ebr₅ e pur₁ não apresentaram diminuição de produção nos níveis correspondentes a essa classificação.

As marcas mgr₂, mys₁ e met₁ não parecem ter efeito na produção de amiloglicosidase pois a produção dos segregantes com essas marcas não diferiram significativamente da linhagem parental pab₁fwn₁, nem dos seus respectivos diplóides. Ao contrário da marca met estudada neste trabalho, aquela estudada por BALL e col. (1978), nesta mesma espécie, ocasionou diminuição de produção de amiloglicosidase.

ILCZUK e FIEDUREK (1986) conseguiram selecionar revertentes com produção 40% maior que o prototrófico maior produtor de amiloglicosidase em *Aspergillus niger*, sendo esta uma outra alternativa de melhoramento neste fungo.

Quanto aos diplóides, nenhum dos estudados mostrou produção significativamente maior que a linhagem parental pab₁fwn₁ em todos os experimentos. DAS e ROY (1978) obtiveram um diplóide com produção de ácido cítrico 1,2 vezes maior que a linhagem parental selvagem. CHANG e TERRY (1973), por outro lado, não conseguiram diplóide com maior produção, como no presente trabalho.

Outro aspecto bem evidenciado neste trabalho foi as diferenças significativas de produção entre os diplóides controle número 1 e 2 (TABELA 37). Considerando que os diplóides foram sintetizados entre as mesmas linhagens, através da mesma técnica, a diferença de produção observada não pode ser facilmente explicada. Uma diferença entre eles é que o número 1 foi obtido por volta de tres anos antes do número 2, sendo que antes apresentava produção semelhante à parental $pab_1 fwn_1$ (UMBUZEIRO VALENT, 1985) como o número 2 no presente trabalho. Esse fato poderia ser explicado através de recombinação mitótica gerando cófios com genes em homozigose naquele diplóide, inicialmente heterozigoto e com produção normal. Contudo não se tem nenhuma evidência neste sentido, sendo este um aspecto interessante que poderia ser estudado em trabalhos posteriores.



6. CONCLUSÕES

1- Os mutagênicos usados (luz Ultra-Violeta e EMS) foram eficientes para induzir mutantes auxotróficos e de resistência à drogas.

2- O enriquecimento por filtração não se mostrou eficaz em aumentar a frequência de mutantes provavelmente devido a problemas de diminuição da potência da lâmpada de luz Ultra-Violeta.

3- Só foram isolados mutantes resistentes à Verde Malaquita e Brometo de Etídio após indução com luz Ultra-Violeta e estas mutações se mostraram recessiva e semi-dominante respectivamente, em relação ao alelo selvagem.

4- O Verde Malaquita teve efeito haploidizante em diplóides de *Aspergillus niger*.

5- Os genes arg₁, lys₁, met₁, mys₁ e tio₁ se mostraram recessivos. O gene nic₃ obtido neste trabalho parece ser alelo ao nic₁ obtido por BONATELLI JR e col. (1982) sendo proposta a denominação nic A₃ e nic A₁.

6- Através de análise mitótica foi verificado que as marcas estudadas estão distribuídas em 4 grupos de ligação:

I nic A_{1,3} fwn₁ olv₃ mgr₂ ebr₅ tio₁ mys₁

II pab₁

III lys₁

IV arg₁ met₁

7- Nenhum diplóide ou outra linhagem ensaiada teve produção significativamente maior que a linhagem parental pab₁ fw₁. Os mutantes arg₁ ; lys₁ ; ebc₅ ; tio₁ e pur₁ apresentam redução da produção de amiloglicásidase, e os mutantes mgr₂ , met₁ e mys₁ tem produção semelhante a parental.



7 RESUMO

Este trabalho teve por objetivos a obtenção de mutantes auxotróficos e de resistência à drogas em *Aspergillus niger*, para serem utilizados na análise genética via ciclo parassexual e estabelecimento de novos grupos de ligação numa linhagem industrial utilizada neste laboratório. Além disso, os parentais, diplóides e alguns segregantes destes cruzamentos foram analisados para produção da enzima amiloglicosidase.

As mutações de resistência ao Verde Malaquita e ao Brometo de Etídio se mostraram recessiva e semi-dominante respectivamente, e as auxotróficas *arg*₁, *lys*₁, *met*₁, *mys*₁ e *tio*₁ se mostraram recessivas. O gene *nic*₃ parece ser alelo do gene *nic*₁, sendo portanto denominados *nic* A₃ e *nic* A₁.

Através de análise mitótica foi verificado que as marcas estudadas estão distribuídas em 4 grupos de ligação, sendo que a ordem dos genes nos grupos I e IV não foi determinada:

- I *nic* A_{1,3} *fwn*₁ *olv*₃ *mcr*₂ *ebc*₅ *tio*₁ *mys*₁
- II *pab*₁
- III *lys*₁
- IV *arg*₁ *met*₁

Nenhum dos diplóides ou demais linhagens ensaiadas apresentaram produção significativamente maior que a linhagem parental *pab* *fwn*. Os mutantes *arg*₁, *lys*₁, *ebc*₅, *tio*₁ e *pur*₁ apresentaram redução na produção de amiloglicosidase, e os mutantes *mcr*₂, *met*₁ e *mys*₁ tiveram produção semelhante a parental.

8 SUMMARY

This work had been done aiming the isolation and genetical analysis of auxotrophic and resistant mutants in order to enhance the number of identified linkage groups in a industrial strain. It was also assayed the glucoamylase production of mutants, diploids and parental strains.

The mutations to Ethidium Bromide and Malaquite Green resistance showed to be recessive e semi-dominant respectively, the auxotrophic ones, arg₁, met₁, lys₁, tio₁ and mys₁ showed to be recessive. The gene nic₃ seemed to be allele of nic₁ and were denominated nic A₃ and nic A₁.

It was possible to identify four linkage groups in this work. The gene order in linkage groups I and IV was not determined.

- I nic A_{1,3} fwn₁ olv₃ mgr₂ ebr₅ tio₁ mys₁
- II pab₁
- III lys₁
- IV arg₁ met₁

None of the diploids or any other strain tested showed significant elevated levels of glucoamylase production compared to the parental strain pab₁fwn₁.

Mutants arg₁, lys₁, abr₅, tio₁ and pur₁ had their glucoamylase production reduced and mgr₂, met₁ and mys₁ did not have their yields altered significantly compared to the parental.

9. BIBLIOGRAFIA

- AL-AIDROOS, K., 1980. Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 22: 309-14.
- AMIRKHANIAN, J. D. e J. W. COWAN, 1985. Mapping genes by meiotic and UV-induced mitotic recombination in *Coprinus cinereus*. The Journal of Heredity, 76: 348-54.
- ANDERSON, M. R. e C. S. DEPPE, 1977. Selection for conditional lethals: a general negative selection system for *Schizophyllum commune*. Genetical Research, 29: 93-6.
- ANDERSON, J. B.; D. M. PETSCHKE e A. L. FRANKLIN, 1985. Nuclear DNA content of Benomyl-induced segregants of diploid strains of the phytopathogenic fungus *Armillaria mellea*. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 27: 47-50.
- AZEVEDO, J. L., 1972. O ciclo parassexual em fungos. Revista de Microbiologia, 3: 157-68.
- AZEVEDO, J. L., 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. Summa Phytopatthologica, 2: 3-15.



- AZEVEDO, J. L.; E. P. SANTANA e R. BONATELLI JR., 1977. Resistance and mitotic instability to Chloroneb and 1,4-Oxathiin in *Aspergillus nidulans*. Mutation Research, 48: 163-72.
- AZEVEDO, J. L., 1987. Recombinação em fungos filamentosos. Em: COSTA, S. O. P. ed. Genética Molecular e de Microrganismos. Editora Manole LTDA, São Paulo, p 393-407.
- BAGALHI, E., 1987. Parameliose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP. 124p. (Tese de Mestrado).
- BALL, C., 1971. Haploidization Analysis in *Penicillium chrysogenum*. Journal of General Microbiology, 66: 63-9.
- BALL, C. e P. F. HAMLYN, 1978. The genetics of *Acremonium chrysogenum*. Revista Brasileira de Genética, 1: 83-96.
- BALL, C.; A. J. LAWRENCE; J. M. BUTLER e K. B. MORRISON, 1978. Improvement in amyloglucosidase production following genetic recombination of *Aspergillus niger* strains. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 5: 95-102.
- BANKS, G. T.; F. BINNS e R. L. CUTCLIFFE, 1976. Recent developments in the production and industrial applications of amylolytic enzymes derived from filamentous fungi. Progress in Industrial Microbiology 6: 95-139.

- BARACHO, I. R., 1987. Duonreganta geno ĉe rezistokapablo de *A.nidulans* al Kloronebo. Hodiaŭa Genetiko, 1: 17-28.
- BEADLE, G. W. e E. L. TATUM, 1941. Genetical control of biochemical reactions in *Neurospora*. Proceedings of National Academy of Science, Wash., 27: 499-506.
- BENNETT, J.W., 1979. Aflatoxins and anthraquinones from diploids of *Aspergillus parasiticus*. Journal of General Microbiology, 113: 127-36.
- BERAHA, L. e E. D. GARBER, 1966. Genetics of phytopathogenic fungi. XV. A genetic study of resistance to sodium orthophenylphenate and sodium dehydroacetate in *Penicillium expansum*. American Journal of Botany, 53: 1041-47.
- BERAHA, L. e E. D. GARBER, 1980. A genetic study of resistance to thlabendazole and sodium o-phenylphenate in *Penicillium italicum* by the parasexual cycle. Botanical Gazette, 141: 204-9.
- BIANCHI, M. E.; M. L. CARBONE; G. LUCCHINI e G.E. MAGNI, 1981. Mutants resistant to manganese in *Saccharomyces cerevisiae*. Current Genetics, 4: 215-20.
- BONATELLI JR., R., 1981. Parasexualidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, ESALQ/USP. 91p (Tese de Mestrado).

- BONATELLI JR., R. e J. L. AZEVEDO, 1982. Improved reproducibility of citric acid production in *Aspergillus niger*. Biotechnology Letters, 4: 761-66.
- BONATELLI JR., R.; J. L. AZEVEDO e G. U. VALENT, 1982. Citric acid production by *Aspergillus niger* mutants. Revista Brasileira de Genética, 5: 483-92.
- BONATELLI JR., R.; J. L. AZEVEDO e G. U. VALENT, 1983. Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. Revista Brasileira de Genética, 6: 399-405.
- BONATELLI JR., R.; G. U. VALENT; M. MASIERO; A. VIALTA e M. R. CALIL, 1984. Genetics of amyloglucosidase production in *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori*. In: Japan-Brazil Symposium on Science and Technology, 4. Rio de Janeiro. v.2, p.34-41.
- BOS, C. J., 1985. Induced mutation and somatic recombination as tools for genetic analysis and breeding of imperfect fungi. Wageningen, Agricultural University Wageningen. 156p (Tese de Doutorado).
- BOS, C. J., 1987. Mutant collection and master strains of *Aspergillus niger*. Fungal Genetics Newsletter, 34: 27.
- BRADSHAW, R. E., J. W. BENNETT e J. F. PEBERDY, 1983. Parasexual analysis of *Aspergillus parasiticus*. Journal of General Microbiology, 129: 2117-23.

CATCHESIDE, D. G., 1954. Isolation of nutritional mutants of *Neurospora crassa* by filtration enrichment. Journal of General Microbiology, 11: 34-6.

CATEN, C. E. e J. L. JINKS, 1966. Heterokaryosis: Its significance in wild homothallic ascomycetes and fungi imperfect. Transactions of the British Mycological Society, 49: 81-93.

CATEN, C. E., 1981. Parasexual processes in fungi. In: GULL, K. e S. G. OLIVER ed. The Fungal Nucleus. Cambridge University Press, p 291-214.

CHANG, L. T. e C. A. TERRY, 1973. Intergenic complementation of glucoamylase and citric acid production in two species of *Aspergillus*. Applied Microbiology, 25: 890-95.

COOLEY, R. N.; H. R. HASLOCK e A. B. TOMSETT, 1986. Isolation and characterization of cadmium-resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. Current Microbiology, 13: 265-68.

DAS, A e P. ROY, 1978. Improved production of citric acid by a diploid strain of *Aspergillus niger*. Canadian Journal of Microbiology, 24: 622-25.

DAY, P. R. e G. E. ANDERSON, 1961. Two linkage groups in *Coprinus lagopus*. Genetical Research, 2: 414-23.

- DIXON, M. e E. C. WEBB, 1962. Enzymes. London, Longmans. 193p.
- EDWARDS, G. F. StL.; G. HOLT e K. D. MACDONALD, 1974. Mutants of *Aspergillus nidulans* impaired in penicillin biosynthesis. Journal of General Microbiology, 84: 420-22.
- FIEDUREK, J., 1983. Pectinase synthesis by auxotrophic mutants of *Aspergillus niger* in a submerged culture. Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Sect.C, 37, 181-94.
- FINCH, P. e P. A. LEONARD, 1978. Comparative studies on glucoamylases isolated from a strain of *Aspergillus*. Starch, 30: 341-45.
- FLEMING, I. D. e B. A. STONE, 1965. Fractionation of *Aspergillus niger* amylo-glucosidase. The Biochemical Journal, 97: 13.
- FRIES, N., 1947. Experiments with different methods of isolating physiological mutations of filamentous fungi. Nature, 159: 199.
- FRIES, N., 1948a. Spontaneous physiological mutations in *Ophiostoma*. Hereditas, 34: 338-50.
- FRIES, N., 1948b. Viability and resistance of spontaneous mutations in *Ophiostoma* representing different degrees of heterotrophy. Physiological Planter, 1: 330-41.

- FUNGARO, M. H. P., 1984. Caracterização genética e dados citológicos em *Aspergillus niger* Van Tieghen e *Aspergillus awamori* Nakazawa. Piracicaba, ESALQ/USP. 134p. (Tese de Mestrado).
- GRIGOROV, V. S.; N. A. ZHEREBTSOV e V. V. SHCHEGOLEV, 1986. Ploidy determination in *Rhizopus pygmaeus* mutants and their glucoamylase biosynthesis at different temperatures. *Mikrobiologiya*, 55: 431-34.
- GROSSI, C., 1980. Aspectos genéticos da resistência ao Cloroneb em uma linhagem de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 140p (Tese de Mestrado).
- HAMLYN, P. F.; J. A. BIRKETT; G. PEREZ e J. F. PEBERDY, 1985. Protoplast fusion as a tool for genetic analysis in *Cephalosporium acremonium*. *Journal of General Microbiology*, 131: 2813-23.
- HASTIE, A. C., 1970. Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, 226: 771.
- HEAGY, F. C. e J. A. ROPER, 1952. Deoxyribonucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus* conidia. *Nature*, 170: 713.
- HOLLIDAY, R., 1961. Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genetical Research*, 2: 231-48.

HOLT, G., G. F. StL. EDWARDS e K. D. MACDONALD, 1976. The genetics of mutants impaired in the biosynthesis of penicillin. In: MACDONALD, K. D. ed. Proceedings of the International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, 2. New York, Academic. p.199-211.

ILCZUK, Z., 1970. Genetics of citric acid producing strains of *Aspergillus niger*. II. Citric acid synthesis by auxotrophic mutants of *A.niger* induced with UV. *Nahrung*, 14: 97-105.

ILCZUK, Z. e J. FIEDUREK, 1985. Amylase synthesis by forced heterocaryons of *Aspergillus niger* in submerged culture conditions. *Starch*, 37: 62-6.

ILCZUK, Z. e J. FIEDUREK, 1986. Effect of the reversion of *Aspergillus niger* auxotrophic mutants to prototrophic forms on their glucoamylolytic activity. *Starch*, 38: 281-84.

ISHITANI, C. e K. SAKAGUCHI, 1956. Hereditary variation and genetic recombination in Koji-moulds (*Aspergillus oryzae* and *A.sojae*).V. Heterocaryosis. Journal of General and Applied Microbiology, 2: 345-400.

ISHITANI, C.; Y. IKEDA e K. SAKAGUCHI, 1956. Hereditary variation and genetic recombination in Koji-moulds (*Aspergillus oryzae* and *A.sojae*). VI. Genetic recombination in heterozygous diploids. Journal of Applied Microbiology, 2: 401-30.

IVANOVA, V. V. e L. I. EROKHINA, 1983. Use of catabolite repression in the selection of the glucoamylase producer *Aspergillus niger*. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya, 19: 844-50.

JOHANNSEN, E.; L. EAGLE e G. BREDENHANN, 1985. Protoplast fusion used for the construction of presumptive polyploids of the D-xylose fermenting yeast *Candida shehatae*. Current Genetics, 9: 313-19.

KÄFER, E., 1960. High frequency of spontaneous and induced genetic segregation. Nature, 186: 619-20.

KÄFER, E., 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. Genetics, 46: 1581-609.

KERR, R. W.; F. C. CLEVELAND e W. J. KATZBECK, 1951. The action of amylo-glucosidase on amylose and amilopectin. Journal of the American Chemical Society, 73: 3916-21.

KUNDU, P. N. e A. DAS, 1985. A note on crossing experiments with *Aspergillus niger* for the production of calcium gluconate. Journal of Applied Bacteriology, 59: 1-5.

KVESITADZE, G. I.; L. L. KVACHADZE; M. D. PAVLENISHVILI e V. V. KORIDZE, 1981. Selection of microscopic fungi producing acid-stable amylase and glucoamylase. Microbiology, 50: 598-606.

- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with para-fluorophenylalanine. Nature, 190, 744.
- LHOAS, P., 1967. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in *Aspergillus niger*. Genetical Research, 10: 45-61.
- MACDONALD, K. D.; J. M. HUTCHINSON e W. A. GILLET, 1963. Isolation of auxotrophs of *Penicillium chrysogenum* and their penicillin yields, 1963. Journal of General Microbiology, 33: 365-74.
- MACDONALD, K. D., 1972. Genetics of penicillin production in *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans*. In: VANEK, Z.; Z. HOSTALEK e J. CUDLIN, ed. Genetics of Industrial Microorganisms. Amsterdam, Elsevier. v.1, p.255-264.
- MACDONALD, K. D.; HOLT e P. DITCHBURN, 1972. The genetics of penicillin production. Proc. IV. IFS: Fermentation Technology Today. p. 251-57.
- MAKINS, J. F.; G. HOLT e K. D. MACDONALD, 1983. The genetic location of three mutations impairing penicillin production in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 129: 3027-33.
- MANJUNATH, P. e M. R. R. RAO, 1980. Immunochemical relationship between glucoamylases I and II of *Aspergillus niger*. Journal of Bioscience, 2: 163-69.

- MARTINEZ-ROSSI, N. M., 1979. Mutantes resistentes ao fungicida Cloroneb em *Aspergillus nidulans* (Eldam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP, 104p (Tese de Mestrado).
- MESSIAS, C. L. e J. L. AZEVEDO, 1980. Parasexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. Transactions of the British Mycological Society, 75: 473-77.
- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregation induced by p-fluorophenylalanine. Aspergillus News Letter, 2: 10.
- MORRISSEY, J. H. e W. F. LOOMIS, 1981. Parasexual genetic analysis of cell proportioning mutants of *Dictyostelium discoideum*. Genetics, 99: 183-96.
- NEVALAINEN, K. M. H. e E. T. PALVA, 1979. Improvement of amyloglucosidase production of *Aspergillus awamori* by mutagenic treatments. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 29: 390-95.
- NORMANSELL, P. J. M.; I. D. NORMANSELL e G. HOLT, 1979. Genetic and Biochemical studies of mutants of *Penicillium chrysogenum* impaired in penicillin production. Journal of General Microbiology, 112: 113-26.
- OLSON, L. W. e T. A. B. NIELSEN, 1981. Isolation of auxotrophic mutants of *Allomyces macrogynus*. Mycologia, 73: 493-99.



- PAPA, K. E., 1973. The parasexual cycle in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 65: 1201-5.
- PAPA, K. E., 1976. Linkage groups in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 68: 159-65.
- PAPA, K. E., 1978. The parasexual cycle in *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, 70: 766-73.
- PAPA, K. E., 1980. Dominant aflatoxin mutant of *Aspergillus flavus*. *Journal of General Microbiology*, 118: 279-82.
- PAPA, K. E., 1982. Norsolorinic acid mutant of *Aspergillus flavus*. *Journal of General Microbiology*, 128: 1345-48.
- PAPA, K. E., 1984. Genetics of *Aspergillus flavus*: linkage of aflatoxin mutants. *Canadian Journal of Microbiology*, 30: 68-73.
- PARK, Y. K. e R. S. PAPINI, 1970. Produção de xarope de glicose do amilo de mandioca pelo método enzima-enzima. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 1: 13-16.
- PARK, Y. K. e M. S. S. DE SANTI, 1977. Induction of high amyloglicosidase-producing mutant from *Aspergillus awamori*. *Journal of Fermentation Technology*, 55: 193-95.

PAZUR, J.H. e T. ANDO, 1959. The action of an amyloglucosidase of *Aspergillus niger* on starch and malto-oligosaccharides. The Journal of Biological Chemistry, 234: 1966-70.

PAZUR, J. H. e K. KLEPPE, 1962. The hidrolisis of L-D-glucosides by amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. The Journal of Biological Chemistry, 237: 1002-6.

PIMENTEL GOMES, F. P., 1966. Curso de Estatística Experimental. Gráfica Benetti, São Paulo. 430p.

PONTECORVO, G. e J. A. ROPER, 1952. Genetic analysis without sexual reproduction by means of poliploidy in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 6: vii.

PONTECORVO, G.; J. A. ROPER e E. FORBES, 1953a. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. Journal of General Microbiology, 8: 198-210.

PONTECORVO, G.; J. A. ROPER; L. M. HEMMONS; K. D. MACDONALD e A. W. J. BUFTON, 1953b. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, 5: 141-238.

PONTECORVO, G., 1956. The parasexual cycle in fungi. Annual Review of Microbiology, 10: 393-400.

PONTECORVO, G., 1958. Trends in Genetic Analysis. Columbia University Press, New York. 145p.

- PONTECORVO, G. e E. KAUFER, 1958. Genetic analysis based on mitotic recombination. Advances in Genetics, 9: 71-104.
- RAMANESH, N.; K. R. SREEKANTIAH e V. S. MURTHY, 1982. Studies of two forms of amyloglicosidase of *Aspergillus niger* Van Tieghen. Starch, 34: 346-51
- RAPER, K. B. e D. I. FENNELL, 1965. The Genus Aspergillus. Baltimore, Williams e Wilkins. 686p.
- ROPER, J. A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. Experimentia, 8: 14-15.
- ROPER, J. A. e R. H. PRITCHARD, 1955. Recovery of the complementary products of mitotic crossing-over. Nature, 175: 639.
- ROSIM, R. T.; O. GARCIA JR. e I. R. BARACHO, 1978. Tamanho de conídios e núcleos em linhagens haplóides e diplóides de *Aspergillus niger*. Ciência e Cultura, 30: 487-92.
- SCARAZZATTI, M. E.; R. BONATELLI JR. e J. L. AZEVEDO, 1979. Resistance to Ethidium Bromide in *Aspergillus nidulans*. Experimentia (Basel), 35: 307-8.
- SERMONTI, G., 1956. Complementary genes which affect penicillin yields. Journal of General Microbiology, 15: 599-608.

SHCHERBAKOVA, E. Y.; M. N. REZVAYA, E. B. L'VOVA e Y. R. MOVCHAN, 1978. Cell morphology, distribution of nuclei and DNA contents of haploid and diploid strains of *Aspergillus niger*. *Mikrobiologiya*, 47: 91-6.

SILVEIRA, W. D. e J. L. AZEVEDO, 1984. Isolation of auxotrophic mutants of *Metarhizium anisopliae* by the filtration enrichment technique. *Revista Brasileira de Genética*, 7: 1-8.

SINKAR, V. P. e N. F. LEWIS, 1982. Glucoamylase production by a newly isolated strain of *Aspergillus niger*. *Journal of Food Protection*, 45: 586-89.

SMITH, J. E. e J. A. PATEMAN, Eds., 1977. *Genetics and Physiology of Aspergillus*. London, Academic Press, Inc. Ltd. 522p.

STERN, C., 1936. Somatic crossing-over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 21: 625-730.

STROMNAES, O.; E. D. GARDER e L. BERAHA, 1964. Genetics of phytopathogenic fungi. IX. Heterocaryosis and the parasexual cycle in *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Canadian Journal of Botany*, 42: 423-27.

SVENSSON, B.; T. G. PEDERSEN; I. SVENDSEN; T. SAKAI e M. OTTESEN, 1982. Characterization of two forms of G.A. from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Research Communications*, 47: 55-9.

TINLINE, R. D., 1961. *Cochliobolus sativus*. IV. Drug-resistant, color, and nutritionally exating mutants. Canadian Journal of Botany, 39: 1695-704.

TINLINE, R. D., 1962. *Cochliobolus sativus*. V. Heterocaryosis and parasexuality. Canadian Journal of Botany, 40: 425-37.

TINLINE, R. D. e B. H. MACNEILL, 1969. Parasexuality in plant pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology, 7: 147-70.

TUYLL, J. M. van, 1977. Genetics of Fungal Resistance to Systemic Fungicides. Netherland, Mededelingen Landbouwhogeshool Wageningen. 136p.

UMBUZEIRO VALENT, G., 1985. Isolamento e análise genética de mutantes com alteração na produção de amiloglicosidase em *Aspergillus niger*. Campinas. UNICAMP. 113p. (Tese de Mestrado).

UPSHALL, A.; B. GIDDINGS e I. D. MORTIMORE, 1977. The use of Benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*. Journal of General Microbiology, 100: 413-18.

VIALTA, A., 1987. Genética e produção de amiloglicosidase em *Aspergillus awamori* e no híbrido interepecífico com *Aspergillus niger*. Campinas. UNICAMP. 173p. (Tese de Mestrado).

YAMASHITA, I. e S. FUKUI, 1984a. Genetic background of glucoamylase production in the yeast *Saccharomyces*. Agricultural and Biological Chemistry, 48: 137-41.

YAMASHITA, I. E S. FUKUI, 1984b. Isolation of glucoamylase-non-producing mutants in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. Agricultural and Biological Chemistry, 48: 131-35.

WARR, J. R. e J. A. ROPER, 1965. Resistance to various inhibitors in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 40: 273-81.

WHELAN, W. L. e D. R. SOLL, 1982. Mitotic recombination in *Candida albicans*: recessive lethal alleles linked to a gene required for methionine biosynthesis. Molecular General Genetics, 187: 477-85.

WHELAN, W. L. e D. MARKIE, 1985. UV-induced instability in *Candida albicans* hybrids. Current Genetics, 9: 175-77.

APENDICE

TABELA A1 Produção de AG de mutantes, parentais e diplóides.

| Linhagem | REPETIÇÕES (U/ml) | | | | |
|--|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| | I | II | III | IV | V |
| <u>pab fwn</u> ₁ <u>1</u> | 15,86 | 12,33 | 15,04 | 16,76 | 13,07 |
| <u>nic olv</u> ₁ <u>3</u> | 10,47 | 14,99 | 13,41 | 15,04 | 11,94 |
| <u>ebr</u> ₅ | 6,60 | 6,88 | 7,88 | 11,64 | 7,42 |
| <u>tio</u> ₁ | 5,47 | 8,38 | 10,01 | 9,15 | 6,76 |
| <u>pab fwn</u> ₁ <u>1</u> // <u>nic olv</u> ₁ <u>3</u> (1) | 5,40 | 4,80 | 2,75 | 5,33 | 5,80 |
| <u>ebr</u> ₅ // <u>nic olv</u> ₁ <u>3</u> | 13,00 | 12,27 | 13,36 | 10,30 | 11,24 |
| <u>tio</u> ₁ // <u>nic olv</u> ₁ <u>3</u> | 13,35 | 14,94 | 13,00 | 14,95 | 15,33 |

TABELA A2 Produção de AG de mutantes, parentais e diplóides

| Linhagens | REPETIÇÕES (U/ml) | | | | |
|--|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| | I | II | III | IV | V |
| <u>pab fwn</u> ₁ <u>1</u> | 10,65 | 18,19 | 14,62 | 13,07 | 11,96 |
| <u>nic olv</u> ₁ <u>3</u> | 11,63 | 10,65 | 12,33 | 11,30 | 8,80 |
| <u>ebr</u> ₅ | 14,20 | 13,06 | 11,63 | 12,33 | 8,23 |
| <u>tio</u> ₁ | 8,19 | 13,79 | 10,63 | 12,68 | 6,90 |
| <u>pab fwn</u> ₁ <u>1</u> // <u>nic olv</u> ₁ <u>3</u> (1) | 6,94 | 5,97 | 7,49 | 7,22 | 6,47 |
| <u>ebr</u> ₅ // <u>nic olv</u> ₁ <u>3</u> | 9,97 | 10,29 | 13,68 | 14,84 | 10,58 |
| <u>tio</u> ₁ // <u>nic olv</u> ₁ <u>3</u> | 12,57 | 13,32 | 11,23 | 12,94 | 11,22 |

TABELA A3 Produção de AG de mutantes, parentais e diplóides

| Linhagens | REPETIÇÕES (U/ml) | | | | |
|--|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| | I | II | III | IV | V |
| <u>pab fwn</u> ₁ <u>1</u> | 14,62 | 14,20 | 10,32 | 13,35 | 8,23 |
| <u>nic olv</u> ₁ <u>3</u> | 13,43 | 14,21 | 9,83 | 7,39 | 10,31 |
| <u>wgr</u> ₂ | 13,43 | 10,64 | 9,08 | 6,58 | 8,51 |
| <u>pab fwn</u> ₁ <u>1</u> // <u>nic olv</u> ₁ <u>3</u> (2) | 14,14 | 14,54 | 19,63 | 15,31 | 10,90 |
| <u>wgr</u> ₂ // <u>nic olv</u> ₁ <u>3</u> | 9,65 | 13,36 | 14,55 | 13,36 | 13,35 |

TABELA A4 Produção de AG de mutantes, parentais e diplóides

| Linhagens | REPETIÇÕES (U/ml) | | | | |
|--|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| | I | II | III | IV | V |
| <u>pab fwn</u> ₁ <u>1</u> | 12,22 | 12,26 | 12,99 | 12,28 | 9,63 |
| <u>nic olv</u> ₁ <u>3</u> | 7,91 | 7,91 | 9,04 | 11,22 | 6,86 |
| <u>wgr</u> ₂ | 10,29 | 8,46 | 9,96 | 8,49 | 9,06 |
| <u>pab fwn</u> ₁ <u>1</u> // <u>nic olv</u> ₁ <u>3</u> (2) | 11,61 | 10,88 | 12,67 | 11,27 | 12,66 |
| <u>wgr</u> ₂ // <u>nic olv</u> ₁ <u>3</u> | 9,58 | 10,70 | 9,02 | 12,29 | 11,62 |

TABELA A5 Produção de AG de mutantes, parentais e diplóides

| Linhagens | REPETIÇÕES (U/ml) | | | | |
|--|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| | I | II | III | IV | V |
| <u>pab</u> <u>fmn</u> ₁ | 12,96 | 12,96 | 15,31 | 10,00 | 14,50 |
| <u>nic</u> <u>olv</u> ₃ | 12,96 | 12,61 | 13,34 | 10,30 | 11,23 |
| <u>pur</u> ₁ | 8,72 | 9,04 | 8,20 | 8,52 | 5,79 |
| <u>arg</u> ₁ | 6,40 | 9,80 | 5,97 | 2,34 | 2,96 |
| <u>lys</u> ₁ | 1,06 | 0,67 | 0,61 | 0,59 | 0,36 |
| <u>pab</u> <u>fmn</u> // <u>nic</u> <u>olv</u> (1) | 5,33 | 3,61 | 3,59 | 3,60 | 3,35 |
| <u>pab</u> <u>fmn</u> // <u>nic</u> <u>olv</u> (2) | 7,49 | 8,83 | 5,76 | 10,86 | 10,58 |
| <u>pur</u> // <u>nic</u> <u>olv</u> ₃ | 15,25 | 13,67 | 11,56 | 11,22 | 8,58 |
| <u>arg</u> // <u>nic</u> <u>olv</u> ₃ | 11,55 | 16,56 | 8,62 | 12,93 | 9,98 |
| <u>lys</u> // <u>nic</u> <u>olv</u> ₃ | 9,68 | 11,22 | 6,74 | 6,96 | 9,69 |

TABELA A6 Produção de AG de mutantes, parentais e diplóides

| Linhagens | REPETIÇÕES (U/ml) | | | | |
|---|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| | I | II | III | IV | V |
| <u>pab</u> ₁ <u>fw</u> ₁ | 19,51 | 15,67 | 17,01 | 19,51 | 21,81 |
| <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | 10,88 | 13,31 | 8,80 | 11,55 | 12,56 |
| <u>pur</u> ₁ | 19,51 | 10,26 | 15,66 | 9,64 | 14,40 |
| <u>arg</u> ₁ | 4,05 | 3,18 | 3,69 | 11,54 | 3,36 |
| <u>lys</u> ₁ | 1,05 | 0,99 | 1,35 | 1,43 | 1,12 |
| <u>pab</u> ₁ <u>fw</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ (1) | 4,04 | 7,99 | 6,53 | 7,14 | 5,80 |
| <u>pab</u> ₁ <u>fw</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ (2) | 15,67 | 9,69 | 11,89 | 7,73 | 9,98 |
| <u>pur</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | 16,11 | 13,69 | 10,28 | 12,89 | 10,59 |
| <u>arg</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | 16,11 | 20,06 | 16,56 | 12,22 | 10,29 |
| <u>lys</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | 12,23 | 12,56 | 12,55 | 10,56 | 10,58 |

TABELA A7 Produção de AG de mutantes, parentais e diplóides

| Linhagens | REPETIÇÕES (U/ml) | | | | |
|---|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| | I | II | III | IV | V |
| <u>pab</u> ₁ <u>fw</u> ₁ | 11,63 | 15,05 | 13,06 | 16,24 | 18,72 |
| <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | 15,11 | 20,32 | 16,30 | 20,32 | 18,18 |
| <u>lys</u> ₁ | 15,43 | 14,52 | 1,42 | 15,38 | 0,58 |
| <u>arg</u> ₁ | 2,61 | 3,83 | 4,53 | 4,40 | 2,83 |
| <u>lys</u> ₁ <u>nic</u> ₁ | 1,01 | 0,80 | 0,90 | 1,00 | 0,93 |
| <u>met</u> ₁ <u>nic</u> ₁ | 10,59 | 8,12 | 10,25 | 13,37 | 9,87 |
| <u>arg</u> ₁ <u>lys</u> ₁ | 0,82 | 0,26 | 0,12 | 0,12 | 0,53 |
| <u>met</u> ₁ | 13,12 | 14,35 | 16,52 | 17,92 | 17,92 |
| <u>lys</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | 11,32 | 16,51 | 15,17 | 15,16 | 15,62 |
| <u>arg</u> ₁ // <u>lys</u> ₁ <u>nic</u> ₁ | 13,12 | 13,93 | 16,16 | 16,97 | 11,05 |
| <u>arg</u> ₁ <u>lys</u> ₁ // <u>met</u> ₁ <u>nic</u> ₁ | 18,41 | 18,91 | 21,11 | 15,15 | 17,91 |
| <u>met</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ | 16,07 | 16,52 | 16,97 | 12,77 | 13,12 |
| <u>pab</u> ₁ <u>fw</u> ₁ // <u>nic</u> ₁ <u>olv</u> ₃ (2) | 15,15 | 21,11 | 24,22 | 18,41 | 13,95 |