

BC/26993
IB/80428



UNICAMP

T/UNICAMP


C128_c

Campinas, 04 de Dezembro de 1995.

BANCA EXAMINADORA:

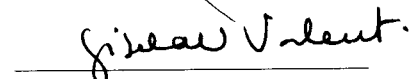
TITULARES:

Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO (Orientador)



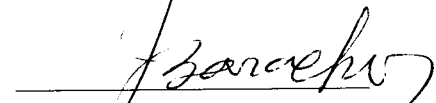
Assinatura

Dra. GISELA UMBUZEIRO VALENT




Assinatura

Prof. Dr. IVANHOÉ RODRIGUES BARACHO




Assinatura

Prof. Dr. WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA



Assinatura

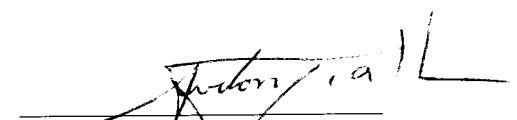
Prof. Dra. ALINE PIZZIRANI-KLEINER



Assinatura


SUPLENTE:

Dr. AIRTON VIALTA



Assinatura

Prof. Dr. PEDRO MAGALHÃES LACAVAL



Assinatura

APROVADA


COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE LIGAÇÃO DE
DUAS LINHAGENS DE *Aspergillus niger* (Van Tieghem).

Maria Regina Calil

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

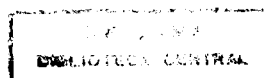
Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Doutor em
Ciências, área de Genética.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Maria Regina Calil
e aprovada pela Comissão Julgadora.

04/12/95


Campinas - SP

1995





UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	CLC
V	5
T.M.C.	20993
PR.	00796
C	D <input checked="" type="checkbox"/>
FEEL	R\$ 17,00
DATA	12/3/96
N.º CPD	

C4-00084573-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Caill, Maria Regina
C128c Comparação entre os grupos de ligação de duas
linhagens de *Aspergillus niger* (Van Tieghem) / Maria
Regina Caill. -- Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador : João Lúcio de Azevedo.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. *Aspergillus*. 2. Mapeamento cromossômico.
3. Fungos - Protoplastos. I. Azevedo, João Lúcio de.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

À
Meus pais, Simão e Vilma,
Minhas irmãs, Simone e Eliane
Meu cunhado, Ari Nelson

Dedico

Aos sobrinhos,
Maria Leticia, Maria Regina,
Rafael e Larissa,

Com amor

AGRADECIMENTOS

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

- Ao Prof. Dr. Renato Bonatelli Junior (*in memoriam*), pela seriedade e competência com que orientou parte deste doutorado, além do estímulo e amizade dedicada durante a nossa convivência.
- Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela atenção, amizade, estímulo e continuidade na orientação, elementos de fundamental importância para o êxito deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Ivanhoé Rodrigues Baracho, pelo interesse e pelas valiosas discussões e sugestões apresentadas na análise prévia desta tese. Seu estímulo constante e a sua amizade são de valor inestimável.
- À Dra. Gisela Umbuzeiro Valent, pelas sugestões apresentadas durante a análise prévia desta tese, que muito enriqueceram este trabalho. Seu estímulo e amizade sincera, muito contribuíram para minha formação científica e pessoal.
- Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira pela atenção dispensada à leitura prévia desta tese, pelas sugestões apresentadas, pelo apoio e agradável convivência.
- Ao Dr. Alfons Debets e Dr. Cees Bos, pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho no Departamento de Genética da "Wageningen Agricultural University", Wageningen, Holanda, e a todas as pessoas do departamento, pelas facilidades concedidas.
- A todos os amigos que tive a oportunidade e felicidade de conviver em Wageningen. Não citarei nomes para não incorrer do erro de algum lastimável esquecimento. Tenho certeza que cada um deles sabe o quanto foram e ainda são importantes para mim.
- À meus pais, Simão e Vilma, que sempre me apoiaram, possibilitaram meus estudos e, principalmente, pelo amor incondicional.
- Às minhas irmãs, Simone e Eliane, meus sobrinhos, Maria Leticia, Maria Regina, Rafael e Larissa e meus cunhados, Ari e Carlos, pela força e carinho que me deram durante todo o trabalho.
- Aos sempre amigos, Nádia, Mário, Olair, Wagner e Mauricio, pelo apoio, desprendimento e companheirismo fraterno.

- Às amigas, Cláudia, Norma e Elãene, pelo carinho, apoio, confiança e amizade sincera.
- Às amigas distantes "geograficamente", Márcia, Ana Maria, Lane, Miriam e Maria Silvia, pela força e constante interesse em todos os sentidos.
- Aos colegas do curso de pós-graduação do Departamento de Genética e Evolução, e, em especial, Ingrid, Alfredo, Gisa, Juverlande, Marta, Maria, Cristina, Airton e Rachel pelas sugestões apresentadas na elaboração desta tese, pela paciência nos momentos de tensão e incentivos constantes .
- As facilidades e atenções concedidas pelos professores, alunos e o funcionário "Zezo", do Laboratório de Genética da Escola Superior "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), Piracicaba - SP, em especial à Maria Helena e Marisa, pelas sugestões, disponibilidade e estímulo na execução de alguns experimentos.
- Às secretárias, Célia e Ana Rita, do Departamento de Genética e Evolução, Teresinha e a ex-secretária Silvia, da SCPG-Genética e Silvia da SCPG/IB pela disponibilidade, amizade e facilidades concedidas.
- Aos meus tios Amélia, Suria, Mari, Hélio e Luiza, minha madrinha Edith, vovó Zulmira e todos os primos queridos que sempre me acompanharam e me estimularam para a realização deste trabalho.
- Pela amizade e carinho de D. Gladys, Teresa, Lourdes Pedrina, Zilda, Fatinha, Rosana, Drauzio, Vitor e todos os colegas portofelicenses.
- Ao Prof. Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena, por seu constante bom humor e agradável convivência.
- À Prof. Dra. Christine Hackel, atual coordenadora do curso de pós-graduação do Departamento de Genética e Evolução, pelo apoio e colaboração.
- A todos os funcionários do Departamento de Genética e Evolução -IB - UNICAMP, pela agradável convivência.
- À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela concessão da bolsa de Monitoria e ao CNPq e programa RHAIE pela concessão das bolsas de doutorado e treinamento no exterior.
- A ausência de citação nominal não significa esquecimento da demonstração de carinho e colaboração prestada. A todos que me premiam com amizade e amor, a minha profunda gratidão.

ÍNDICE

	pag.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. O fungo <i>Aspergillus niger</i>	3
2.2. Recombinação parassexual em fungos	4
2.3. Modelos de recombinação	8
2.4. Análise genética baseada em recombinação mitótica	10
2.5. Determinação da ordem do gene	14
2.6. Problemas inerentes à análise genética classica	16
2.7. Eletroforese em gel de campo pulsado	18
2.8. Preparação de protoplastos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Microrganismos utilizados	25
3.2. Meios de Cultura	27
3.2.1. Meio Mínimo	27
3.2.2. Meio Completo	28
3.2.3. Meio Mínimo líquido mais 4% de Meio Completo	28
3.2.4. Meio para produção de micélio	28
3.3. Soluções	29
3.3.1. Solução de Tween 80 (0,1%)	29
3.3.2. Solução Salina (0,85%)	29
3.3.3. Solução de Vitaminas	29
3.3.4. Solução de Benlate	30
3.3.5. Solução lisol 10%	30
3.3.6. Suplementos adicionados aos Meios de Cultura	30
3.3.7. Tampão fosfato 0,2M (pH 5,8)	30
3.3.8. Solução de KCl 1,2 M	31
3.3.9. Solução de KCl 0,9M	31
3.3.10. Solução de KCl 0,6 M	31
3.3.11. Solução MgSO ₄ 1,2 M	31
3.3.12. Solução MgSO ₄ 1,0 M	32

	pag.
3.3.13. Solução MgSO ₄ 0,5 M	32
3.3.14. Solução sacarose 1,2 M	32
3.3.15. Solução sacarose 1,0 M	32
3.3.16. Solução sacarose 0,8 M	32
3.3.17. Solução NaCl 0,7 M - CaCl ₂ 0,2 M	33
3.3.18. Solução SE	33
3.3.19. Solução LMA -SE	33
3.3.20. Solução de Sarcosyl - EDTA - proteinase K	33
3.3.21. Solução tampão TAE	33
3.4. Esterilização e temperatura de incubação	34
3.5. Método de cultivo e manutenção da linhagens	34
3.6. Obtenção e caracterização dos diplóides	34
3.6.1. Obtenção dos diplóides	34
3.6.1.1. Através de método de ROPIER (1952)	35
3.6.1.2. Através do método de INGLE e HASTIE (1974), modificado por VENEZIANO - LABATE (1989).	35
3.6.2. Caracterização dos diplóides	36
3.7. Obtenção e caracterização dos segregantes haplóides	37
3.7.1. Obtenção	37
3.7.2. Caracterização	37
3.8. Obtenção de protoplastos	38
3.8.1. Variações ensaiadas ao longo do trabalho em experimentos separados	39
3.9. Preparação das amostras de DNA cromossômico íntegro para eletroforese de campo pulsado	40
3.10. Eletroforese de campo pulsado	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Obtenção e caracterização de diplóides	41
4.2. Complementação dos marcadores genéticos	43
4.2.1. Diplóide <i>N620 NO</i>	43
4.2.2. Diplóide <i>N655 PNO</i>	48
4.2.3. Diplóide <i>N669//SM13</i>	51
4.2.4. Diplóide <i>N669//SM22</i>	55

4.2.5. Diplóide <i>N655//SV12</i>	pag. 57
4.3. Equivalências de grupos de ligação	68
4.3.1. Grupo de ligação I	68
4.3.1.1. Obtenção e caracterização dos diplóides <i>N889//PNO</i> e <i>N890//SV12</i>	68
4.3.1.2. Mapeamento	68
4.3.2. Grupo de ligação II	73
4.3.2.1. Obtenção e caracterização dos diplóides <i>N690//PNO</i> , <i>N823//PNO</i> e <i>N875//PI'</i>	73
4.3.2.2. Mapeamento	73
4.3.3. Grupo de ligação III	80
4.3.3.1. Obtenção e caracterização dos diplóides <i>N875 SM13</i> e <i>N868 SM13</i>	80
4.3.3.2. Mapeamento	80
4.3.4. Grupo de ligação IV	85
4.3.4.1. Obtenção e caracterização do diplóide <i>N805 SM22</i>	85
4.3.4.2. Mapeamento	85
4.3.5. Considerações gerais	89
4.4. Localização dos genes <i>glaA</i> , <i>aglA</i> e <i>pepA</i>	92
4.5. Obtenção de protoplastos para determinação do cariótipo eletroforético	94
5. CONCLUSÕES	102
6. RESUMO	103
7. ABSTRACT	104
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

ÍNDICE DE TABELAS

	pag.
TABELA 1 - Características dos diplóides e respectivos parentais haplóides.	41
TABELA 2 - Resultados do teste de auxotrofia dos segregantes do diplóide N620//NO em relação aos marcadores auxotróficos e morfológicos.	45
TABELA 3 - Marcadores auxotróficos e morfológicos de alguns segregantes do diplóide N620//NO e diferentes linhagens como controle.	47
TABELA 4 - Genótipo dos segregantes do diplóide N655//PN0 e respectivos parentais.	49
TABELA 5 - Genótipo dos segregantes do diplóide N669//SM13 e respectivos parentais.	53
TABELA 6- Análise mitótica e porcentagem de recombinação dos segregantes do diplóide N669//SM13	54
TABELA 7 - Genótipo dos segregantes do diplóide N669//SM22 e respectivos parentais.	56
TABELA 8 - Análise dos segregantes do diplóide <i>N655//SV12 B</i> .	61
TABELA 9 - Análise dos segregantes do diplóide <i>N655//SV12 D</i> .	61
TABELA 10- Análise mitótica dos marcadores do grupo de ligação I e III do diplóide <i>N655 SV12B</i>	64
TABELA 11- Análise mitótica dos marcadores do grupo de ligação I e III do diplóide <i>N655 SV12D</i>	64
TABELA 12 - Análise dos segregantes do diplóide <i>N655//SV12 A</i> .	65
TABELA 13- Análise mitótica dos marcadores do grupo de ligação I e III do diplóide <i>N655 SV12A</i>	65
TABELA 14 - Genótipo dos segregantes do diplóide <i>N889 PNO</i> e respectivos parentais.	69
TABELA 15 - Genótipos dos segregantes do diplóide <i>N890 SV12</i> e respectivos parentais.	70
TABELA 16 - Análise genética dos segregantes haplóides dos diplóides <i>889//PNO</i> e <i>N890//SV12</i>	72
TABELA 17 - Genótipo dos segregantes do diplóide <i>N690 PNO</i> e respectivos parentais.	75
TABELA 18 - Genótipo dos segregantes do diplóide <i>N823 PNO</i> e respectivos parentais.	76

	pag.
TABELA 19 - Genótipo dos segregantes do diplóide N875//PF e respectivos parentais	78
TABELA 20 - Análise genética de segregantes haplóides dos diplóides <i>N690//PNO, N889//PNO, N823//PNO e N875//PF</i>	79
TABELA 21 - Genótipo dos segregantes do diplóide <i>N875//SM13</i> e respectivos parentais.	81
TABELA 22 - Genótipos dos segregantes do diplóide <i>N868//SM13</i> e respectivos parentais.	83
TABELA 23 - Análise genética dos segregantes haplóides dos diplóides <i>N875//SM13 e N868//SM13</i>	84
TABELA 24 - Genótipo dos segregantes do diplóide N805//SM22 e respectivos parentais.	87
TABELA 25- Análise genética de segregantes haplóides dos diplóides <i>N875//SM13, N868//SM13 e N805//SM22.</i>	88
TABELA 26 - Porcentagem de recombinação entre genes marcados por deleção e marcadores em GL específicos seguidos de haploidização do diplóide heterozigoto.	93
TABELA 27 - Obtenção de protoplastos em linhagens de <i>Aspergillus niger</i> , usando a Novozym 234 e Cellulase CP como enzimas digestivas.	97
TABELA 28 - Diferentes condições para obtenção de protoplastos em linhagens de <i>Aspergillus niger</i> utilizando a enzima Novozym 234	98
TABELA 29 - Diferentes condições para obtenção de protoplastos em linhagens de <i>Aspergillus niger</i> , utilizando-se diferentes enzimas liticas.	99
TABELA 30- Diferentes condições para obtenção de protoplastos da linhagem <i>PF</i>	100
TABELA 31 - Produção de protoplastos de linhagens de <i>Aspergillus niger</i> utilizando 1% da enzima helicase e 0,5 % de Novozym 234 em KCl 0,9M	101

ÍNDICE DE QUADRO E FIGURAS

	pag.
QUADRO 1 - Relação das linhagens utilizadas, com seus marcadores genéticos alocados nos respectivos grupos de ligação	26
FIGURA 1- Modelo sugerido para formação do diplóide <i>N655//PNO</i>	50
FIGURA 2 - Modelo proposto para o aparecimento do diplóide <i>N655//SV12 B</i>	62
FIGURA 3 - Modelos propostos para formação do diplóide <i>N655//SV12 A</i> , com a ocorrência de crossing-over intragênico	66
FIGURA 4 - Distribuição dos genes nos grupos de ligação das linhagens <i>10v10</i> e <i>N402</i> .	89
FIGURA 5 - Esquema das equivalências dos grupos de ligação entre as linhagens <i>10v10</i> e <i>N402</i> de <i>Aspergillus niger</i> .	91

1. INTRODUÇÃO

O fungo filamentosso *Aspergillus niger* é de grande interesse industrial devido à sua capacidade de produzir ácidos orgânicos, metabólitos secundários e enzimas extracelulares (BERRY e col., 1977; BARBESGAARD, 1977; Van BRUNT, 1986), como também, pela sua utilização na biodegradação de compostos complexos (SHAILUBHAI e col., 1984). Além disso, eles representam considerável importância em estudos genéticos e bioquímicos por apresentar um nível de complexidade de eucariotos aliado à facilidade de manipulação de um procarioto.

O fungo *A. niger* é classificado como sendo Deuteromiceto devido à inexistência ou não determinação do ciclo sexual.

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

O ciclo parassexual, além de sua importância como fonte de variabilidade genética, permite o mapeamento em fungos imperfeitos (AZEVEDO, 1972, 1976; VALENT, 1985; MASIERO, 1988), o melhoramento de fungos que possuem características de interesse econômico (SERMONTI, 1969; BONATELLI Jr., 1977, 1981) e, através da análise mitótica, o estabelecimento do número de grupos de ligação para uma determinada espécie.

Apesar da importância biotecnológica desse fungo, poucos trabalhos envolvendo a genética tem sido realizados. Ultimamente, tem-se

explorado seu potencial para uso em experimentos de transformação (KELLY e HYNES, 1985; BUXTON e col., 1985; GOOSEN e col., 1987; Van HARTINGSVELDT e col., 1987). Portanto, uma maior compreensão de aspectos genéticos desse fungo e a possibilidade de seu uso para análise genética é de importância fundamental.

Este trabalho teve como objetivo verificar a interação alélica, complementação de marcas, equivalência de grupos de ligação e ocorrência ou não de recombinação entre um grupo de linhagens de *A. niger*, derivadas da linhagem 10v10, utilizada industrialmente na produção de ácido cítrico e boa produtora de glucoamilase, com 6 grupos de ligação identificados e linhagens derivadas da N402, proveniente da Holanda, com marcadores genéticos em 8 grupos de ligação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O fungo *Aspergillus niger*

O nome *Aspergillus* foi introduzido por MICHELI em 1729 (apud RAPER e FENNEL, 1965) para designar os fungos que apresentavam um padrão característico de conidióforos. Os fungos que pertencem a esse gênero são de distribuição mundial, sendo, segundo RAPER e FENNEL (1965), encontrados em quase todos os tipos de substratos (alimentos, tecidos, couros, vegetação, etc).

Dentro do gênero *Aspergillus* a espécie *Aspergillus niger* é, provavelmente, a mais comum. Seu nome se deve à pigmentação negra característica dos conídios (RAPER e FENNEL, 1965). A produção do pigmento preto, no *A. niger*, é profundamente influenciada pela presença ou ausência de quantidades mínimas de cobre nos substratos sendo, inclusive, essa característica usada para estimar a concentração de cobre no solo (MULDER, 1948). O envolvimento do cobre na pigmentação também foi descrito para o *Aspergillus nidulans* (CLUTTERBUCK, 1972).

O fungo *A. niger* apresenta, quando cultivado em meio Czapek sólido, conídios pretos, globosos quando maduros, de aspecto rugoso com equinulações descontínuas, sendo evidenciadas duas séries de esterígmas, medindo aproximadamente 4-5 μm de diâmetro na maturidade. Os conídios são considerados uninucleados (YUILL, 1950), embora também *A. niger* com conídios binucleados tenham sido relatados (BARACHO e COELHO, 1978). Em cultura submersa, com agitação e temperatura elevada, o *A. niger* pode apresentar recapitulação imediata de esporogênese seguida de germinação de esporos (SMITH, 1977).

A ocorrência desse fungo está documentado em todas as partes do mundo, mas, em contraste com outras espécies de *Aspergillus*, menos que 50% são encontrados nos trópicos (DOMSCH e col., 1980). Segundo RIPPEL (1939; apud DEBETS, 1990), o *A. niger* pode ser facilmente selecionado com base no crescimento específico em tanino 20%.

Nenhum estágio sexual é conhecido no ciclo de vida do *A.niger*, tendo sido portanto, classificado como Deuteromiceto, sub-divisão Deuteromicotina.

Devido à sua versatilidade metabólica, o *A. niger* é uma espécie de grande interesse industrial por ser boa secretora de proteínas (Van BRUNT, 1986) além de acumular vários tipos de metabólitos (SMITH e PATEMAN, 1977). Este fungo é amplamente usado na indústria para produção de ácidos orgânicos, como os ácidos gálico, cítrico e glucônico (LOCKWOOD, 1975), para produção de enzimas industriais como a amilase, glucoamilase, celulase, hemicelulase, pectinase, glucose oxidase e catalase (UNDERKOFLEER, 1976) e nas fermentações de alimentos (WOOD, 1977). Alguns *Aspergillus* também podem produzir micotoxinas nos alimentos e outros podem causar aspergiloses (EDWARDS e AL-ZUBAIDY, 1977). Outro aspecto importante do *A. niger* é sua classificação, juntamente com o *Aspergillus oryzae*, como GRAS (Generally Recognized As Safe), pelo "Food and Drug Administration", EUA, o que tem estimulado a sua utilização como produtor de proteínas heterólogas (WARD, 1989).

2.2. Recombinação parassexual em fungos

Recombinação, sem o envolvimento do ciclo sexual em fungos, foi primeiramente descrito por PONTECORVO e ROPER (1952) em

A.nidulans e foi chamado de recombinação parassexual. Em 1953a, PONTECORVO e col., descreveram esse ciclo em *A. niger*.

O ciclo parassexual, como considerado por PONTECORVO (1956, 1958) e ROPER (1966), consiste essencialmente das seguintes sequências de eventos: 1) anastomoses de hifas de homocários de diferentes fenótipos dando um heterocário; 2) fusão de dois núcleos haplóides no heterocário; 3) ocasional permuta mitótica durante a multiplicação do núcleo diplóide, resultando em recombinantes homozigotos para segmentos de um cromossomo e/ou 4) ocasional não-disjunção, principalmente via sucessivos estados aneuplóides, resultando um número haplóide de cromossomos. Contrastando com a recombinação por meiose, no ciclo parassexual não há coordenação precisa entre fusão nuclear, recombinação e redução do número de cromossomos.

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

Os diplóides assim obtidos, assemelham-se à linhagem selvagem com relação às características morfológicas das colônias, podendo, entretanto, serem separados das linhagens haplóides parentais auxotróficas por crescerem em meio de composição definida (Meio Mínimo), pelo conteúdo do DNA nuclear (HEAGY e ROPER, 1952; VIALTA, 1987) e pelo diâmetro de conídios 1,1 a 1,3 vezes maior (PONTECORVO e ROPER, 1952;

PONTECORVO e col., 1953a; LHOAS, 1967, 1968; CHANG e col., 1974; DAS e ROY, 1978; BONATELLI Jr. e col., 1983; VIALTA, 1987). Entretanto, para algumas espécies de fungos como citado nos trabalhos de ISHITANI e col. (1956) em *A. oryzae* e *Aspergillus sojae*; HOLLIDAY (1961) em *Ustilago maydis*; TINLINE (1962) em *Cochliobolus sativus*; PAPA (1973) em *Aspergillus flavus*; PAPA (1978) em *Aspergillus parasiticus*; ROSIM e col. (1978) em *A. niger* e MESSIAS e AZEVEDO (1980) em *Metarhizium anisopliae* o diâmetro de conídios não é considerado um critério muito confiável.

Outro critério para distinguir colônias diplóides de haplóides é a utilização de agentes haploidizantes, ou seja, substâncias que induzem a formação de segregantes haplóides. Uma série de substâncias com tal efeito têm sido empregadas. Os primeiros relatos nesse sentido foram feitos com *p*-fluorfenilalanina (*p*FA) em trabalhos com *A. niger* e *A. nidulans* (LHOAS, 1961; MORPURGO, 1961). Relatos da utilização do *p*FA em outras espécies de fungos foram feitos por PAPA (1976, 1978, 1984), BENNET (1979), BRADSHAW e col. (1983). Outras substâncias que atuam como agente haploidizante são o cloridrato (SINGH e SINHA, 1976) e o fungicida Benlate, inicialmente utilizado por HASTIE (1970) em, *A. nidulans*, para obtenção de segregantes de colônias diplóides. Esse fungicida tem sido utilizado para essa finalidade também em outras espécies (UPSHALL e col., 1976; BONATELLI Jr., 1981; BRADSHAW e col., 1983; BONATELLI Jr. e col., 1983; VIALTA, 1987; OLIVEIRA, 1991).

O ciclo parassexual tem sido demonstrado em várias espécies de fungos de importância industrial, por exemplo, *A. niger* (PONTECORVO e col., 1953a), *A. oryzae* e *A. sojae* (ISHITANI e col., 1956), *Penicillium chrysogenum* (PONTECORVO e SERMONTI, 1954), *A. awamori* (VIALTA, 1987); fungos entomopatogênicos como *M. anisopliae* (MESSIAS, 1979; MESSIAS e AZEVEDO, 1980; AL-AIDROOS, 1980) e *Verticillium lecanii* (JACKSON e HEALE, 1987); fungos patogênicos de plantas como *C. sativus* (TINLINE, 1962), *Fusarium oxysporum f. pisi* (BUXTON, 1956), *Fusarium*

tricinctum, *Fusarium sporotrichioides* (CULLEN, e col., 1983), *Pyricularia oryzae* (GENOVESI e MAGILL, 1976) e *Verticillium dahliae* (HASTIE, 1973) e fungos de interesse médico como *Aspergillus fumigatus* (BERG e GARBER, 1962), *A. flavus* (PAPA, 1973) e *Candida albicans* (KAKAR e col., 1983).

Evidências de que a fusão de núcleos haplóides seja um processo passível de ocorrer na natureza são dadas pelos trabalhos de NGA e col. (1975) em *A. niger*, WHELAN e MAGGEE (1981) em *C. albicans* e UPSHALL (1981) em *A. nidulans*. Recombinação parassexual foi encontrada nos membros de todas as principais classes de fungos: Ascomicetos, Ficomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos.

A recombinação no ciclo parassexual pode ocorrer através de permuta mitótica, que foi estudada por ROPER e PRITCHARD (1955) e PONTECORVO e KÄFER (1958), os quais concluíram que o fenômeno é raro, ocorrendo uma permuta a cada 500 mitoses no estágio de quatro fios.

Os diferentes estágios do ciclo parassexual podem variar muito na frequência e na estabilidade conforme a espécie de fungo estudada. Em casos extremos, um dos passos pode ser tão transiente que eles regularmente não são sequer detectados. Por exemplo, em *Humicola sp.* diplóides originam-se diretamente de culturas de mutantes auxotróficos misturados em Meio Mínimo, sem detecção de heterocários (De BERTOLDI e CATEN, 1975), enquanto no *Cephalosporium acremonium* o estágio diplóide é transiente e pode permanecer despercebido (HAMLYN e BALL, 1979). LHOAS (1967) constatou alta frequência de recombinação mitótica e BONATELLI Jr. e col. (1983) verificaram que na linhagem *10v10* de *A. niger* a frequência era ainda maior. O termo **paramiose** foi então sugerido por Bonatelli Jr. e col. (1983), para denominar o fenômeno caracterizado pelo isolamento, diretamente do heterocário, de haplóides recombinantes e diplóides homozigotos para as marcas genéticas estudadas. SILVEIRA e AZEVEDO (1987) e BAGAGHI e col. (1991) detectaram esse

fenômeno em *M. anisopliae*. Principalmente para fungos nos quais faltam os processos de recombinação sexual, esse processo pode contribuir para aumentar significativamente a variabilidade genética natural dessas espécies (BONATELLI Jr. e AZEVEDO, 1992).

Recombinação mitótica pode ser eficientemente usada para análise genética em fungos. Para fungos assexuados é a única técnica para mapeamento, mas também nos fungos sexuados ela pode ser mais conveniente que a técnica convencional de mapeamento meiótico, como por exemplo em *A.nidulans* (KÄFER,1977).

2.3. Modelos de recombinação

Modelos de recombinação foram formulados considerando as propriedades observadas de recombinação mitótica e meiótica.

O modelo de MESELSON-RADDING (MESELSON e RADDING, 1975) é iniciado por transferência de uma fita simples (ou assimétrica) a qual pode tornar-se dupla (ou simétrica) depois de isomerização. O modelo é uma extensão do modelo proposto por HOLLIDAY (1964a) e explica os padrões de segregação aberrante observados em fungos que sugere formação de DNA heteroduplex em somente uma cromátide. Conversão gênica, como no modelo de HOLLIDAY, resulta de reparo enzimático de pares de bases erradas (mismatched) em regiões heteroduplex. Informações adicionais foram obtidas sobre mecanismos de recombinação em fungos por experimentos de transformação. Especialmente transformação em leveduras tem sido usada como modelo para estudos de recombinação (ORR-WEAVER e col., 1981). Células de leveduras podem ser transformadas com DNA plasmidial por integração do plasmídeo na sequência homóloga do cromossomo por uma permuta simples ou

por substituição através de conversão gênica ou permuta dupla (HINNEN e col., 1978; ORR-WEAVER e col., 1983). Adicionalmente, uma alta frequência de transformação é possível em levedura se o plasmídio transformante contém fragmentos cromossômicos pelos quais o plasmídio pode ser mantido (STRUHL e col., 1979). Plasmídio contendo a sequência ARS (sequência de replicação autônoma) transforma em alta frequência porque não é necessário a integração do plasmídio em um sítio homólogo no genoma. Transformação em leveduras tem sido uma técnica muito usada para estudar mecanismos de recombinação porque o DNA transformante pode ser manipulado experimentalmente (ORR-WEAVER e col., 1981; ORR-WEAVER e SZOSTAK, 1985).

Recombinação mitótica em fungos ocorre em nível muito menor que recombinação meiótica. Em mitoses, sequências homólogas pareiam somente ao acaso. Essa talvez não seja a maior razão para a baixa frequência de recombinação uma vez que a frequência de recombinantes mitóticos pode ser aumentada por raios X, luz ultravioleta e tratamentos com mutagênicos químicos, quase para os níveis meióticos (HOLLIDAY, 1964b; DAVIES e col., 1975; SHANFIELD e KÄFER, 1971).

ORR-WEAVER e SZOSTAK (1985) sugerem que uma provável explicação para a existência de recombinação mitótica seria que ela é simplesmente uma consequência da atividade de reparo de DNA ("DNA repair"). Bases erradas, introduzidas por erro na duplicação de DNA ou espontaneamente, ou ainda, lesão no DNA, são todas removidas ou reparadas e o reparo pode resultar em recombinação. O fenômeno de indução de recombinação por tratamento com agentes mutagênicos tem sido usado em muitos fungos para facilitar o isolamento de recombinantes mitóticos (DEBETS, 1990).

Como mencionado anteriormente, a ocorrência de permuta mitótica pode ser explicada no estágio G_2 , mas o início de ambos, recombinação mitótica induzida ou espontânea, pode ocorrer já no estágio G_1 do ciclo celular

(FABRE, 1978 e ESPOSITO, 1978). Portanto, foi proposto que a recombinação mitótica se inicia no estágio de duas cromátides e que uma recombinação intermediária é determinada durante a fase S pela passagem da forquilha de duplicação (ESPOSITO, 1978). Entretanto, considerando recombinação intergênica, um possível heteroduplex e conversão gênica inicial permanecerão não detectáveis pois, isso só poderá ser observado se houverem marcadores genéticos já localizados (por exemplo, se recombinação heteroalélica é estudada). Assim, não haverá diferença significativa no resultado de recombinação caso iniciação seja por uma quebra na fita simples ou dupla no estágio G_1 ou G_2 . Portanto, a próxima permuta no diplóide heterozigoto será modelada como 4 cromátides trocadas.

2.4. Análise genética baseada em recombinação mitótica

A análise genética baseada na recombinação mitótica em fungos filamentosos haplóides começa com a obtenção de diplóides heterozigotos para um número de marcadores genéticos conhecidos. Para *A. nidulans* uma técnica eficiente de seleção de diplóide foi descrita por ROPER (1952). Um heterocário entre duas linhagens mutantes auxotróficas com diferentes deficiências nutricionais é crescido em Meio Mínimo. Os conídios no heterocário são uninucleados, e como todos os conídios haplóides são auxotróficos, os conídios diplóides heterozigotos prototróficos poderão ser selecionados em Meio Mínimo. Esse método tem sido usado para o isolamento de diplóides em muitos outros fungos uninucleados. O método é também aplicável para fungos que tem conídios multinucleados que originam, por mitoses sucessivas, conídios primários uninucleados jovens. *A. niger* ATCC1015 tem conídios binucleados mas, como eles são homocarióticos, a técnica de isolamento de diplóides pode ser aplicada com sucesso (BOSCHLOO e col., 1990). Conídios heterocarióticos que resultam da migração de vários núcleos de fiáides heterocarióticas para os esporos, foram

observados em várias espécies de *Aspergillus* como por exemplo *Aspergillus carbonarius* (YUILL, 1950), *A. flavus* (PAPA, 1973), *A. parasiticus* (PAPA, 1978) e *Aspergillus echinulatus* (BAKER, 1945). Apesar dos conídios heterocarióticos interferirem na técnica de seleção de diplóide, colônias diplóides puderam ser selecionadas por PAPA (1978) em *A. parasiticus*, embora apresentasse 28% de conídios heterocarióticos.

Como ocorre pouca coincidência de permuta mitótica e haploidização, os marcadores genéticos em um cromossomo segregam juntos e independentemente dos marcadores de outros cromossomos não homólogos (PONTECORVO e KÄFER, 1958). Linhagens mestras foram construídas e os genes puderam ser atribuídos aos grupos de ligação para *A. nidulans* (McCULLY e FORBES, 1965) e também para *A. niger* (BOS e col., 1988). Um diplóide pode ser obtido entre linhagens mestras com marcadores em um ou vários grupos de ligação e uma linhagem carregando um marcador não mapeado. Pela análise de segregantes haplóides isolados ao acaso, ligação de uma nova marca com um dos marcadores da linhagem mestra pode ser observada e, assim, o grupo de ligação pode ser estabelecido.

A presença de segregação e recombinação mitótica pode ser facilmente demonstrada se o sistema genético for adequadamente escolhido. Em genética, o termo segregação é usado para descrever a separação de dois alelos constituindo um heterozigoto, em indivíduos ou células fenotipicamente distinguíveis. Ocasionalmente, pode-se ver segregação de alelos de um heterozigoto quando uma célula heterozigota sofre divisão mitótica.

Recombinantes por permuta mitótica podem ser explicados como resultado de permuta para as quatro cromátides no estágio G₂ da mitose, como foi demonstrado por STERN (1936) em *Drosophila*, baseado na análise genética de manchas gêmeas ("twin spots") que supôs que deveriam ser o produto recíproco de permutação. Isso foi confirmado por ROPER e PRITCHARD (1955)

em *A. nidulans*. Eles analisaram segregantes diplóides prototróficos que foram isolados de um diplóide heterozigoto para um número de marcadores ligados e carregando um arranjo *trans* de duas mutações alélicas *ad16* e *ad8*.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, ROMAN (1956) demonstrou em um experimento comparável ao citado acima, que recombinação heteroalélica ocorria predominantemente por recombinação não-recíproca: conversão gênica. Também, em *A. nidulans*, foi mostrado, mais tarde, que recombinação intragênica era principalmente uma consequência de conversão gênica (PRUTAMENT, 1964; BANDIERA e col., 1973).

Os mecanismos possíveis para recombinação mitótica: recíproco (permuta) e não-recíproco (conversão gênica), foram estudados principalmente em *S. cerevisiae* e foram revistos por ORR-WEAVER e SZOSTAK (1985) e ROEDER e STEWART (1988).

Uma associação de permuta mitótica com conversão gênica mitótica foi observada para um número de genes em *S. cerevisiae* com frequência de conversão gênica como resultado de permuta ao redor de 10 a 55% (ESPOSITO e WAGSTAFF, 1981). Isso é sustentado pela observação que agentes indutores estimulam ambos os eventos de recombinação (FOGEL e HURST, 1963), embora não no mesmo grau, sugerindo que os dois tipos de eventos podem ser isolados. Dados obtidos com mutantes afetados em recombinação demonstram também que conversão gênica mitótica e permuta mitótica requerem algumas das mesmas funções, mas também são separáveis (ORR-WEAVER e SZOSTAK, 1985).

Técnicas genéticas para a análise de recombinação parassexual foram desenvolvidas para *A. nidulans* mas raramente tem sido adotadas para *A. niger* (LHOAS, 1967; Van TUYL, 1977).

LHOAS (1967) relatou a distribuição de 31 marcadores em 6 grupos de ligação. Van TUYL (1977), estudando resistência a fungicidas em *A.niger*, começou com um tipo selvagem diferente, isolado de bulbos de jacintos e também observou 6 grupos de ligação em *A. niger*.

BONATELLI Jr. iniciou em 1977 estudos básicos sobre parassexualidade e produção de ácido cítrico em uma linhagem industrial de *A.niger*, denominada *10v10*, obtendo mutantes com marcadores em dois grupos de ligação (I e II) (BONATELLI Jr., 1981). A partir dessas linhagens, VALENT (1985) isolou mutantes que apresentavam baixa e média produção da enzima glucoamilase e CALIL (1988) obteve mutantes com atividade enzimática de 20 a 60% maior que a linhagem parental. Visando estabelecer novos marcadores genéticos, para posterior mapeamento dos mutantes de produção alterada da glucoamilase, MASIERO (1988, 1992) obteve uma série de mutantes: morfológicos, auxotróficos, de resistência e de produção de enzimas, cujos marcadores estavam distribuídos em 6 grupos de ligação (MASIERO e BONATELLI Jr., 1989; VALENT e col., 1992; MASIERO, 1992).

Como as linhagens de LHOAS (1967) não estão mais disponíveis e somente poucas linhagens de *A. niger* de Van TUYL (1977) foram preservadas, uma nova coleção de linhagens foi iniciada (BOS, 1985) usando a linhagem ATCC 9029, produtora de ácido glutâmico. Mutações foram induzidas com baixas doses de UV para minimizar a ocorrência de outros tipos de danos (BOS, 1987). Essas mutações estavam distribuídas em 6 grupos de ligações. Em adição aos 6 grupos de ligação descritos por BOS e col., (1988), DEBETS e col., (1990b) encontraram mais 2 grupos, totalizando-se assim, 8 grupos de ligação descritos para *A. niger*. Uma série completa de linhagens mestras de *A. niger*, contendo marcadores auxotróficos, morfológicos e de resistência, distribuídos nos 8 grupos de ligação descritos, foi publicada por BOS e col. (1993).

2.5. Determinação da ordem do gene

A ordem do gene dentro de um grupo de ligação pode ser determinada em relação ao centrômero, pela análise de recombinantes mitóticos derivados de culturas diplóides heterozigotas. Também os recombinantes diplóides homozigotos parciais são especialmente informativos.

Devido à permuta, todas as marcas distais ao sítio de troca podem tornar-se homozigotas enquanto todas as marcas proximais permanecerão heterozigotas. O principal problema na análise do mapa mitótico é o fato de que a permuta espontânea é tão rara que sistemas seletivos são requeridos para detectar os produtos de recombinação. A seleção depende fortemente da viabilidade das marcas seletivas. Para maior informação, essas marcas seletivas devem estar distais e na posição *cis* em relação a outra marca seletiva recessiva no mesmo cromossomo. Sem recombinação adequada, tal arranjo genético pode somente ser encontrado pela seleção sucessiva de novas mutações em um único mutante. Uma análise completa requer um marcador distal seletivo em cada braço do cromossomo.

Mesmo em *A. nidulans*, um fungo geneticamente bem caracterizado, com um mapa genético contendo mais de 200 marcadores mapeados (CLUTTERBUCK, 1987), é, muitas vezes, difícil encontrar pré-requisitos para um mapa mitótico eficiente.

Em *A. nidulans*, dificilmente ocorre qualquer coincidência entre haploidização e permuta. Além disso, haplóides de diplóides heterozigotos normalmente não mostram recombinação intracromossomal. Em *A. niger*, entretanto, haplóides induzidos compreendem uma porcentagem significativa que mostram recombinação entre marcas ligadas (LHOAS, 1967; BOS e col., 1988; MASIERO, 1988; CALIL, 1988). Recombinantes haplóides foram usados por

LHOAS (1967) para determinar a ordem das marcas em um cromossomo e estimar a distância entre eles.

Linhagens dissômicas de *A. nidulans* são viáveis porque são relativamente instáveis e mostram perda ao acaso de um dos cromossomos duplicados na mitose. Até aproximadamente 6% dos setores haplóides selecionados ao acaso, do cromossomo dissômico I e III mostraram resultar de recombinação entre os homólogos antes da perda do cromossomo (ASSINDER e UPSHALL, 1986, ASSINDER e col., 1986). Foi sugerido, portanto, o uso desses recombinantes para mapeamento mitótico. Foi argumentado que, se aneuplóides estão em um estágio relativamente duradouro na geração de haplóides em meio de haploidização, permutas, nesses aneuplóides, podem explicar a coincidência observada de permuta e haploidização encontrada em *A. niger* mas não em *A. nidulans* (KÄFER, 1977).

Em *A. nidulans*, também foi sugerido o uso de linhagens translocadas para mapeamento de marcas no segmento cromossômico, por análise de translocação no diplóide homozigoto (MA e KÄFER, 1974) ou por análise de translocação dissômica (KÄFER, 1975).

Como mencionado anteriormente, permuta mitótica espontânea é rara, mas pode ser induzida por tratamento de diplóides heterozigotos com agentes mutagênicos para facilitar a detecção de recombinantes necessários para mapeamento mitótico. Em *A. nidulans* permutas induzidas por luz ultravioleta (UV) parecem mostrar a mesma distribuição que permuta espontânea e a frequência com a qual uma marca torna-se homozigota, pode ser usada como uma medida relativa da distância entre esse marcador e o centrômero (WOOD e KÄFER, 1969). Múltiplas cópias não foram mais frequentes que o esperado de coincidência ao acaso que trocas simples. Isso também é verdade para indução química de recombinantes mitóticos em *A. nidulans* (SHANFIELD e KÄFER, 1971). Também em *Schizosaccharomyces pombe* os dados de mapa mitótico

baseados em recombinantes induzidos com UV estão consistentes com a ordem proposta com base nos recombinantes espontâneos.

Como na haploidização, há considerável variação na frequência de permuta mitótica em diferentes organismos. A frequência absoluta de permuta mitótica em organismos superiores é extremamente difícil de ser estimada. Em fungos, isso é possível, mas as informações são limitadas devido à baixa frequência de permuta e ao aparecimento de recombinantes. Para *A.nidulans*, a incidência de permuta mitótica usando marcadores para coloração de conídios foi estimada ao redor de 0,1 a 0,3% por braço do cromossomo, estando, provavelmente, correlacionada ao comprimento do braço (KÄFER, 1961).

Uma tentativa de estabelecer a ordem dos genes, relativa ao centrômero, de 60 loci distribuídos nos 8 grupos de ligação de *A. niger*, foi feita por DEBETS e col. (1993). Foram encontrados marcadores genéticos em ambos os braços dos cromossomos, exceto para cromossomos II e IV, os quais podem ser acrocêntricos. Informações sobre a frequência absoluta de recombinação mitótica nos diplóides heterozigotos também foram obtidas. A frequência de recombinantes diplóides homozigotos através de não-disjunção em *A. niger* é menor que 10^{-5} , enquanto a frequência de segregantes haplóides é ao redor de 10^{-3} . A frequência de uma marca resultando de permuta mitótica depende da posição relativa para o centrômero e variou de 6×10^{-5} (*niaA*₁) até 4×10^{-2} (*cnxD*₆).

2.6. Problemas inerentes à análise genética clássica

A genética clássica de fungos requer uma coleção de marcadores genéticos cuja análise pode ser Mendeliana típica ou via ciclo parassexual (PONTECORVO, 1958).

Por várias razões, para muitos fungos, a indução de mutação não conduz a uma coleção de marcadores desejáveis . Um problema inerente a muitas espécies tem sido o de encontrar métodos adequados para determinar se esporos, presumidamente haplóides, contém um número (base) uniforme de cromossomos. Devido ao seu tamanho, cromossomos de fungos são dificilmente visualizados por técnicas citológicas convencionais. Em fungos, que tem cromossomos apropriados para um cariótipo citológico, o nível de ploidia dificulta a verificação.

A seleção de marcas genéticas induzidas em espécies de fungos que são poliplóides ou que toleram aneuploidia pode falhar simplesmente porque mutações originadas num homólogo de um par de cromossomos dissômicos seriam complementadas pelo alelo do tipo selvagem. Outros problemas não relacionados ao isolamento de marcadores genéticos afetariam também o uso desses marcadores na análise do genoma do fungo. Em *Tilletia* sp., onde um esquema elaborado para recuperação de alelos mutantes foi desenvolvido (MILLS e CHURCHILL, 1988), dados de ligações foram difíceis ou impossíveis de serem obtidos simplesmente porque linhagens mantidas em cultura, sem transferência semanal, perdiam sua capacidade de cruzar ou não completavam o ciclo sexual (TRAIL e MILLS, 1990). Outras complicações são inerentes a alguns fungos imperfeitos onde não ocorre o ciclo sexual impedindo uma análise genética Mendeliana típica.

Fragments de DNA até 23 Kb podem ser determinados por eletroforese convencional usando gel de agarose. Porém, para fragmentos maiores, essa técnica vai tornando-se inadequada. Esses e outros problemas podem ser resolvidos por uma aplicação apropriada de técnicas de Eletroforese em gel de campo pulsado - PFGE ("Pulsed-Field Gel Electrophoresis") combinando o padrão molecular e a genética clássica. Usando essa técnica (PFGE), o genoma pode ser determinado por separação dos cromossomos, resultando no chamado cariótipo eletroforético. Qualquer segmento de DNA clonado pode, então, ser

relacionado com uma das bandas do cariótipo eletroforético por hibridização por Southern.

2.7. Eletroforese em gel de campo pulsado

Moléculas de DNA menores que aproximadamente 20 kb são fracionadas em matrizes de agarose por eletroforese convencional porque elas são suscetíveis de separação por "peneiramento" (sieved). Moléculas maiores de DNA não são peneiradas e, portanto, seu tamanho não pode ser determinado porque sua velocidade não é proporcional ao seu comprimento.

Em 1984, SCHWARTZ e CANTOR descreveram um novo tipo de sistema de eletroforese, onde moléculas de DNA eram expostas alternadamente a 2 campos elétricos perpendiculares. O sistema era capaz de separar moléculas de DNA de até 2 Mb. Modificações nessa técnica foram obtidas rapidamente (SNELL e WILKINS, 1986) e o tamanho que hoje pode ser determinado está entre 5 a 10 Mb.

Eletroforese em gel de campo pulsado - PFGE é uma técnica que separa moléculas de DNA em matrizes de agarose expondo-as a campos elétricos que se alternam em 2 direções (SCHWARTZ e CANTOR, 1984). O tempo requerido para a molécula de DNA trocar de direção em resposta a uma troca na direção do campo elétrico é dependente do tamanho. Moléculas grandes de DNA requerem mais tempo para reorientar-se que moléculas pequenas. A determinação do tamanho de uma cadeia de DNA depende da duração do intervalo da troca de pulso. Geralmente é necessário um longo período de tempo para a separação dos cromossomos do genoma. Embora métodos anteriores tenham geometria de eletrodo variável, geralmente ângulos obtusos tem sido usados. Mais tarde, CARLE e OLSON (1985) publicaram uma modificação no método usando campos ortogonais.

Considerações teóricas da dinâmica da molécula de DNA no gel de agarose pelo PFGE foram discutidas em uma série de estudos (DEUTSCH, 1987; SMITH e CANTOR, 1987; SOUTHERN e col., 1987; CARLE e OLSON, 1987; BIRREN e col., 1988; BANCROFT e WOLK, 1988; CANTOR e col., 1988; MATHEW e col., 1988; HIGHTOWER e SANTI, 1989; OLSON 1989; SCHWARTZ e KOVAL, 1989; De la CRUZ e col., 1990). Além do mais, aplicação de PFGE para análise de cromossomos tem sido objeto de vários artigos (ANAND, 1986; LAI e col., 1989; SMITH e col., 1986).

Para algumas espécies, ou mesmo entre linhagens da mesma espécie, a capacidade de visualização do tamanho da molécula de DNA do cromossomo de um fungo por PFGE é dependente de condições apropriadas e reproduzíveis de produção de protoplastos. Uma variedade de enzimas que degradam a parede celular de fungos são comercialmente viáveis para isolamento de protoplastos, embora a especificidade e eficiência de enzimas individuais ou combinadas, concentração do meio isotônico e condições de reação deve ser estabelecida para cada espécie (BELLIS e col., 1987; HAMLYN e col., 1981).

O sucesso na separação de cromossomos de *S. cerevisiae* por PFGE (SCHWARTZ e CANTOR, 1984; CARLE e OLSON 1984, 1985) pavimentou o caminho para estudos similares em outros fungos. Inicialmente empregada para cromossomos de *S. cerevisiae*, a técnica tem ampla aplicação para fungos. Cariótipos eletroforéticos (o genoma em bandas cromossômicas) foram descritos para várias espécies representando pelo menos 22 gêneros de fungos, e tem revelado diferenças em relação ao número e tamanho do cromossomo para uma mesma espécie (MILLS e McCLUSKEY, 1990).

PFGE foi usado para obter um cariótipo eletroforético parcial da linhagem N402 de *A. niger*, no qual 7 dos 8 grupos de ligação foram atribuídos a uma das 4 bandas cromossomais separáveis (DEBETS e col., 1990a). A posição

do cromossomo correspondente ao GL VII não foi determinado, devido ao fato de não se ter disponível um gene específico do GL VII ou um transformante no qual o DNA introduzido estivesse no GL VII. Porém, recentemente, o gene *nicB*, específico para o GL VII, clonado por VERDOES e col. (1994) foi usado e por hibridização por Southern a posição do cromossomo VII no cariótipo eletroforético foi identificada (VERDOES e col., 1994).

2.8. Preparação de Protoplastos

Protoplastos são células desprovidas da parede celular. A obtenção de protoplastos tem sido usada como uma ferramenta tanto para a manipulação genética como para cruzamentos entre microrganismos utilizados em pesquisa básica (PEBERDY, 1979) ou de interesse industrial (PEBERDY, 1980), além de experimentos envolvendo a biologia molecular.

O isolamento de protoplastos de células microbianas, envolve a digestão total ou perfuração localizada da parede celular por enzimas, permitindo que o conteúdo celular envolvido pela membrana celular seja liberado e se mantenha estável em meio hipertônico.

Os primeiros relatos sobre a técnica de isolamento de protoplastos foram feitos em *S. cerevisiae* (EDDY e WILLIAMSON, 1957), utilizando o suco digestivo de *Helix pomatia* como complexo lítico. Em 1958, EMERSON e EMERSON utilizando esse mesmo complexo enzimático, isolaram protoplastos de *Neurospora crassa*. O mesmo foi também aplicado em outros fungos filamentosos como por exemplo: *A. niger* (MUSILKOVÁ e FENCL, 1968) *P. chrysogenum* e *A. chrysogenum* (FAWCETT e col., 1973).

Outras alternativas na busca de enzimas que fossem eficientes e que aumentassem a frequência de protoplastos, foram ensaiadas por ACHA e VILLANUEVA (1963) e AGUIRRE e col. (1964). Os autores compararam estreptozima extraída de *Streptomyces* com helicase de *H. pomatia* e observaram produção semelhante de protoplastos em ambos os tratamentos.

Mais tarde, boa parte dos pesquisadores começaram a usar complexos enzimáticos obtidos a partir de microrganismos tais como: zimoliase, derivada de *Anthrobacter luteus* (YAMAMURA e col., 1975) e enzimas líticas de *Trichoderma viride* (De VRIES e WESSELS, 1973; ISAAC e PEBERDY, 1979). Complexos enzimáticos purificados e constituídos por diferentes polissacarases (celulase, gumase, maltase, hemicelulase e quitinase) tem sido utilizados para a obtenção de protoplastos em diferentes espécies de fungos (EMERSON e EMERSON, 1958; DIATEWA e col., 1981; HAMLYN e col., 1981; SILVEIRA e AZEVEDO, 1987).

Atualmente, complexos enzimáticos produzidos comercialmente tem sido mais utilizados, em função da especificidade de hidrólise, sobre os diferentes componentes da parede celular dos fungos (JOHNSTON, 1965; HASEGAWA e NORDIN, 1969; HAMLYN e col., 1981; ROKEM e col., 1986).

HAMLYN e col. (1981) trabalharam com várias enzimas comerciais e estudaram a ação isolada e combinada entre elas. Os autores montaram sistemas líticos para os fungos *A. niger*, *A. nidulans*, *Aspergillus rugulosus* e *Aspergillus ochraceus*, conseguindo resultados variados em relação à produção de protoplastos, da ordem de 10^6 - 10^7 protoplastos/ml.

MUSILKOVÁ e col. (1969) relataram também a preparação de um sistema enzimático de *Penicilium purpurogenum* capaz de lisar a parede de hifas jovens e liberar protoplastos de fungos filamentosos. Obtiveram protoplastos

de *A. niger*, *A. awamori* e *P. chrisogenum*, utilizando produto das culturas do *P. purpurogenum*, saturado com 80% de sulfato de amônia. Verificaram que o número de protoplastos atingiu valores da ordem de 10^6 , equivalente ao do controle tratado com helicase. Valores inferiores foram encontrados no tratamento dos fungos *A. oryzae*, *Cephalosporum* e *Trichothecium roseum*. Constataram ainda que, o complexo enzimático obtido de *P. purpurogenum*, não apresentou nenhuma ação de liberação dos protoplastos dos micélios de *Fusarium melanosporum* e *Cladosporium fulvum*, quando submetidos às mesmas condições de ensaio.

Muitos trabalhos vem sendo feitos com o objetivo de estudar os fatores que afetam a liberação de protoplastos em diferentes fungos.

PEBERDY e col. (1976), estudando os fatores que afetavam a liberação de protoplastos em várias espécies de fungos filamentosos, concluíram que a maior eficiência era obtida quando utilizadas culturas em fase exponencial de crescimento. Existem muitos trabalhos relatando a influência dessa variável, principalmente em leveduras (EDDY e WILLIAMSON, 1957; BROWN, 1971; SHAHIM, 1971; DEUTCH e PARRY, 1974; STEPHEN e NASIN, 1981).

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

Para algumas espécies, a eficiência da produção de protoplastos pode ser aumentada promovendo-se um pré - tratamento das células com o 2-deoxi-D-glicose (FOURY e GOUFFEAU, 1973), ou com compostos de tióis, entre eles o ditiotreitól, 2-mercaptoetanol ou cisteamina (DOOIJEWAAARD e col., 1973; FAWCETT e col., 1973; FINKELMAN e col., 1980). Entretanto, para

o grupo dos *Aspergillus*, HAMLIN e col. (1981) observaram que a presença desses tióis, não afetava a produção de protoplastos.

O uso de certos tipos de detergentes, tais como o deoxicolato, o laurilsulfato e o Triton X-100 foi uma estratégia montada por SIETSMA e BOER (1973), quando estudaram a regeneração da parede de protoplastos em linhagens de *Pythium sp.* Nesse trabalho, os autores verificaram que o Triton X-100 foi o mais eficiente, facilitando a ação enzimática das enzimas celulase e helicase. Em relação ao *A. niger*, COLE e POPE (1981) citaram os detergentes Triton X-100, Nonidet P-40, Tween 80 e dodecil sulfato de sódio (SDS) como os causadores da liberação crescente de protoplastos, quando acrescentados ao sistema nas concentrações de 0,1%, 0,2% e 0,5%. Acima desse patamar a produção se mantinha embora o SDS a 1% interferisse na germinação dos conídios.

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

MUSILKOVÁ e FENCL (1968) demonstraram que a concentração da enzima afetava a produção de protoplastos em vários fungos como *P. purpurogenum*, *Rhizopus nigricans*, *Cephalosporium salmosynematum*, *C. fulvum*, *Botrytis paeoniae*, *Alternaria tenuis*, *Alternaria tomato*, *A. niger* e *A. oryzae*. Observaram ainda que, não só a concentração de enzimas, mas também a variação nas fontes de carbono e nitrogênio dos meios de cultura interferiam na liberação dos protoplastos. Para o *A. niger* constataram que o número de protoplastos oscilou entre 10^4 a 10^6 /ml, sendo que a produção decrescia com a variação da temperatura (25 - 43°C) e a idade do micélio (15 - 40

hs). Paralelamente, o número aumentava em função dos menores pesos úmidos de micélio (0,3 a 0,5 mg) com a quantidade de 10 mg /ml de enzima lítica fixada para os experimentos.

Diversos outros grupos tentaram estabelecer sistemas autolíticos visando criar alternativas que facilitassem a obtenção de protoplastos. REYES e LAHOZ (1976) descreveram um método de liberação a partir do micélio jovem de *N. crassa*, utilizando o complexo enzimático obtido desse mesmo fungo. Protocolo semelhante foi montado por ISAAC e GOKHALE (1982) que observaram a presença de protoplastos de *A. nidulans* após incubar o micélio com enzimas líticas do próprio *A. nidulans*. Verificaram, também, que o ponto máximo de atividade autolítica coincidia com o número maior de protoplastos obtidos no sistema.

Variações quanto aos estabilizadores osmóticos usados nas reações também foram estudados. BACHMANN e BONNER (1959) determinaram que os melhores estabilizadores osmóticos para protoplastos de *N. crassa* eram sacarose, maltose, ramnose e frutose. Já para *Pythium* sp. a utilização de estabilizadores inorgânicos como KCl, NaCl, MgSO₄ foi mais conveniente. Para *A. nidulans*, soluções de KCl e MgSO₄ 0,6M mostraram-se eficientes na preservação da membrana dos protoplastos (ISAAC, 1979). MACEDO (1986) trabalhando com *Humicola* sp. verificou que, entre vários estabilizadores utilizados, o MgSO₄ foi o que melhor favoreceu a regeneração em meio de cultura e, BORGES (1987) verificou que em *A. niger* o melhor rendimento relativo à produção de protoplastos foi obtido com o uso de Tween 80 durante a formação do micélio e uso de MgSO₄ 0,5M como estabilizador.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos utilizados:

* - linhagens mutantes, derivadas da linhagem *10v10* de *Aspergillus niger*, produtora de ácido cítrico, com marcadores genéticos em 6 grupos de ligação, utilizadas em nosso laboratório para estudos de fatores genéticos envolvidos na produção da enzima glucoamilase (BONATELLI Jr. e col., 1983; MASIERO e BONATELLI Jr., 1989; MASIERO, 1992). Todas as linhagens tem conidióforos altos (*cspA₁⁺*).

* - linhagens mestras de *A. niger* derivadas da linhagem *N402*, produtora de ácido glutâmico, com marcadores genéticos em 8 grupos de ligação (BOS e col., 1988, 1989a,b). Todas as linhagens tem conidióforos curtos (*cspA₁*).

* - linhagens de *A. niger*, com genes deletados: *AB4.1ΔGLA* (VERDOES e col., 1994); *ΔΔ20* (den HERDER e col., 1992) e *AB1.1* (MATTERN e col., 1992). A linhagem *AB4.1ΔGLA* é derivada da *AB4.1* (van HARTINGSVELTD e col., 1987) onde o gene da enzima glucoamilase (*glaA*) foi substituído pelo gene de resistência a fleomicina. Na linhagem *ΔΔ20* o gene da enzima α-galactosidase (*agla*) e, na linhagem *AB1.1* o gene da peptidase (*pepA*), foram substituídos pelo gene *pyrG* de *A. oryzae* e *A. nidulans*, respectivamente.

As linhagens de *A. niger*, derivadas da linhagem *10v10* ou *N402*, que foram utilizadas neste trabalho, assim como seus marcadores alocados nos respectivos grupos de ligação, estão relacionadas no QUADRO I.

QUADRO 1 - Relação das linhagens utilizadas, com seus marcadores genéticos alocados nos respectivos grupos de ligação.

origem	linhagens	GRUPOS DE LIGAÇÃO							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1 0 V 1 0	PF	<i>fwnA</i> ₁ *	<i>pabA</i> ₁						
	NO	<i>olvA</i> ₃ <i>nicA</i> ₁							
	PNO	<i>olvA</i> ₃ <i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁						
	SM22	<i>fwnA</i> ₁			<i>argA</i> ₁				
	SV12	<i>olvA</i> ₃ <i>nicA</i> ₁			<i>metA</i> ₁				
	SM13	<i>fwnA</i> ₁		<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁				
N 4 0 2	N620	<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	<i>bioA</i> ₁ <i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁		
	N655	<i>fwnA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>bioA</i> ₁ <i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	<i>metB</i> ₁	<i>pabA</i> ₁		
	N669	<i>olvA</i> ₃	<i>hisD</i> ₄	<i>bioA</i> ₁ <i>lysA</i> ₇	<i>argF</i> ₈	<i>nicA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂		
	N690	<i>fwnA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>bioA</i> ₁ <i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	<i>nicA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂		
	N805	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>bioA</i> ₁ <i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	<i>metB</i> ₁₀	<i>pabA</i> ₁	<i>cnxC</i> ₅	
	N823	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁		<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	
	N849	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	<i>nirA</i> ₃
	N868			<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>oliC</i> ₂	
	N875		<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	<i>crnB</i> ₁₂
	N889	<i>fwnA</i> ₁		<i>bioA</i> ₁ <i>pyrA</i> ₅		<i>pheA</i> ₁		<i>lysF</i> ₂₉	
	N890	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₂₅	<i>oliC</i> ₂	<i>crnB</i> ₁₂
	N894	<i>olvA</i> ₁	<i>leuC</i> ₅						<i>pyrD</i> ₈

*- as siglas referem-se a:

arg: deficiência nutricional para arginina

bio: deficiência nutricional para biotina

crn: clorato resistente
fvn: conídios de coloração marrom
his: deficiência nutricional para histidina
leu: deficiência nutricional para leucina
lys: deficiência nutricional para lisina
met: deficiência nutricional para metionina
nic: deficiência nutricional para ácido nicotínico
ntr: deficiência nutricional para ácido nicotínico ou triptofano
oli: oligomicina resistente
pyr: deficiência nutricional para uridina
olv: conídios de coloração verde-oliva
pab: deficiência nutricional para ácido *p*-aminobenzóico
pdx: deficiência nutricional para piridoxina
phe: deficiência nutricional para fenilalanina
trp: deficiência nutricional para triptofano

3.2. Meios de Cultura

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

Nitrato de sódio	6,00g
Cloreto de potássio	0,52g
Sulfato de magnésio	0,52g
Fosfato diidrogenado de potássio	1,52g
Sulfato de ferro	traços
Sulfato de zinco	traços
Glicose	10,00g
Água destilada, completado para	1.0 litro

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH (1N) ou HCl (1N).
Para obter o meio sólido, foram adicionados 15g de ágar por litro.

3.2.2. Meio Completo (MC) (PONTECORVO e col., 1953b, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973)

Adicionou-se a 1 litro de MM:

Peptona	2,0g
Caseína hidrolizada	1,5g
Extrato de leveduras	0,5g
Solução de vitaminas (item 3.3.3.)	1 ml

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH (1N) ou HCl (1N).
Para se obter o meio sólido, foram adicionados 15g de ágar por litro.

3.2.3. Meio Mínimo líquido mais 4% de Meio Completo (MM + 4% MC)

Foi adicionado ao MM (item 3.2.1.) líquido, 4% de MC (item 3.2.2.) líquido e, da solução final, alíquotas de 2,5 ml da solução final foram distribuídas em tubos de ensaio. Os tubos foram autoclavados e conservados em refrigerador a 4°C.

3.2.4. Meio para produção de micélio (MCS)

Ao Meio Mínimo líquido adicionou-se:

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

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH (1N) ou HCl (1N). O meio foi suplementado com as substâncias para as quais as linhagens eram deficientes.

3.3. Soluções

3.3.1. Solução de Tween 80 (0,1%)

Foi adicionado Tween 80 à água destilada em uma concentração de 0,1% (v/v). Foram colocados 2,5 ml em tubos de ensaio os quais foram autoclavados e conservados em refrigerador a 4°C.

3.3.2. Solução Salina (0,85%)

Adicionaram-se 8,5g de cloreto de sódio em 1 litro de água destilada. Foram colocados 9 ml dessa solução em frascos com tampa de baquelite e, em seguida, autoclavados.

3.3.3. Solução de Vitaminas

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

A solução foi estocada em frasco escuro e o mesmo foi colocado em banho-maria a 60°C por 30 minutos, repetindo-se a operação durante 3 dias consecutivos. A conservação foi feita em refrigerador a 4°C sobre clorofórmio.

3.3.4. Solução de Benlate

Em um frasco escuro, previamente esterilizado, foram colocados 60 mg de Benlate (fungicida: Metil-1 (butil-carbamoil)-2-Benzimidazole-carbamato) mais 1ml de acetona e, após homogeneizar, completou-se o volume para 100 ml com água destilada esterilizada. A solução foi então agitada e conservada em refrigerador.

3.3.5. Solução lisol 10%

Foi adicionado 1 ml de lisoforme em 9 ml de água destilada esterilizada. A solução foi estocada e conservada em refrigerador a 4°C.

3.3.6. Suplementos adicionados aos Meios de Cultura

Quando necessários, os requisitos nutricionais das linhagens em estudos foram adicionados na concentração final de até 5 µg/ml variando para as diferentes vitaminas (ver item 3.3.3) e 50 µg/ml para aminoácidos.

3.3.7. Tampão fosfato 0,2 M (pH 5,8)

Solução A - fosfato dihidrogenado de potássio

Solução B - fosfato hidrogenado de sódio

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

3.3.8. Solução de KCl 1,2 M

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

3.3.9. Solução de KCl 0,9 M

Adicionaram-se 67,09 g de KCl em água destilada e completou-se o volume final para 1 litro. A seguir, a solução foi esterilizada de acordo como descrito no item 3.4.

3.3.10. Solução de KCl 0,6 M

Misturaram-se volumes iguais de KCl 1,2 M e tampão fosfato pH 5,8 (item 3.3.7).

3.3.11. Solução MgSO₄ 1,2 M

Dissolveram-se 317,36 g de MgSO₄ em 500 ml de solução A (item 3.3.7). O pH final foi ajustado para 5,8 adicionando-se a solução B. Completou-se o volume para 1 litro com tampão fosfato pH 5,8.

3.3.12. Solução MgSO₄ 1,0 M

Dissolveram-se 246,47 g de MgSO₄ em 500 ml de solução A (item 3.3.7). O pH final foi ajustado para 5,8 adicionando-se a solução B. Completou-se o volume para 1 litro com tampão fosfato pH 5,8.

3.3.13. Solução MgSO₄ 0,5 M

Misturaram-se volumes iguais de MgSO₄ 1,0 M e tampão fosfato pH 5,8 (item 3.3.7.)

3.3.14. Solução sacarose 1,2 M

Dissolveram-se 410,78 g de sacarose em 500 ml de solução A (item 3.3.7). O pH final foi ajustado para 5,8 adicionando-se a solução B. Completou-se o volume para 1 litro com tampão fosfato pH 5,8.

3.3.15. Solução sacarose 1,0 M

Dissolveram-se 342,31 g de sacarose em 500 ml de solução A (item 3.3.7). O pH final foi ajustado para 5,8 adicionando-se a solução B. Completou-se o volume para 1 litro com tampão fosfato pH 5,8.

3.3.16. Solução sacarose 0,8 M

Dissolveram-se 273,85 g de sacarose em 500 ml de solução A (item 3.3.7). O pH final foi ajustado para 5,8 adicionando-se a solução B. Completou-se o volume para 1 litro com tampão fosfato pH 5,8.

3.3.17. Solução NaCl 0,7 M / CaCl₂ 0,2 M

Dissolveram-se 40,1 g de NaCl e 29,4 g de CaCl₂ em 500 ml da solução A (item 3.3.7). O pH final foi ajustado para 5,8 adicionando-se a solução B. Completou-se o volume para 1 litro com tampão fosfato pH 5,8.

3.3.18. Solução SE

Sorbitol	1 M
EDTA	50 mM

3.3.19. Solução LMA -SE

Low melting agarose	1,4%
Sorbitol	1M
EDTA	250 mM

3.3.20. Solução de Sarcosyl - EDTA - proteinase K

N.laurylsarcosinato de sódio	1% (p/v)
EDTA	0,5 M
Proteinase K	1 mg/ml

3.3.21. Solução tampão TAE (50x ; solução estoque)

Tris	40 mM
Ácido Acético	57,1ml
EDTA (0,5 M)	100 ml

Dissolveram-se 242 g de Tris em 700 ml de água destilada, adicionaram-se 100 ml de solução EDTA 0,5 M e completou-se o volume para 942,9 ml com água destilada. Por último, adicionou-se cuidadosamente o ácido acético.

3.4. Esterilização e temperatura de incubação

Todos os meios de cultura e soluções usados foram esterilizados em autoclave à temperatura de 120°C e 1 atmosfera de pressão, durante 20 minutos, a não ser quando especificado de maneira diferente.

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

3.5. Método de cultivo e manutenção da linhagens

As culturas foram inoculadas em placas de Petri contendo MC (item 3.2.2.) ou MM (item 3.2.1.) quando diplóides, e incubadas para crescimento vegetativo. A manutenção das culturas foi feita em tubos de ensaio contendo MC ou MM (no caso dos diplóides) inclinado a 4°C.

3.6. Obtenção e caracterização dos diplóides

3.6.1. Obtenção dos diplóides

Os diplóides foram obtidos, via ciclo parassexual, pelas técnicas descritas a seguir.

3.6.1.1 Através de método de ROPER (1952)

Suspensão de conídios de cada uma das linhagens selecionadas para cruzamento foram feitas em tubos de ensaio contendo MM líquido mais 4% de MC (item 3.2.3.). Após misturar as duas suspensões estas foram incubadas por 2-3 dias. As películas desenvolvidas foram cortadas em 4 pedaços com auxílio de uma alça de níquel-cromo e transferidas para placas de Petri contendo MM (item 3.2.1.) sendo então, incubadas por 5-7 dias.

Havendo evidências que o heterocário havia sido formado, coletou-se cerca de 10^7 conídios em solução Tween (item 3.3.1.), diluiu-se em salina (1:10) (item 3.3.2.), semeando-se alíquotas de 0,1 ml em placas contendo MM para isolamento de possíveis diplóides. As placas foram incubadas por 7 dias.

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

3.6.1.2. Através do método de INGLE e HASTIE (1974), modificado por VENEZIANO - LABATE (1989).

Em um tubo de ensaio contendo 2 ml de MC líquido foram colocados 10^6 esporos por ml de cada linhagem envolvida no cruzamento. Após agitação, retiraram-se gotículas dessa suspensão de esporos as quais foram colocadas numa placa de Petri descartável. A placa foi então invertida e, na tampa, foi colocado papel filtro previamente esterilizado, o qual foi umidecido com água destilada esterilizada. Após vedar a placa com parafilme, a mesma foi incubada a 28°C por 16-18 horas. As películas formadas pelo crescimento do micélio foram lavadas com salina esterilizada e transferidas para placas de Petri contendo MM.

As colônias crescidas que apresentavam coloração e morfologia uniforme, foram isoladas e purificadas em MM sólido. Após crescimento, foi feita a caracterização dos possíveis diplóides. No caso do diplóide *N849 AB4.1ΔGLA* o MM foi suplementado com fleomicina e dos diplóides *N890 ABI.1* e *N890 ΔΔ20*, o MM foi suplementado com oligomicina, ambos na concentração final de 1 µg/ml.

3.6.2. Caracterização dos diplóides

Os critérios utilizados para caracterização dos diplóides foram os seguintes:

A- Prototrofia: cruzando-se linhagens com diferentes marcas genéticas, os diplóides devem ser prototróficos (as marcas se complementam), crescendo portanto, em Meio Mínimo.

B- Coloração de Conídios: quando os haplóides envolvidos no cruzamento são de coloração diferente, espera-se uma colônia com coloração da linhagem selvagem devido à complementação.

C- Diâmetro de Conídios: espera-se que o diâmetro dos conídios dos diplóides seja ao redor de 1,2 vezes maior que as linhagens parentais haplóides (BONATELLI Jr. e col., 1983). O diâmetro de conídios das linhagens parentais (haplóides) e dos possíveis diplóides foram medidos com uma objetiva micrométrica em montagem em lâmina com lisol 10% (item 3.3.5.), após 7 dias de crescimento da linhagem em MM (item 3.2.1.) ou, MC (item 3.2.2.) no caso dos haplóides. Foram medidos 30 conídios por linhagem em estudo.

D- Teste com Benlate (HASTIE, 1970 e UPSHALL e col., 1976) - os possíveis diplóides foram inoculados em placas com MC contendo 0,25 a 1,0 µg/ml de Benlate (item 3.3.4.). O controle foi feito em MC sem Benlate. Verifica-se a

formação de setores e crescimento reduzido em relação às parentais haplóides, quando linhagens diplóides são inoculadas em meio de cultura com Benlate.

3.7. Obtenção e caracterização dos segregantes haplóides

3.7.1. Obtenção

O isolamento dos segregantes foi feito inoculando-se os diplóides em 4 pontos equidistantes em placas de Petri com MC (item 3.2.2.) mais os requisitos nutricionais necessários (item 3.3.6.). Adicionou-se também 0,25 a 1,0 $\mu\text{l/ml}$ de Benlate (item 3.3.4.). As placas foram incubadas durante 5-6 dias. Os setores formados nas colônias diplóides foram purificados em MC e, a seguir, estocados em tubos de ensaio contendo MC inclinado.

Outro procedimento empregado para a obtenção de segregantes foi a semeadura de uma suspensão de conídios (ao redor de 10^3 conídios/placa de Petri) dos diplóides por "pour plate" em MC adicionado de Benlate e dos requisitos nutricionais quando necessários (BOS e col., 1988). Desta forma, pode-se obter um maior número de segregantes verde-oliva (contendo o gene *olvA₁*), os quais geralmente crescem mais devagar que os marrom-claro (contendo o gene *fmnA₁*). Com ajuda de uma alça de platina e uma lupa, isolou-se apenas um conídio de cada setor segregante que, após purificação, foram caracterizados pelos critérios propostos.

3.7.2. Caracterização

Os segregantes foram caracterizados quanto à coloração dos conídios e à auxotrofia. Para a determinação das marcas auxotróficas dos segregantes, utilizou-se uma bateria de placas de Petri com MC, MM, MM

adicionado de todos os requisitos nutricionais envolvidos e ainda, uma série de placas contendo MM mais todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento menos um deles. A avaliação do crescimento foi feita após 1 e 2 dias de crescimento.

Em todas as análises genéticas dos diplóides heterozigotos, somente os segregantes haplóides foram utilizados. Segregantes diplóides foram descartados e, em caso de dúvida, utilizou-se o critério de diâmetro de conídios para separar haplóides de diplóides.

3.8. Obtenção de protoplastos

Suspensão de 10^6 conídios/ml foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 ml com 50 ml de MCS (item 3.2.4) mais o(s) complemento(s) nutricional(is) exigido(s) para cada linhagem.

Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 120 - 160 rpm por 18 horas a 30°C para crescimento do micélio. O micélio, em fase exponencial de crescimento, foi filtrado e lavado 3 vezes com estabilizador osmótico concentrado (KCl 1,2 M; MgSO₄ 1,0 M ou sacarose 1,2 M ou 1,0M). Esse procedimento foi facilitado pelo uso de bomba à vácuo acoplada ao funil de Buchner, contendo papel filtro previamente esterilizado. O peso úmido do micélio foi determinado e quantidades de 50 mg de micélio foram ressuspensas em 1 ml de estabilizador osmótico mais 10 mg/ml da enzima de digestão. A seguir, o material foi incubado em agitador recíproco a 30°C por 2-3 horas. Ao longo desse tempo, alíquotas foram retiradas para o monitoramento em microscópio da quantidade de protoplastos liberados. A mistura foi filtrada em filtro de nylon de 100 µm e, em seguida, centrifugada a 400g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado 3 vezes com o estabilizador osmótico. O número de protoplastos foi estimado em lâmina hematimétrica.

3.8.1 Variações ensaiadas ao longo do trabalho em experimentos separados

Ensaaiaram-se diferentes soluções osmóticas e enzimas, bem como variou-se o tempo de crescimento do micélio, o meio e a forma de crescimento e o pré - tratamento do micélio, conforme especificado a seguir:

1- As soluções osmóticas ensaiadas foram: KCl 0,6M; KCl 0,9M; MgSO₄ 1,0M e 0,5M; sacarose 1,2M, 1,0M ou 0,8M e NaCl 0,7M-CaCl₂ 0,2M. Todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato, pH 5,8 (item 3.3.7), com exceção de KCl 0,9M (item 3.3.9).

2- As enzimas utilizadas foram: Novozym 234, Cellulase CP, lysing enzyme (de *Trichoderma harzianum*), driselase, onozuka, hemicelulase, macerozyme, meicelase ou helicase ("snail enzyme").

3- O tempo de crescimento do micélio variou de 9 a 23 horas.

4- O meio de cultura para crescimento do micélio em MC (item 3.2.2) ou em MM (item 3.2.1)

5- Efetuou-se ou não Pré-tratamento do micélio com ditiotreitól por 1:30 hs

6- Suspensões bem concentrada de conídios foram semeadas, com o auxílio de um pincel nº 4, em placas de Petri contendo MC sólido coberto por uma película de papel celofane. Após 16 ~ 18 horas de crescimento, retirou-se o papel celofane o qual foi transferido para uma Placa de Petri contendo KCl 0,9 M mais 0,5 % da enzima Novozym 234 e 1 % de helicase ("snail enzyme").

3.9. Preparação das amostras de DNA cromossômico íntegro para eletroforese de campo pulsado

A suspensão de protoplastos obtida no item 3.8. foi aquecida em banho - maria a 50°C durante 5 minutos e a seguir, misturou-se igual volume de agarose 1,4% (LMA - "low melting agarose") preparada em solução SE (item 3.3.19). A mistura foi homogeneizada lentamente, colocada em moldes e deixada solidificar. Após solidificação, as inclusões (também chamadas de "plugs") foram imersas em solução de sarcosyl - EDTA - proteinase K (item 3.3.20) a 50°C durante 24 horas. Substituiu-se então o sarcosyl - EDTA - proteinase K por EDTA 50 mM e incubou-se mais 24 horas. As inclusões foram estocadas em EDTA 50 mM a 4°C.

3.10. Eletroforese de campo pulsado

O equipamento usado para a eletroforese em campo pulsado foi o CHEF - DR II (Bio Rad), que propicia em ângulo de 120° entre os campos elétricos. O tampão de corrida foi o TAE (item 3.3.21).

Os parâmetros eletroforéticos (tempo de pulso, tempo de corrida e voltagem) e a concentração de agarose no gel foram variados durante as corridas. A agarose do gel foi preparada em tampão TAE. Os "plugs" foram inseridos nas canaletas e selados com a agarose. A temperatura mantida durante a corrida foi de 4°C a 12°C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção e caracterização de diplóides

Com o objetivo de se verificar a complementação dos marcadores genéticos presentes nos grupos de ligação I, II, III e IV das linhagens mutantes derivadas da linhagem *10v10* de *A. niger*, diplóides foram sintetizados, via ciclo parassexual (item 3. 6. 1.), entre as linhagens derivadas da *10v10* e as linhagens mestras derivadas da linhagem *N402* (item 3.1). Os diplóides obtidos foram caracterizados segundo os critérios propostos no item 3. 6. 2. e os resultados estão resumidos na TABELA 1.

TABELA 1 - Características dos diplóides e respectivos parentais haplóides.

linhagens haplóides	coloração de conídios	segregação em Benlate	média do diâmetro dos conídios (μm)	relação 2n/parentais
1- <i>NO</i>	verde-oliva	-	4,5	
2- <i>PNO</i>	verde-oliva	-	4,7	
3- <i>SM13</i>	marrom-claro	-	4,1	
4- <i>SM22</i>	marrom-claro	-	4,1	
5- <i>SF12</i>	verde-oliva	-	5,1	
6- <i>N620</i>	marrom-claro	-	4,0	
7- <i>N655</i>	marrom-claro	-	3,6	
8- <i>N669</i>	verde-oliva	-	4,5	
linhagens diplóides				1* / 2**
1* x 6**	preto	+	5,8	1,3 / 1,4
2* x 7**	preto	+	5,7	1,2 / 1,6
3* x 8**	preto	+	6,1	1,5 / 1,3
4* x 8**	preto	+	5,6	1,3 / 1,2
5* x 7**	preto	+	6,1	1,2 / 1,7

*. primeiro parental; **. segundo parental em questão.

A frequência de diplóides heterozigotos encontrada foi de 10^{-6} , apesar de haver muita variação entre os heterocários. LHOAS (1967) trabalhando com outra linhagem de *A. niger* relatou a obtenção de 1 diplóide em 10^4 conídios. Já BONATELLI Jr. (1981) na linhagem 10v10 de *A. niger* e BOS (1985) na linhagem N402 também de *A. niger* obtiveram 1 diplóide em 10^5 e 1 em 10^6 conídios, respectivamente. Muitas vezes, a frequência de heterocários observada, foi maior que a de diplóides, um fenômeno também mencionado por DEBETS e col. (1989).

Todos os diplóides obtidos se assemelham quanto a coloração de conídios à linhagem selvagem, apresentando diâmetro de conídios 1,2 a 1,7 vezes maior que o apresentado pelas linhagens parentais, podendo-se inferir, portanto, que os conídios dos diplóides possuem no mínimo o dobro do volume dos haplóides. Resultados similares quanto ao diâmetro de conídios maior nos diplóides foram obtidos por PONTECORVO e ROPER (1952) em *A. nidulans*, VIALTA (1987) em *A. awamori* e, em *A. niger* por PONTECORVO e col. (1953a), LHOAS (1967, 1968), CHANG e col. (1974), DAS e ROY (1978), BONATELLI Jr. e col. (1983), VALENT (1985), BOS (1985), MASIERO (1988) e CALIL (1988).

Os diplóides, quando inoculados em meio completo mais Benlate, apresentam colônias reduzidas com formação de setores com conídios de coloração igual às respectivas linhagens parentais (UPSHALL e col., 1976; BRADSHAW e col., 1983; BONATELLI Jr., 1981; BONATELLI Jr. e col., 1983; VALENT, 1985; VIALTA, 1987; MASIERO, 1988; CALIL, 1988; DEBETS, 1990b,c), comportamento este, também encontrado nos diplóides sintetizados neste trabalho.

Os dados referentes a complementação dos marcadores genéticos nos diplóides obtidos, estão descritos no item 4.2.

4.2. Complementação dos marcadores genéticos

4.2.1. Diplóide *N620//NO*

Neste diplóide, houve complementação dos marcadores *nicA*₁ (GL V, *N620*) e *nicA*₁ (GL I, *NO*), observado pelo crescimento do diplóide em Meio Mínimo. Os segregantes obtidos conforme metodologia descrita no item 3.7.1., foram caracterizados de acordo com o descrito no item 3.7.2. juntamente com as linhagens parentais como controle. Os resultados da auxanografia e características morfológicas dos segregantes estão na TABELA 2.

O teste de auxanografia, acima referido, mostrou que 11 segregantes cresceram em MM (item 3.2.1.), indicando serem segregantes prototróficos, e 39, não cresceram em MM porém, cresceram em todos os meios de cultura ensaiados. Tendo em vista que a linhagem *N620* mostrou comportamento esperado e, isto não ocorreu com a *NO*, imaginou-se que pudesse estar havendo interação entre requisito(s) nutricional(is) da primeira com a segunda.

Na tentativa de esclarecer esses resultados e com base no que foi evidenciado em animais e em *Neurospora* que o ácido nicotínico é biossintetizado a partir do triptofano através do ácido 3-hidroxi-antranílico (BROWN e REYNOLDS, 1983), foi feito um teste de auxanografia com 18 segregantes e vários controles em meios com e sem ácido nicotínico (**nic**) e/ou triptofano (**trp**) e, pelos resultados obtidos (TABELA 3) pode-se observar que, a linhagem *NO*, que contém a marca *nicA*₁ (GL I), cresceu em MM mais **nic** e MM mais **trp**, assim como a *NO* e *PNO* cresceram em MM mais **T** (**T** significa, neste caso, todos os requerimentos nutricionais envolvidos no cruzamento) menos **nic** e MM mais **T** menos **trp** e não cresceram em MM mais **T** menos **nic** menos **trp**, o

que não é observado na linhagem *N620*. Entre os segregantes ensaiados, 16 apresentaram o mesmo resultado, sugerindo que são portadores da marca *nicA*₁ presente no grupo de ligação I da linhagem parental *NO*. Os outros 2 segregantes mostraram-se prototróficos como já havia sido detectado no teste anterior (TABELA 2). Mutantes deficientes para o ácido nicotínico que apresentavam crescimento em triptofano também foram obtidos por DEBETS (comunicação pessoal), os quais foram chamados de *ntr*, sendo que as mutações *ntrB*₃ e *ntrC*₄ estão mapeadas no GL V e *ntrD*₅ mapeada no GL I. Diplóide entre *nicA*₁ e *ntrB*₃ apresentou complementação entre esses marcadores (dados não apresentados).

Os resultados da análise nutricional e morfológica nos permitem deduzir que há heterozigose dos marcadores *nicA*₁, *fvnA*₁ e *olvA*₃ do grupo de ligação I de ambas as linhagens e, *cspA*₁ da linhagem *N620*, a qual, inclusive apareceu nos segregantes na proporção 1:1 (26:24).

A não detecção de heterozigose para as demais marcas nutricionais pode ter tido como origem a não-disjunção pois, em outros diplóides foi observado heterozigose para os marcadores que não segregaram neste cruzamento.

TABELA 2 - Resultados do teste de auxotrofia dos segregantes do diplóide *N620 NO* em relação aos marcadores auxotróficos e morfológicos.

segregantes	MC	MM+ T*	MM	MM+ T-pab	MM+ T-nic	MM+ T-trp	MM+ T-bio	MM+ T-lys	MM+ T-leu	csp	cor
S01	+**	+	+	+	+	+	+	+	+	+	fwn
S02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	fwn
S03	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv
S04	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv
S05	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S06	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S07	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv
S08	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S09	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S10	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv
S11	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv
S12	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv
S13	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv
S14	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S15	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S16	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S17	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv
S18	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv
S19	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	fwn
S21	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S22	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv
S23	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv
S24	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S25	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S26	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	fwn
S28	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S29	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	fwn
S31	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S32	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv
S33	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv
S34	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	fwn
S36	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S37	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	fwn
S39	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S40	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv

continua na página seguinte

continuação da TABELA 2

segregantes	MC	MM+ T	MM	MM+ T-pab	MM+ T-nic	MM+ T-trp	MM+ T-bio	MM+ T-lys	MM+ T-leu	csp	cor
S41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	fwn
S42	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv
S43	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	olv
S44	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	fwn
S46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	fwn
S47	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S48	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S49	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv
S50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	fwn
parentais											
<i>N620</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	fwn
<i>NO</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	olv

* T. significa, todos os requisitos nutricionais necessários para o crescimento; pab= ácido *p*.aminobenzóico; nic= ácido nicotínico; trp= triptofano; bio= biotina; lys= lisina; leu= leucina; csp= altura dos conidióforos: baixos (-) ou altos (+).

** Os sinais + e - indicam, respectivamente, crescimento e ausência de crescimento.

TABELA 3 - Marcadores auxotróficos e morfológicos de alguns segregantes do diplóide *N620 NO* e diferentes linhagens como controle.

	MC+ trp	MM +T*	MM + T -nic-trp	MM + T-nic	MM + T-trp	MM + nic+trp	MM +nic	MM +trp	MM	COR
controles										
<i>NO</i>	+++	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
<i>PNO</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	olv
<i>PF</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	fwn
<i>SM22</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	fwn
<i>N620</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	olv
<i>N655</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	fwn
segregantes										
S2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	olv
S3	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S4	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S5	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S6	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S7	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S8	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S9	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S10	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S11	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S12	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S13	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S14	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S15	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S16	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S17	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S19	+	+	-	+	+	+	+	+	-	olv
S20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	fwn

* T , significa, todos os requisitos nutricionais necessários para o crescimento;
nic= ácido nicotínico; trp= triptofano.

** Os sinais + e - indicam, respectivamente, crescimento e ausência de crescimento.

4.2.2. Diplóide *N655//PNO*

O diplóide obtido deste cruzamento (*N655 e PNO*) cresceu em MM, podendo-se inferir, portanto, que houve complementação da marca *pab*⁻ presente em ambas as parentais ou seja, *pabA*₁ do GL II da linhagem *PNO* e *pabA*₁ do GL VI da linhagem *N655*.

Pelo método descrito no item 3.7.1., foram isolados 54 segregantes, os quais foram caracterizados segundo a morfologia e auxotrofia (TABELA 4). Nenhum segregante *leuA*₁ foi detectado, o que sugere homozigose da marca como observado na segregação do diplóide *N620 NO* (item 4.2.1.). Entre os recombinantes haplóides obtidos por LHOAS (1967) também foi observado, em alguns casos, a predominância de alguns prototróficos para os marcadores estudados. Ele explicou isso por viabilidade reduzida do recombinante auxotrófico no meio para haploidização com p-fluorfenilalanina. Neste trabalho entretanto, foi utilizado o Benlate como agente haploidizante mais o fator de crescimento essencial e não foi observado diferença significativa na viabilidade dos segregantes haplóides (observado pelo tamanho da colônia) carregando uma ou mais marcas auxotróficas envolvidas. É portanto improvável que a ausência de recombinantes auxotróficos haplóides seja causada pela viabilidade reduzida durante haploidização. Uma explicação mais provável para a predominância de recombinantes prototróficos é a ocorrência no diplóide heterozigoto de um recombinante homozigoto para o alelo do tipo selvagem. Tal recombinante pode resultar de uma permuta durante o desenvolvimento do diplóide heterozigoto. Segregação de um recombinante diplóide prototrófico é viável em MM, enquanto o recíproco, recombinante auxotrófico não segregaria nesse meio. Outra causa poderia ser a mesma aventada anteriormente, ou seja, não-disjunção dos cromossomos homólogos.

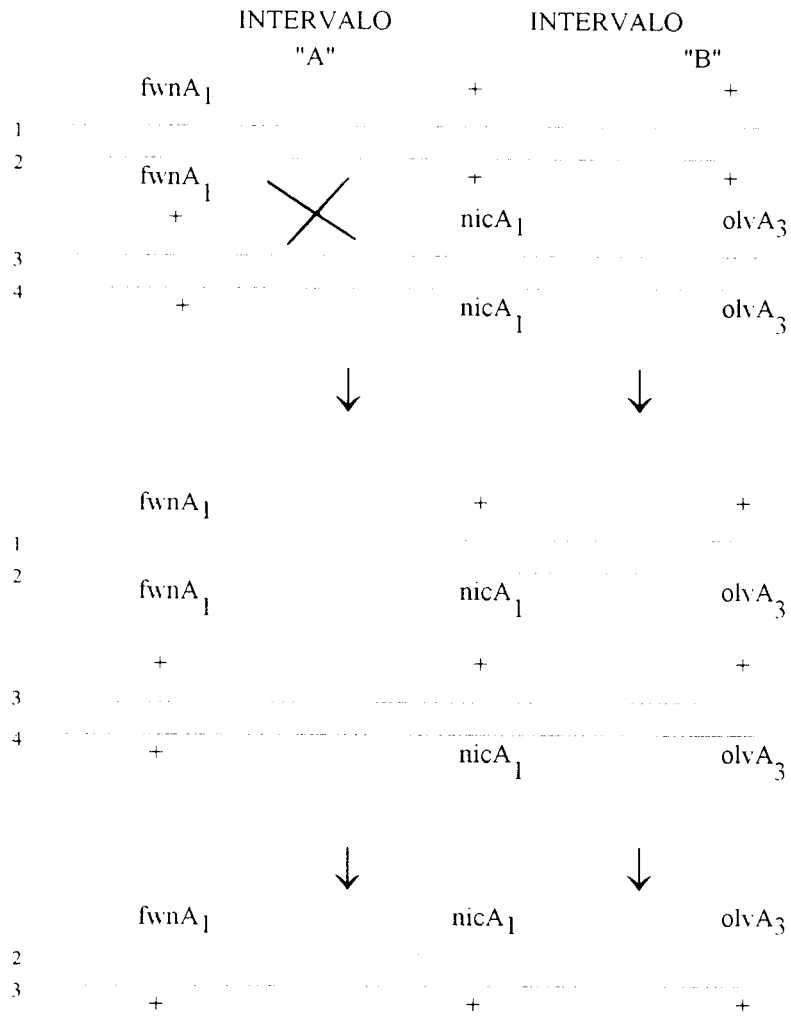
TABELA 4 - Genótipo dos segregantes do diplóide *N655 PNO* e respectivos parentais.

<i>N655</i>	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	<i>lysA₇</i>	<i>bioA₁</i>	<i>leuA₁</i>	<i>metB₁</i>	<i>pabA₁</i>	+	<i>cspA₁</i>	nº de segregantes
<i>PNO</i>	<i>olvA₃</i>	+	+	+	+	+	<i>pabA₁</i>	<i>nicA₁</i>	+	
	<i>fwnA₁</i>	+	+	<i>bioA₁</i>	+	+	+	<i>nicA₁</i>	<i>cspA₁</i>	13
	<i>fwnA₁</i>	+	+	<i>bioA₁</i>	+	+	+	+	<i>cspA₁</i>	1
	<i>fwnA₁</i>	+	+	+	+	+	+	<i>nicA₁</i>	<i>cspA₁</i>	23
	<i>fwnA₁</i>	+	+	+	+	+	+	<i>nicA₁</i>	+	2
	<i>olvA₃</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	1
	<i>fwnA₁</i>	+	<i>lysA₇</i>	+	+	+	+	<i>nicA₁</i>	<i>cspA₁</i>	7
	<i>fwnA₁</i>	+	<i>lysA₇</i>	<i>bioA₁</i>	+	+	+	<i>nicA₁</i>	<i>cspA₁</i>	1
	<i>olvA₃</i>	+	+	<i>bioA₁</i>	+	+	<i>pabA₁</i>	<i>nicA₁</i>	<i>cspA₁</i>	1
	<i>olvA₃</i>	<i>hisD₄</i>	<i>lysA₇</i>	<i>bioA₁</i>	+	+	<i>pabA₁</i>	+	+	2
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	<i>lysA₇</i>	+	+	+	+	<i>nicA₁</i>	<i>cspA₁</i>	1
	<i>olvA₃</i>	<i>hisD₄</i>	+	<i>bioA₁</i>	+	+	<i>pabA₁</i>	<i>nicA₁</i>	<i>cspA₁</i>	1
	<i>fwnA₁</i>	+	<i>lysA₇</i>	+	+	<i>metB₁</i>	+	<i>nicA₁</i>	<i>cspA₁</i>	1
Total										54

O grupo de ligação I da linhagem *PNO*, tem os marcadores *nicA₁* e *olvA₃* em associação e, o grupo equivalente da linhagem *N655*, tem o gene *fwnA₁* associado provavelmente com o alelo *nicA₁⁺* como constatado na análise do diplóide *N620 NO*. Porém, na segregação do diplóide agora estudado, pode ser observado que os segregantes *fwnA₁* são na sua totalidade *nicA₁*. A sugestão que pode explicar tal constatação envolve permuta no intervalo "A" e, segregação das cromátides 2 e 3 para o mesmo polo na formação do diplóide isolado como apresentado na FIGURA 1.

Deve-se considerar que a marca *fwnA₁* é epistática sobre *olvA₃* (LHOAS, 1967). Esses eventos também explicariam o aparecimento de segregantes *olvA₃ nicA₁⁺* e *olvA₃ nicA₁*.

FIGURA 1 - Modelo sugerido para formação do diplóide *N655* PNO.



4.2.3. Diplóide *N669//SM13*

O diplóide obtido do cruzamento entre as linhagens *N669* e *SM13*, se encontra dentro dos critérios propostos para a caracterização de diplóides (item 3.6.2.). Em relação à marca auxotrófica lisina, presente nas duas parentais envolvidas no cruzamento, houve complementação no diplóide, sugerindo portanto, que o gene *lysA₁* (GL III da linhagem *SM13*) não é alelo do gene *lysA₇* presente no GL III da linhagem *N669* e, conseqüentemente, pode-se sugerir que não há equivalência entre esses grupos de ligação.

Foram isolados 76 segregantes e caracterizados segundo a morfologia e auxotrofia (item 3.7), os quais segregaram todos os marcadores envolvidas no cruzamento (TABELA 5).

Pela análise mitótica dos segregantes desse diplóide (TABELA 6), podemos observar uma baixa porcentagem de recombinação entre os marcadores *nicA₁*, presente no grupo de ligação V da linhagem *N669* e *metA₁*, presente no grupo de ligação IV da linhagem *SM13* (7,9%), sugerindo equivalência dos grupos de ligação. Ainda em relação à marca *metA₁*, há evidências de ligação com a marca *cspA₁* da linhagem *N669* pois, a análise dos segregantes mostrou 14,6% de recombinação entre os genes *metA₁* - *cspA₁*, assim como entre *nicA₁* - *cspA₁* a porcentagem de recombinação foi de 11,8%. Portanto, pelos resultados obtidos há uma forte indicação da equivalência do grupo de ligação IV da linhagem *SM13* que contém o gene *metA₁*, com o grupo de ligação V da linhagem *N669* que contém o gene *nicA₁*, como também sugere que o gene *cspA₁* da linhagem *N669* deve estar nesse mesmo grupo de ligação. Tomando-se em conta que a linhagem *N669* é auxotrófica para biotina (*bio⁻*) e lisina (*lys⁻*), e a *SM13* prototrófica para biotina e auxotrófica para lisina, mas com lisina em outro grupo de ligação, podemos esperar poucos segregantes *bio⁻*, *lys⁺* na permuta mitótica e, como podemos observar na TABELA 5, houve 4 segregantes com o genótipo *bio⁻*, *lys⁺*. Portanto, o recíproco daria 8, numa porcentagem de recombinação ao redor

de 10,4% para esses marcadores, o que confirma a ligação entre *bioA*₁ e *lysA*₇ no GL III da linhagem *N402*.

TABELA 5 - Genótipo dos segregantes do diplóide N669//SM13 e respectivos parentais.

N669	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>lysA</i> ₇	<i>bioA</i> ₁	<i>argF</i> ₈	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	no de segregantes
SM13	<i>fwnA</i> ₁	+	<i>lysA</i> ₁	+	+	+	+	<i>metA</i> ₁	+	
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	+	+	<i>cspA</i> ₁	16
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	+	+	<i>metA</i> ₁	+	8
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	+	+	<i>argF</i> ₈	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	4
	<i>fwnA</i> ₁	+	<i>lys</i>	+	+	<i>nicA</i> ₁	+	+	<i>cspA</i> ₁	4
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>bioA</i> ₁	+	+	+	<i>metA</i> ₁	+	3
	<i>olvA</i> ₁	+	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	3
	<i>fwnA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	3
	<i>fwnA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	+	+	<i>cspA</i> ₁	2
	<i>fwnA</i> ₁	+	<i>lys</i>	+	<i>argF</i> ₈	<i>nicA</i> ₁	+	+	<i>cspA</i> ₁	2
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	2
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>lys</i>	+	<i>argF</i> ₈	<i>nicA</i> ₁	+	+	+	2
	<i>olvA</i> ₁	+	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	+	+	<i>cspA</i> ₁	2
	<i>olvA</i> ₁	+	+	+	<i>argF</i> ₈	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₁	+	+	+	+	+	+	+	+	2
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	+	<i>lys</i>	+	<i>argF</i> ₈	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	+	<i>lys</i>	+	<i>argF</i> ₈	+	<i>pabA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	1
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	+	+	<i>metA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	+	<i>bioA</i> ₁	+	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>lys</i>	+	+	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>lys</i>	+	+	<i>nicA</i> ₁	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	+	+	+	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>lys</i>	+	<i>argF</i> ₈	<i>nicA</i> ₁	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	1
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>lys</i>	+	<i>argF</i> ₈	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	+	1
	<i>fwnA</i> ₁	+	<i>lys</i>	<i>bioA</i> ₁	<i>argF</i> ₈	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	+	+	<i>argF</i> ₈	<i>nicA</i> ₁	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₁	+	+	+	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>lys</i>	+	<i>argF</i> ₈	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	1
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	+	1
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>lys</i>	+	+	<i>nicA</i> ₁	+	+	+	1
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	+	+	+	+	+	+	+	1
	<i>fwnA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>lys</i>	+	+	+	+	<i>metA</i> ₁	+	1
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>lys</i>	+	+	<i>nicA</i> ₁	+	<i>metA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>lys</i>	+	+	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
Total										76

TABELA 6 - Análise mitótica e porcentagem de recombinação dos segregantes do diplóide N669//SM13.

	f	w	n	h	i	s	b	i	o	l	y	s	a	r	g	n	i	c	p	a	b	m	e	t	c	s	p	
f	+			+			+			+			+			+				+				+				
w											*																	
n						22.9 %			38.2 %									51.3 %										
h	+	9	39								*																	
i																												
s	-	20	8					36.8 %			*																	
b	+	28	46	47	27																							
i																												
o	-	1	1	1	1						*																	
l	+	21	32	36	17		52	1																				
y																												
s	-	8	15	12	11		22	1					*															
a	+	20	41	42	19		60	1	14	47																		
r																												
g	-	9	6	6	9		14	1	9	6																		
n	+	5	15	17	3		20	0	5	15																		
i																												
c	-	24	32	31	25		54	2	18	38																		
p	+	13	37	38	12		50	0	35	35																		
a																												
b	-	16	10	10	16		24	2	18	8																		
m	+	27	31	33	25		56	2	42	42																		
e																												
t	-	2	16	15	3		18	0	11	11																		
c	+	8	15	15	8		23	0	13	13																		
s																												
p	-	21	32	33	20		51	2	40	40																		

4.2.4. Diplóide *N669//SM22*

Este diplóide foi sintetizado com o objetivo de verificar se o gene *argA*₁, presente no grupo de ligação IV das linhagens derivadas da *10v10* de *A. niger* e o gene *argF*₈, presente no grupo de ligação IV da linhagem de referência eram alelos.

O diplóide obtido desse cruzamento cresceu em MM, uma evidência, portanto, de que os genes *argA*₁ e *argF*₈ não são alelos. Do diplóide formado em MM, foram isolados 64 segregantes e analisados segundo a auxotrofia, sendo que a proporção observada foi de 43 segregantes *arg*⁺ : 21 *arg*⁻ (TABELA 7).

Na tentativa de diferenciar a marca *arg*⁻ proveniente de uma ou de outra parental, foi feito teste com as linhagens *N669* e *SM22* em meio que continha prolina, ornitina ou citrulina no lugar de arginina e foi verificado que a linhagem *SM22*, após 3 dias de incubação, cresce em MM mais citrulina (dados não apresentados). Ensaio foram feitos com os segregantes *arg*⁻ em meio com citrulina, visando identificar se eram portadores do gene *argA*₁ ou *argF*₈. Porém, a análise não pode ser concluída pois, o comportamento da linhagem *SM22*, em MM mais citrulina mostrou-se instável. Em contrapartida, não se pode distinguir entre os segregantes contendo gene *argA*₁ ou gene *argF*₈.

Para a verificação da equivalência do grupo de ligação IV da linhagem *SM22*, que contém o gene *argA*₁, foram feitos outros cruzamentos cujos resultados serão apresentados no item 4.3.4. Entretanto, considerando os genes *bioA*₁ e *lysA*₇ presentes no grupo de ligação III da linhagem *N669*, podemos observar no total dos 64 segregantes, apenas 2 segregantes recombinantes (*bio*⁻, *lys*⁺), ou seja, 3% de recombinação mitótica entre esses marcadores. Entre os marcadores *nicA*₁ e *cspA*₁, a frequência de recombinação observada foi de 15,6%, reforçando a evidência de que o gene *cspA*₁ está localizado no grupo de ligação V

da linhagem de referência, como sugerido anteriormente com a análise dos segregantes do diplóide *N669 SM13*.

TABELA 7 - Genótipo dos segregantes do diplóide *N669 SM22* e respectivos parentais.

N669	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>lysA</i> ₇	<i>bioA</i> ₁	<i>argF</i> ₈	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	nº de
SM22	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	<i>argA</i> ₁	+	+	+	segregantes
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	<i>arg</i>	+	<i>pabA</i> ₁	+	4
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	16
	<i>olvA</i> ₁	+	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	2
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	3
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>bioA</i> ₁	+	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	13
	<i>olvA</i> ₁	+	+	+	<i>arg</i>	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	4
	<i>olvA</i> ₁	+	+	+	+	+	+	+	3
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	+	+	<i>arg</i>	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	4
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	+	+	<i>arg</i>	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	+	+	<i>arg</i>	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	2
	<i>fwnA</i> ₁	+	<i>lysA</i> ₇	<i>bioA</i> ₁	<i>arg</i>	+	+	+	1
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>bioA</i> ₁	+	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	+	<i>lysA</i> ₇	<i>bioA</i> ₁	<i>arg</i>	+	<i>pabA</i> ₁	+	1
	<i>olvA</i> ₁	+	+	+	<i>arg</i>	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	1
	<i>olvA</i> ₁	+	+	+	<i>arg</i>	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	+	+	+	1
	<i>olvA</i> ₁	+	<i>lysA</i> ₇	<i>bioA</i> ₁	<i>arg</i>	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₁	<i>hisD</i> ₄	<i>lysA</i> ₇	<i>bioA</i> ₁	<i>arg</i>	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
Total									64

4.2.5. Diplóide *N655//SV12*

Para verificar se a marca *metA*₁, presente no GL IV da linhagem *SV12* e a marca *metB*₁, presente no GL V da linhagem *N655*, eram alélicas, foi feito o cruzamento entre ambas as linhagens.

Após crescimento em MM mais 4% de MC (item 3.2.3), das duas linhagens em conjunto, as películas formadas foram inicialmente transferidas para MM. Após 5 dias de incubação, essas películas não apresentaram crescimento, sendo então transferidas para MM suplementado com metionina (MM + met) e, a partir daí, foi observado formação de heterocários. Conídios de uma colônia heterocariótica foram transferidos para MM + met por estrias. Esta transferência foi repetida. Fez-se, então, uma suspensão de esporos do heterocáριο e, após 4 passagens sucessivas por MM + met, foram isoladas 3 colônias, supostamente diplóides, denominadas A, B e C.

As colônias A e B foram repicadas, por estrias, em MM e MM + met, apresentando crescimento somente em MM + met. Porém, na segunda transferência para MM e MM + met, somente a colônia A cresceu em MM.

Uma suspensão de conídios da colônia C foi semeada em MM e MM + met, de onde foram isoladas 5 colônias, denominadas: C1, C2, das placas de Petri com MM e C3, C4 e C5 de placas de Petri contendo MM + met.

As 7 colônias isoladas foram caracterizadas segundo os critérios propostos (item 3.6.2), sendo que a colônia C5 não apresentou diâmetro de conídios superior às linhagens parentais (dados não apresentados). Os diplóides denominados *N655 SV12* A (com fenótipo *met*⁺) e *N655 SV12* B (com fenótipo *met*⁻), provenientes das colônias A e B, respectivamente, foram escolhidos para análise dos segregantes.

Um segundo cruzamento entre as linhagens *N655* e *SV12* foi realizado, e as películas foram transferidas para MM + met, devido à evidência anterior de que não se desenvolviam em MM. Cinco colônias heterocarióticas se desenvolveram (H1, H2, H3, H4 e H5), as quais foram repicadas em MM + met. Os procedimentos e resultados obtidos com cada uma das cinco colônias foram os seguintes:

H1: Após 3 transferências, por semeadura da suspensão de esporos, para MM + met, 16 colônias, supostamente diplóides, foram selecionadas. Essas colônias, através de inoculação por ponto, foram transferidas para MM e MM + met sendo que, somente uma colônia cresceu em MM. Esta foi classificada portanto, como met⁺. As 15 colônias met⁻, foram novamente inoculadas em MM e MM + met, e apenas uma manteve a característica met⁻. Essa colônia, diplóide, denominada *N655 SV12 D*, foi selecionada para análise dos segregantes.

H2: Da mesma maneira como foram selecionadas as 16 colônias do H1, desse heterocário foram selecionadas 21 colônias, sendo que todas cresceram em MM.

H3: Uma colônia supostamente diplóide isolada da primeira suspensão de esporos, foi sucessivamente transferida para MM e MM + met. Foi observado crescimento em MM somente após 4 repicagens sucessivas nos dois meios de cultura.

H4: Deste heterocário, foi feita suspensão de esporos ($10^6/\text{ml}$), que foi semeada em MM e MM + met. Esta operação foi repetida por mais 5 vezes e, em todas foi observado crescimento de prováveis diplóides apenas em MM + met. Somente na 6^a semeadura ocorreu crescimento em MM (frequência de 2×10^{-6} met).

H5: Duas colônias, prováveis diplóides, cresceram em MM (frequência de 4×10^{-6}) após terem sido transferidas tres vezes para MM + met. A condição diplóide foi confirmada posteriormente, usando o critério de diâmetro de conídios e o teste de segregação em Benlate (item 3.6.2).

Através desses resultados, pode ser sugerido que as películas provenientes desse cruzamento, só se desenvolvem na presença de metionina mas, após formação de heterocários típicos, pode haver o aparecimento de diplóides met^+ . A repicagem sucessiva de colônias heterocarióticas met^- pode aumentar consideravelmente a frequência de colônias met^+ (6 a 100%), possivelmente por multiplicação dos núcleos (conídios) que já são met^+ e que ocorrem em baixa frequência ($< 10^{-6}$).

Um teste de reversão da marca met^- das linhagens parentais *N655* e *SV12* foi feito para verificar se haveria uma alta taxa de reversão, o que poderia justificar o aparecimento de diplóides met^+ . Porém, ambas as linhagens apresentaram uma taxa de reversão menor que 10^{-7} , não sendo, portanto, razoável sugerir reversão da marca met^- como causa do aparecimento de colônias diplóides met^+ .

Uma outra hipótese seria a ocorrência de crossing-over mitótico após fusão de núcleos. Os resultados obtidos indicam que o núcleo diplóide é primariamente met^- , originando met^+ posteriormente. As colônias diplóides met^- isoladas, podem originar diplóides met^+ , o que sugere que o aparecimento do 2º tipo de diplóide, necessita da ocorrência de fusão nuclear.

Evidências de que $metA_1$ e $metB_1$ são alelos foram baseadas nos seguintes resultados:

a) os heterocários típicos, são na grande maioria dos casos, met^- (99%).

b) outro dado que parece confirmar o alelismo e, conseqüentemente, que o diplóide *N655 SV12* deve ser inicialmente met^- , vem da observação que heterocários formados entre um diplóide met^- (*N655 SV12* B) e as linhagens

parentais (*N655* e *SV12*) foram *met*⁻, ou seja, não houve complementação com *metA*₁ ou *metB*₁.

c) a indicação obtida pela análise dos segregantes do diplóide *N669 SM13* que o gene *metA*₁, mapeado no GL IV da linhagem *SM13* e *nicA*₁, no GL V da linhagem *N669*, segregaram de acordo com padrões que sugerem a equivalência desses grupos de ligação. Nessa mesma análise foi verificado que o marca *cspA*₁ e seu alelo selvagem *cspA*₁⁺ está no mesmo grupo de ligação que *nicA*₁ e *metA*₁, respectivamente (TABELA 6).

Segregantes do diplóide *N655 SV12 B* foram isolados e analisados (TABELA 8). Todos os 87 segregantes mostraram-se *met*⁻. O mesmo comportamento foi observado nos 48 segregantes isolados do diplóide *N655 SV12 D* (TABELA 9). Porém, houve segregação do marcador *cspA*₁ e *cspA*₁⁺, os quais, pelos resultados obtidos pela análise dos segregantes do diplóide *N669 SM13* (item 4.2.3), parecem estar no mesmo grupo de ligação que contém os marcadores *metB*₁ e *metA*₁, respectivamente.

O diplóide *N655 SV12 B* foi ensaiado várias vezes por semeadura e por inoculação de ponto. Em nenhuma ocasião foram constatadas colônias *met*⁺. Tal fato pode ser explicado pela ocorrência de permuta mitótica, apenas para as mutações *metA*₁ ou *metB*₁, como apresentado na FIGURA 2.

Portanto, a segregação das cromátides 2 e 4 produziriam somente haplóides *met*⁻, sendo estes, *cspA*₁⁺ ou *cspA*₁.

TABELA 8 - Análise dos segregantes do diplóide *N655//SV12 B*.

GRUPO DE LIGAÇÃO	MARCADORES	Nº DE SETORES (+/-)*
I	<i>nicA</i> ₁	40/47
I	<i>fvnA</i> ₁ / <i>olvA</i> ₃	39/48
II	<i>hisD</i> ₄	48/39
III	<i>lysA</i> ₇	71/16
III	<i>bioA</i> ₁	75/18
IV	<i>leuA</i> ₁	52/35
IV/V	<i>metA</i> ₁ ; <i>metB</i> ₁	0/87
IV/V	<i>cspA</i> ₁	30/57
VI	<i>pabA</i> ₁	34/53

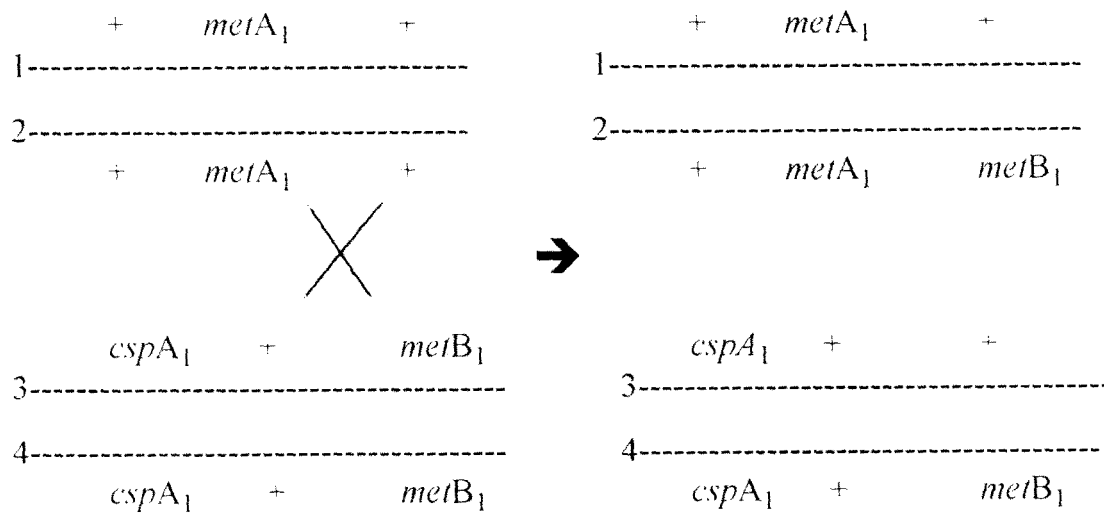
*. +/- = prototrofia / auxotrofia do respectivo marcador.

TABELA 9 - Análise dos segregantes do diplóide *N655//SV12 D*.

GRUPO DE LIGAÇÃO	MARCADORES	Nº DE SETORES (+/-)*
I	<i>nicA</i> ₁	17/31
I	<i>fvnA</i> ₁ / <i>olvA</i> ₃	17/31
II	<i>hisD</i> ₄	12/36
III	<i>lysA</i> ₇	5/43
III	<i>bioA</i> ₁	0/48
IV	<i>leuA</i> ₁	35/13
IV/V	<i>metA</i> ₁ ; <i>metB</i> ₁	0/48
IV/V	<i>cspA</i> ₁	31/17
VI	<i>pabA</i> ₁	21/27

*. +/- = prototrofia / auxotrofia do respectivo marcador.

FIGURA 2 - Modelo proposto para o aparecimento do diplóide *N655 SV12 B*.



Com relação aos demais marcadores, o padrão de segregação foi como o esperado, isto é, segregaram todas as marcas presentes nas parentais, como também podendo novamente ser evidenciado a ligação dos genes *nicA*₁ e *olvA*₃, presentes no GL I da linhagem derivada da *10v10*, descrito anteriormente por BONATELLI Jr. e col. (1983), e também a ligação dos genes *bioA*₁ e *lysA*₇ no GL III da linhagem derivada da *N402*, descrito anteriormente por BOS e col. (1988) (TABELAS 10 e 11) e verificado nos segregantes obtidos dos cruzamentos anteriores.

Tal padrão de segregação não ocorreu quando foi analisado o diplóide *N655 SV12 A*, onde observou-se alta frequência de segregantes com marcadores tipo selvagem das auxotrofias da linhagem *N655*, o mesmo não ocorrendo com os marcadores morfológicas *cspA*₁ e *fwnA*₁ (TABELA 12). E, quanto ao marcador *nicA*₁ da linhagem *SV12*, foi recuperada em alta frequência (175 *nic*⁻ : 7 *nic*⁺), sendo que, em 48% dos setores associada a marca *fwnA*₁ (88/182), indicando assim, ter ocorrido uma frequência muito alta de crossing-over mitótico no intervalo *nic*, *fwn*, *olv* (que estão no mesmo grupo de ligação - GL I; TABELA 13). No diplóide *N655 SV12 B* e *N655 SV12 D* a frequência de recombinação nesse mesmo intervalo foi de 6% e 0%, respectivamente (TABELAS 10 e 11).

Uma hipótese quanto à formação do diplóide *N655 SV12 A*, *met*⁺, seria a ocorrência de um crossing-over intragênico entre as mutações A e B no gene *metA/B*. Se isso ocorreu, dependendo da localização do gene *cspA*₁, teríamos os casos propostos nos modelos I e II apresentados na FIGURA 3.

TABELA 10- Análise mitótica dos marcadores do grupo de ligação I e III do diplóide *N655 SV12B*

	nic+	nic
fwn	2	37
olv	3	43

% recombinação: 5,7%

	bio+	bio-
lys+	8	4
lys-	8	67

% recombinação: 13,8%

TABELA 11- Análise mitótica dos marcadores do grupo de ligação I e III do diplóide *N655 SV12D*

	nic+	nic
fwn	0	17
olv	0	31

% de recombinação: 0%

	bio+	bio-
lys+	43	0
lys-	5	0

% de recombinação: 10,4%

TABELA 12 - Análise dos segregantes do diplóide *N655//SV12 A*.

GRUPO DE LIGAÇÃO	MARCADORES	Nº DE SETORES (+/-)*
I	<i>nicA</i> ₁	7/175
I	<i>fwnA</i> ₁ / <i>olvA</i> ₃	93/89
II	<i>hisD</i> ₄	180/2
III	<i>lysA</i> ₇	181/1
III	<i>bioA</i> ₁	181/1
IV	<i>leuA</i> ₁	181/1
IV/V	<i>metA</i> ₁ ; <i>metB</i> ₁	177/5
IV/V	<i>cspA</i> ₁	60/122
VI	<i>pabA</i> ₁	182/0

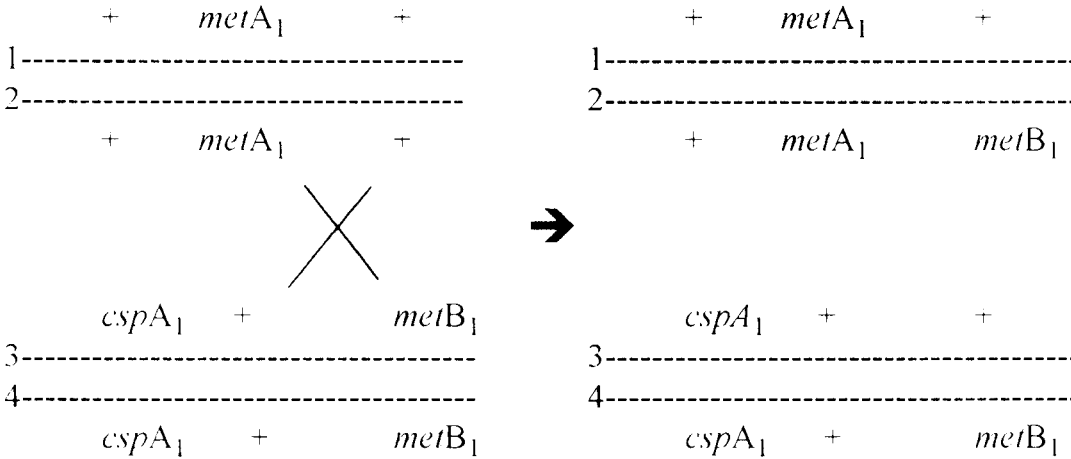
*. +/- = prototrofia / auxotrofia do respectivo marcador.

TABELA 13- Análise mitótica dos marcadores do grupo de ligação I e III do diplóide *N655 SV12A*

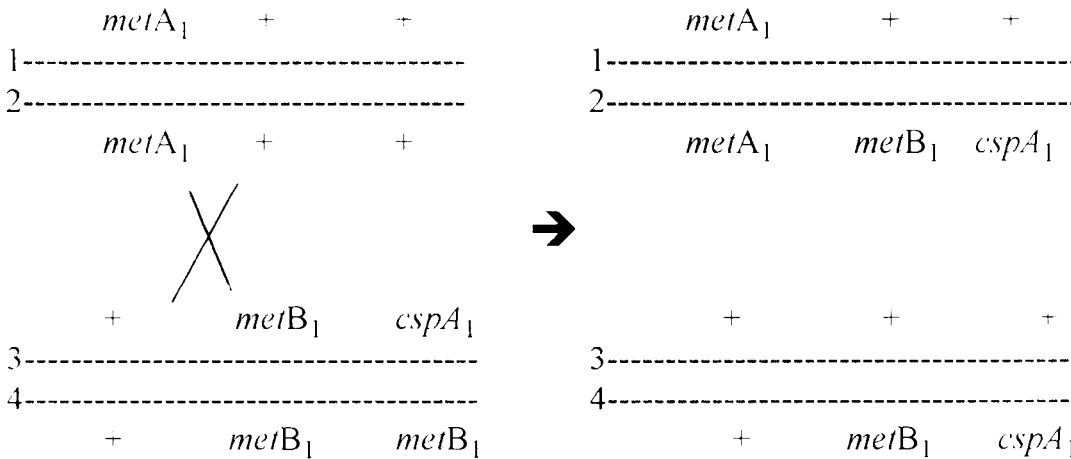
	nic+	nic		bio+	bio-
fwn	6	87	lys+	180	1
olv	1	88	lys-	1	0
% de recombinação: 48,8%			% de recombinação: 1,1%		

FIGURA 3 - Modelos propostos para a formação do diplóide *N655 SV12 A*, com a ocorrência de crossing-over intragênico.

MODELO I



MODELO II



No MODELO I, a cromátide 3 (*cspA*₁ + +) deveria estar associada a *cspA*₁⁺ ou *cspA*₁, ou seja, cromátides 1 e 3; 2 e 3 ou 4 e 3. Entretanto, foram recuperados segregantes *cspA*₁⁺ e *cspA*₁, ficando excluído a possibilidade de um diplóide formado entre as cromátides 4 e 3.

No MODELO II, a cromátide 3 (+ + +) deveria estar associada a *cspA*₁, ou seja, cromátides 2 e 3 ou 3 e 4.

Quanto ao fenótipo met^+ dos segregantes desse diplóide, deveria ser na sua maioria $cspA_1$, porém, o que se observou é que houve 122 $cspA_1$ e 177 met^+ , portanto, 55 segregantes met^+ são $cspA_1^+$, indicando uma alta frequência de recombinação também nesse intervalo (csp/met), pois, se considerarmos as cromátides 1 e 3 do modelo I, há 31% de recombinação e se considerarmos as cromátides 3 e 4 do modelo II, há 68% de recombinação.

Portanto, uma % de recombinação de 2 a 5 vezes maior (dependendo da combinação a ser considerada), quando se compara com a frequência de 14,6% observada no diplóide *N669 SM13* (TABELA 6) nesse mesmo intervalo.

O diplóide *N655 SV12 A* exibe ainda, como citado acima, uma alta frequência de segregantes com alelos selvagens equivalentes aos da linhagem *N655*, derivados da linhagem *SV12*. Esses setores, quando ensaiados para ploidia, mostraram-se haplóides, sugerindo um comportamento anômalo na segregação desse diplóide .

Convém destacar, que há relatos na literatura de alta frequência de recombinação mitótica em *Aspergillus niger* (LHOAS 1968, e BONATELLI Jr. 1981) porém, os trabalhos de BOS (1988) e DEBETS e col. (1990b, 1993) com a linhagem *N402* não citam esta ocorrência. No caso atual, trata-se de cruzamento entre linhagens que com muita probabilidade não são completamente isogênicas, o que pode de alguma forma ter contribuído para que esse comportamento anômalo aparecesse. Porém, como se viu, os dois diplóides, *N655 SV12 A* e *N655 SV12 B*, foram isolados do mesmo heterocário e, o que diferenciou inicialmente foi o fenótipo (met^+) não esperado do diplóide A. Na análise genética dos segregantes, as diferenças desses diplóides foram evidenciadas pelos diferentes padrões de segregação observados.

4.3. Equivalências de grupos de ligação

4.3.1. Grupo de ligação I

4.3.1.1. Obtenção e caracterização dos diplóides *N889//PNO* e *N890//SV12*

Foi obtido diplóide entre as linhagens *N889* e *PNO* e entre as linhagens *N890* e *SV12* (item 3.1.), via ciclo parassexual, como descrito no item 3.7.1.2, com o objetivo de verificar qual a equivalência do GL I das linhagens derivadas da *10v10* em relação aos grupos de ligação da linhagem de referência.

Após caracterização, conforme proposto no item 3.6.2., tendo sido confirmado se tratar de um diplóide, foram obtidos 153 segregantes do diplóide *N889//PNO* e 349 segregantes do diplóide *N890//SV12* (item 3.7.1) os quais foram caracterizados conforme item 3.7.2. Como pode-se observar nas TABELAS 14 e 15, houve segregação de todos os marcadores envolvidos no cruzamento. Na linhagem *N889* os genes *bioA₁* e *pyrA₅* estão no mesmo grupo de ligação (GL III) apresentando, pelos genótipos dos segregantes do diplóide *N889//PNO* expostos na TABELA 14 uma porcentagem de recombinação de 18,9% ou seja, 19 segregantes recombinantes

4.3.1.2. Mapeamento

Pela análise genética dos diplóides *N889 PNO* e *N890 SV12*, o alelo mutante *nicA₁*, presente no GL I das linhagens testadoras *PNO* e *SV12* parece estar no mesmo GL I pois, como apresentado na TABELA 16 a porcentagem de recombinação entre *fwnA₁* (GL I; *N889* e *N890*) e *nicA₁* (GL I; *PNO* e *SV12*) foi de 3,9% e 5,4%, respectivamente.

TABELA 15 - Genótipos dos segregantes do diplóide *N890//SV12* e respectivos parentais.

N890	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	no. de
SV12	<i>olvA</i> ₃	+	+	+	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	segregantes
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	+	+	<i>oliC</i> ₂	+	<i>metA</i> ₁	+	5
	<i>olvA</i> ₃	+	+	<i>leuA</i> ₁	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	3
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	53
	<i>olvA</i> ₃	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	28
	<i>olvA</i> ₃	+	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	35
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	10
	<i>olvA</i> ₃	+	+	<i>leuA</i> ₁	+	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	5
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	+	+	+	<i>oliC</i> ₂	+	<i>metA</i> ₁	+	6
	<i>olvA</i> ₃	+	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	5
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	54
	<i>olvA</i> ₃	+	+	+	+	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₃	+	+	+	+	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	10
	<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	14
	<i>olvA</i> ₃	+	+	+	+	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	+	11
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	+	+	+	+	+	<i>metA</i> ₁	+	1
	<i>olvA</i> ₃	+	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	2
	<i>olvA</i> ₃	+	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	+	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	5
	<i>olvA</i> ₃	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₃	+	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	5
	<i>olvA</i> ₃	+	+	<i>leuA</i> ₁	+	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	+	1
	<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	7
	<i>olvA</i> ₃	+	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	+	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	2
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	5
	<i>olvA</i> ₃	+	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	+	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	2
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	3
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	+	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	+	+	+	+	+	<i>metA</i> ₁	+	1
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	+	+	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	1
	<i>olvA</i> ₃	+	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	2

continua na página seguinte

continuação da TABELA 15

<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	2
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	+	<i>nicA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	+	+	+	1
<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	6
<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	+	<i>oliC</i> ₂	+	<i>metA</i> ₁	+	4
<i>olvA</i> ₃	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	9
<i>olvA</i> ₃	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	3
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	8
<i>olvA</i> ₃	+	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	5
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	5
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	+	1
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	+	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	+	<i>nicA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	+	<i>nicA</i> ₁	+	+	1
<i>olvA</i> ₃	+	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	+	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	+	<i>nicA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	+	<i>metA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	+	1
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	+	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	1
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	+	+	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	+	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	+	+	<i>leuA</i> ₁	+	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	+	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	+	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	+	+	+	1
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	+	+	<i>lysD</i> ₅	<i>oliC</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₅	+	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	+	+	+	+	+	<i>oliC</i> ₂	+	+	+	1
<i>olvA</i> ₃	+	+	+	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	3
Total										349

TABELA 16 - Análise genética dos segregantes haplóides dos diplóides
N889//PNO e *N890//SV12*

Diplóides	Marcadores (Grupos de Ligação)		Fenótipos segregantes				Porcentagem de recombinantes
	a*	b**	ab	ab ⁺	a ⁺ b	a ⁺ b ⁺	
<i>N889//PNO</i>	<i>fwxA₁</i> (I)	<i>nicA₁</i> (I)	6	69	78	0	3,9
	<i>bioA₁</i> (III)	<i>nicA₁</i> (I)	65	55	19	14	51,6
	<i>pyrA₅</i> (III)	<i>nicA₁</i> (I)	53	65	31	4	37,3
	<i>pheA₁</i> (V)	<i>nicA₁</i> (I)	26	19	58	50	49,7
	<i>lysF₇</i> (VII)	<i>nicA₁</i> (I)	44	63	40	6	32,7
<i>N890//SV12</i>	<i>fwxA₁</i> (I)	<i>nicA₁</i> (I)	17	160	170	2	5,4
	<i>argH₁₂</i> (II)	<i>nicA₁</i> (I)	54	142	133	20	21,2
	<i>pyrA₅</i> (III)	<i>nicA₁</i> (I)	40	147	5	157	56,4
	<i>leuA₁</i> (IV)	<i>nicA₁</i> (I)	85	75	102	87	49,3
	<i>pheA₁</i> (V)	<i>nicA₁</i> (I)	148	145	39	17	47,3
	<i>lysD₂₅</i> (VI)	<i>nicA₁</i> (I)	50	15	137	147	56,4
	<i>oliC₂</i> (VII)	<i>nicA₁</i> (I)	156	155	31	7	46,7

*- marcadores referentes às linhagens derivadas da *N402*

** - marcadores referentes às linhagens derivadas da *10v10*

4.3.2. Grupo de ligação II

4.3.2.1. Obtenção e caracterização dos diplóides *N690//PNO*, *N823//PNO* e *N875//PF*

Foram obtidos diplóides entre as linhagens *N690* e *PNO*; *N823* e *PNO*; e entre as linhagens *N875* e *PF* (item 3.1.2), via ciclo parassexual, como descrito no item 3.7.1.1 (cruzamento *N690* e *PNO*) e 3.7.1.2. (demais cruzamentos), com o objetivo de verificar qual a equivalência do GL II das linhagens derivadas da *10v10* em relação aos grupos de ligação da linhagem de referência.

Após caracterização, conforme proposto no item 3.6.2., tendo sido confirmado se tratar de um diplóide, foram obtidos 70 segregantes do diplóide *N690//PNO*, 111 segregantes do diplóide *N823//PNO* e 74 segregantes do diplóide *N875//PF* (item 3.7.1) e caracterizados conforme item 3.7.2. As TABELAS 14, 17, 18, e 19 apresentam os genótipos dos segregantes. Quanto ao marcador *nic*, presente nas parentais do cruzamento *N690* e *PNO*, houve complementação, o que indica que são mutações diferentes.

4.3.2.2. Mapeamento

Pela análise genética dos diplóides *N690//PNO*, *N823//PNO*, *N889//PNO* e *N875//PF*, o alelo mutante *pabA₁*- presente no GL II das linhagens testadoras *PNO* e *PF* parece estar no GL VI pois, como apresentado na TABELA 20 a porcentagem de recombinação encontrada entre *pabA₁* (GL II; *PNO* e *PF*) e *pdxA₂* (GL VI, *N690*; *N823* e *N875*) foi de 14,3% nos segregantes do diplóide *N690 PNO*, 13,5% nos segregantes do diplóide *N889 PNO* e 10,8% nos segregantes do diplóide *N875 PF*. Pode ainda ser notado que as porcentagens de recombinantes obtidas entre os marcadores dos demais grupos de ligação envolvidos no cruzamento e o GL II, variou de 36,9% entre o marcadores *finA₁* e

*pabA*₁ (respectivamente GL I, *N823* e GL II, *PNO*, no diplóide *N823 PNO*) e 68,5% de recombinação entre *bioA*₁ e *pabA*₁ (respectivamente GL III, *N690* e GL II, *PNO* no diplóide *N690 PNO*) indicando ausência de ligação dos marcadores envolvidos. Se forem consideradas ainda as linhagens de referência, no caso *N690* e *N823* e seus respectivos marcadores no grupo de ligação II - *hisD*₄ e *argH*₁₂. respectivamente, nota-se que a porcentagem de recombinação obtida entre esses marcadores e *pabA*₁ presente no grupo de ligação II da linhagem *PNO* foi de 55,7% e 45,9% respectivamente, não estando portanto, ligados.

TABELA 17 - Genótipo dos segregantes do diplóide *N690 PNO* e respectivos parentais.

<i>N690</i>	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	<i>lysA₇</i>	<i>bioA₁</i>	<i>leuA₁</i>	<i>nicA₁</i>	<i>pdxA₂</i>	+	<i>cspA₁</i>	no de
<i>PNO</i>	<i>olvA₃</i>	+	+	+	+	<i>nicA₁</i>	+	<i>pabA₁</i>	+	segregantes
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	<i>leuA₁</i>	+	<i>pdxA₂</i>	+	+	1
	<i>olvA₃</i>	+	+	+	<i>leuA₁</i>	<i>nicA₁</i>	+	<i>pabA₁</i>	<i>cspA₁</i>	8
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	<i>leuA₁</i>	<i>nicA₁</i>	<i>pdxA₂</i>	+	+	1
	<i>olvA₃</i>	+	+	+	<i>leuA₁</i>	<i>nicA₁</i>	+	<i>pabA₁</i>	+	3
	<i>fwnA₁</i>	+	<i>lysA₇</i>	<i>bioA₁</i>	<i>leuA₁</i>	<i>nicA₁</i>	+	<i>pabA₁</i>	<i>cspA₁</i>	1
	<i>olvA₃</i>	+	+	+	<i>leuA₁</i>	<i>nicA₁</i>	<i>pdxA₂</i>	+	<i>cspA₁</i>	9
	<i>olvA₃</i>	+	+	+	+	<i>nicA₁</i>	<i>pdxA₂</i>	+	+	4
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	<i>lysA₇</i>	<i>bioA₁</i>	<i>leuA₁</i>	+	<i>pdxA₂</i>	<i>pabA₁</i>	+	1
	<i>olvA₃</i>	+	+	+	+	<i>nicA₁</i>	+	<i>pabA₁</i>	<i>cspA₁</i>	2
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	<i>leuA₁</i>	+	<i>pdxA₂</i>	+	+	2
	<i>olvA₃</i>	+	+	+	<i>leuA₁</i>	<i>nicA₁</i>	<i>pdxA₂</i>	+	+	9
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	+	+	<i>pdxA₂</i>	+	+	2
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	+	+	+	<i>pabA₁</i>	+	3
	<i>fwnA₁</i>	+	<i>lysA₇</i>	<i>bioA₁</i>	<i>leuA₁</i>	<i>nicA₁</i>	<i>pdxA₂</i>	+	<i>cspA₁</i>	1
	<i>fwnA₁</i>	+	<i>lysA₇</i>	+	<i>leuA₁</i>	<i>nicA₁</i>	<i>pdxA₂</i>	+	<i>cspA₁</i>	1
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	<i>leuA₁</i>	<i>nicA₁</i>	+	+	<i>cspA₁</i>	1
	<i>olvA₃</i>	+	<i>lysA₇</i>	+	<i>leuA₁</i>	<i>nicA₁</i>	<i>pdxA₂</i>	+	+	1
	<i>olvA₃</i>	+	+	+	+	<i>nicA₁</i>	+	+	<i>cspA₁</i>	4
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	+	<i>nicA₁</i>	<i>pdxA₂</i>	+	<i>cspA₁</i>	2
	<i>olvA₃</i>	+	+	+	<i>leuA₁</i>	<i>nicA₁</i>	<i>pdxA₂</i>	<i>pabA₁</i>	+	1
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	<i>leuA₁</i>	+	+	<i>pabA₁</i>	+	1
	<i>fwnA₁</i>	+	+	+	<i>leuA₁</i>	<i>nicA₁</i>	<i>pdxA₂</i>	+	<i>cspA₁</i>	1
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	+	<i>nicA₁</i>	<i>pdxA₂</i>	+	<i>cspA₁</i>	3
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	<i>lysA₇</i>	+	+	+	<i>pdxA₂</i>	+	+	1
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	<i>lysA₇</i>	+	<i>leuA₁</i>	+	<i>pdxA₂</i>	+	+	1
	<i>fwnA₁</i>	+	+	+	<i>leuA₁</i>	<i>nicA₁</i>	+	<i>pabA₁</i>	<i>cspA₁</i>	1
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	+	+	+	+	+	1
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	+	<i>nicA₁</i>	<i>pdxA₂</i>	<i>pabA₁</i>	<i>cspA₁</i>	1
	<i>olvA₃</i>	+	+	+	<i>leuA₁</i>	<i>nicA₁</i>	<i>pdxA₂</i>	<i>pabA₁</i>	<i>cspA₁</i>	1
	<i>fwnA₁</i>	+	+	+	<i>leuA₁</i>	+	<i>pdxA₂</i>	+	+	1
	<i>olvA₃</i>	+	+	+	+	<i>nicA₁</i>	<i>pdxA₂</i>	+	<i>cspA₁</i>	1
Total										70

TABELA 18 - Genótipo dos segregantes do diplóide N823//PNO e respectivos parentais.

N823	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	no. de
PNO	<i>olvA</i> ₃	+	+	+	+	+	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	segregantes
	<i>olvA</i> ₃	+	+	<i>leuA</i> ₁	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	+	3
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	+	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₃	+	+	+	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	+	+	2
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	+	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	7
	<i>olvA</i> ₃	+	+	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	+	+	1
	<i>olvA</i> ₃	+	<i>lysA</i> ₇	+	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₃	+	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	3
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	+	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	3
	<i>olvA</i> ₃	+	+	+	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	+	1
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	+	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	+	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	+	1
	<i>olvA</i> ₃	+	+	+	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	6
	<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	+	2
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	+	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	8
	<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	2
	<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	+	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	+	+	1
	<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	+	+	1
	<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	+	+	+	<i>pabA</i> ₁	+	1
	<i>olvA</i> ₃	+	<i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	+	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	+	+	1
	<i>olvA</i> ₃	+	<i>lysA</i> ₇	+	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	2
	<i>olvA</i> ₃	+	<i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	+	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	3
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	5
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	1
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	+	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	4
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	2
	<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	+	<i>trpB</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	+	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1

continua na página seguinte

continuação da TABELA 18

<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	+	2
<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	+	+	1
<i>olvA</i> ₃	+	+	+	+	<i>trpB</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	+	+	<i>trpB</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	+	+	+	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	-	+	<i>cspA</i> ₁	2
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	+	+	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	+	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	3
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	-	+	<i>cspA</i> ₁	3
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	+	+	<i>trpB</i> ₂	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	+	+	+	+	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	+	+	<i>leuA</i> ₁	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	3
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	2
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	+	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	2
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	+	+	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	+	+	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	+	<i>trpB</i> ₂	+	+	+	1
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	+	+	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	+	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>trpB</i> ₂	+	<i>pabA</i> ₁	+	1
<i>olvA</i> ₃	+	+	+	+	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	+	+	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	+	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	+	<i>pabA</i> ₁	+	1
<i>olvA</i> ₃	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	+	<i>pdxA</i> ₂	+	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>lysA</i> ₇	<i>leuA</i> ₁	+	+	+	<i>pabA</i> ₁	+	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	<i>nicA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	-	+	<i>leuA</i> ₁	-	<i>trpB</i> ₂	-	-	<i>cspA</i> ₁	1
<i>olvA</i> ₃	+	+	+	<i>pdxA</i> ₂	+	<i>nicA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	1
Total									111

TABELA 19 - Genótipo dos segregantes do diplóide *N875 PF* e respectivos parentais

N875 PF	+ <i>fwnA</i> ₁	+ <i>trpA</i> ₁	+ <i>pyrA</i> ₅	+ <i>hisC</i> ₃	+ <i>pheA</i> ₁	+ <i>pdxA</i> ₂	+ <i>nicB</i> ₅	+ <i>pabA</i> ₁	+ <i>cspA</i> ₁	no. de segregantes
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	+	1	
+	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	<i>cspA</i> ₁	5	
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	2	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	-	<i>cspA</i> ₁	1	
+	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	3	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>hisC</i> ₃	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	+	5	
+	<i>trpA</i> ₁	+	+	+	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	+	1	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	3	
+	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>pabA</i> ₁	+	1	
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	5	
+	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	+	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	-	1	
+	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1	
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	3	
+	<i>trpA</i> ₁	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	<i>cspA</i> ₁	1	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>hisC</i> ₃	+	+	+	+	+	1	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	4	
+	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	+	1	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>hisC</i> ₃	+	+	+	<i>pabA</i> ₁	+	2	
+	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	+	<i>cspA</i> ₁	2	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	2	
+	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	+	+	1	
+	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1	
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	1	
+	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	+	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	<i>cspA</i> ₁	1	
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1	
+	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	+	+	1	
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	+	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1	
+	+	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	<i>cspA</i> ₁	1	
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1	
+	<i>trpA</i> ₁	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	2	
+	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1	
+	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>pabA</i> ₁	+	2	
+	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	+	+	<i>nicB</i> ₅	<i>pabA</i> ₁	+	2	
+	+	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	<i>cspA</i> ₁	2	
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	3	
+	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	<i>cspA</i> ₁	2	
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	1	
+	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	+	+	<i>nicB</i> ₅	<i>pabA</i> ₁	+	1	
+	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1	
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1	
+	+	<i>pyrA</i> ₅	+	+	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1	
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	+	+	+	<i>pabA</i> ₁	+	1	
Total										74

TABELA 20 - Análise genética de segregantes haplóides dos diplóides

N690 PNO, N889 PNO, N823 PNO e N875 PF

Diplóides	Marcadores (Grupos de Ligação)		Fenótipos segregantes				Porcentagem de recombinantes
	a**	b**	ab	ab ⁺	a ⁺ b	a ⁺ b ⁺	
<i>N690 PNO</i>	<i>fwnA</i> ₁ (I)	<i>pabA</i> ₁ (II)	8	19	15	28	51,4
	<i>hisD</i> ₄ (II)	<i>pabA</i> ₁ (II)	6	14	17	33	55,7
	<i>bioA</i> ₁ (III)	<i>pabA</i> ₁ (II)	2	1	21	46	68,5
	<i>lysA</i> ₇ (III)	<i>pabA</i> ₁ (II)	2	5	21	42	62,8
	<i>leuA</i> ₁ (IV)	<i>pabA</i> ₁ (II)	17	31	6	16	47,1
	<i>pdxA</i>₂(VI)	<i>pabA</i>₁(II)	4	41	19	6	14,3
<i>N823 PNO</i>	<i>fwnA</i> ₁ (I)	<i>pabA</i> ₁ (II)	19	37	33	22	36,9
	<i>argH</i> ₁₂ (II)	<i>pabA</i> ₁ (II)	13	21	39	38	45,9
	<i>lysA</i> ₇ (III)	<i>pabA</i> ₁ (II)	34	35	18	24	52,3
	<i>leuA</i> ₁ (IV)	<i>pabA</i> ₁ (II)	35	24	17	35	63,1
	<i>pdxA</i>₂(VI)	<i>pabA</i>₁(II)	3	47	49	12	13,5
	<i>trpB</i> ₂ (VII)	<i>pabA</i> ₁ (II)	15	9	37	50	58,6
<i>N889 PNO</i>	<i>fwnA</i> ₁ (I)	<i>pabA</i> ₁ (II)	34	41	41	37	46,4
	<i>bioA</i> ₁ (III)	<i>pabA</i> ₁ (II)	65	55	10	23	57,5
	<i>pyrA</i> ₅ (III)	<i>pabA</i> ₁ (II)	59	59	16	19	51,0
	<i>pheA</i> ₁ (V)	<i>pabA</i> ₁ (II)	25	20	50	58	54,2
	<i>lysF</i> ₇ (VII)	<i>pabA</i> ₁ (II)	53	54	22	24	50,3
	<i>N875 PF</i>	<i>trpA</i> ₁ (II)	<i>pabA</i> ₁ (II)	19	22	12	21
<i>pyrA</i> ₅ (III)		<i>pabA</i> ₁ (II)	12	15	19	28	54,1
<i>hisC</i> ₃ (IV)		<i>pabA</i> ₁ (II)	24	35	7	8	43,2
<i>pheA</i> ₁ (V)		<i>pabA</i> ₁ (II)	24	32	7	11	47,3
<i>pdxA</i>₂(VI)		<i>pabA</i>₁(II)	1	36	30	7	10,8
<i>nicB</i> ₅ (VII)		<i>pabA</i> ₁ (II)	15	19	16	24	52,7

*- marcadores referentes às linhagens derivadas da *N402***- marcadores referentes às linhagens derivadas da *10v10*

4.3.3. Grupo de ligação III

4.3.3.1. Obtenção e caracterização dos diplóides *N875//SM13* e *N868//SM13*

Foi obtido diplóide entre as linhagens *N875* e *SM13*; *N868* e *SM13* (item 3.1.2), via ciclo parassexual, como descrito no item 3.7.1.2., com o objetivo de verificar qual a equivalência do GL III e IV das linhagens derivadas da *10v10* em relação aos grupos de ligação da linhagem de referência.

Após caracterização, conforme proposto no item 3.6.2., tendo sido confirmado se tratar de um diplóide, foram obtidos 233 segregantes do diplóide *N875 SM13* e 167 segregantes do diplóide *N868 SM13*, (item 3.7.1) e caracterizados conforme item 3.7.2. Os genótipos dos segregantes estão apresentados nas TABELAS 21 e 22 onde pode-se observar que houve segregação de todas os marcadores envolvidos no cruzamento.

4.3.3.2. Mapeamento

Pela análise genética dos diplóides *N875 SM13* e *N868 SM13*, o GL III da linhagem *SM13*, que contém o alelo mutante *lysA₁*, parece corresponder ao GL VI das linhagens mestras pois, como apresentado na TABELA 23, a porcentagem de recombinação encontrada entre *lysA₁* (GL III; *SM13*) e *pdxA₂* (GL VI, *N875*) ou *pabA₁* (GL VI, *N868*) foi de 6,4% nos segregantes do diplóide *N875 SM13* e 7,2% nos segregantes do diplóide *N868 SM13*. Nota-se, também, que as porcentagens de recombinantes obtidas entre os marcadores dos demais grupos de ligação envolvidos no cruzamento e o GL III das linhagens derivadas da *10v10*, está entre 44,2% e 63,5% indicando ausência de ligação dos marcadores envolvidos com o grupo de ligação em questão.

TABELA 21 - Genótipo dos segregantes do diplóide N875 SM13 e respectivos parentais.

N875	+	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	+	<i>cspA</i> ₁	no. de
SM13	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	+	+	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	segregantes
	<i>fwnA</i> ₁	+	<i>pyrA</i> ₅	+	+	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	<i>metA</i> ₁	+	1
		<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	+	<i>cspA</i> ₁	3
	<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	+	+	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	<i>metA</i> ₁	+	3
	+	<i>trpA</i> ₁	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	+	+	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	4
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	17
	+	<i>trpA</i> ₁	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	2
	<i>fwnA</i> ₁	-	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	2
	+	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	+	<i>cspA</i> ₁	13
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	+	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	1
	+	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	+	+	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	1
	+	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	8
	<i>fwnA</i> ₁	+	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	+	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	6
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>hisC</i> ₃	+	+	+	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	8
	+	<i>trpA</i> ₁	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	5
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	19
	+	+	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	+	<i>cspA</i> ₁	2
	<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	2
	+	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	11
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	6
	-	<i>trpA</i> ₁	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	+	<i>cspA</i> ₁	18
	+	+	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	+	+	1
	<i>fwnA</i> ₁	+	<i>pyrA</i> ₅	+	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	<i>metA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	2
	+	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	+	+	<i>cspA</i> ₁	2
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	<i>metA</i> ₁	+	10
	+	+	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	2
	+	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	5
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	<i>metA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	1
	+	+	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	+	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	1
	+	+	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	4
	+	+	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	3
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	4
	+	+	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	+	+	<i>cspA</i> ₁	1

continua na página seguinte

continuação da TABELA 21

+	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	+	+	1
+	+	<i>pyrA</i> ₅	+	+	+	·	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
+	+	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	+	+	+	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	3
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	3
<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>hisC</i> ₃	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	<i>metA</i> ₁	+	8
<i>fwnA</i> ₁	·	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	·	+	+	<i>cspA</i> ₁	4
+	<i>trpA</i> ₁	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	+	+	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	<i>metA</i> ₁	+	2
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	·	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
+	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	+	+	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	·	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
+	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	+	<i>cspA</i> ₁	5
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	+	+	·	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	1
+	<i>trpA</i> ₁	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	·	<i>cspA</i> ₁	1
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>pyrA</i> ₅	+	+	+	+	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	1
+	·	+	+	+	+	·	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
+	<i>trpA</i> ₁	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
+	+	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	+	+	1
+	+	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
+	+	+	<i>hisC</i> ₃	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	<i>metA</i> ₁	+	1
<i>fwnA</i> ₁	·	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	·	+	+	+	2
+	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
+	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	+	<i>nicB</i> ₅	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	3
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>pyrA</i> ₅	+	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	<i>metA</i> ₁	+	1
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>pyrA</i> ₅	+	+	+	+	<i>lysA</i> ₁	+	+	1
<i>fwnA</i> ₁	·	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	+	+	+	+	+	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	2
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	+	+	+	1
<i>fwnA</i> ₁	·	+	<i>hisC</i> ₃	+	+	+	+	<i>metA</i> ₁	+	1
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	+	+	+	<i>pdxA</i> ₂	+	+	<i>metA</i> ₁	+	2
<i>fwnA</i> ₁	<i>trpA</i> ₁	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	·	+	+	<i>cspA</i> ₁	3
+	<i>trpA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
+	+	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
+	+	+	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>pyrA</i> ₅	+	+	+	+	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>pyrA</i> ₅	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	+	+	<i>cspA</i> ₁	1
Total										223

TABELA 22 - Genótipos dos segregantes do diplóide *N868 SM13* e respectivos parentais.

N868 SM13	+	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	no. de segregantes
	<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	+	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	10	
+	+	<i>leuA</i> ₁	+	+	<i>oliC</i> ₂	+	+	+	1	
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>leuA</i> ₁	-	+	+	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	5	
+	+	<i>leuA</i> ₁	+	+	<i>oliC</i> ₂	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	7	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	+	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	3	
+	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	22	
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>leuA</i> ₁	+	+	<i>oliC</i> ₂	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	18	
<i>fwnA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	+	+	+	+	<i>lysA</i> ₁	+	-	1	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	<i>oliC</i> ₂	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	<i>cspA</i> ₁	2	
+	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	7	
+	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	8	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	4	
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	6	
+	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	6	
<i>fwnA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	4	
+	+	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>oliC</i> ₂	+	+	+	2	
+	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	9	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	<i>oliC</i> ₂	<i>lysA</i> ₁	<i>metA</i> ₁	+	5	
<i>fwnA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>oliC</i> ₂	+	<i>metA</i> ₁	+	1	
+	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	+	+	+	1	
+	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	3	
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	12	
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	9	
+	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>oliC</i> ₂	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	3	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	+	+	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	1	
+	+	<i>leuA</i> ₁	+	+	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	3	
<i>fwnA</i> ₁	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1	
+	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1	
<i>fwnA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	+	+	+	<i>lysA</i> ₁	+	+	1	
<i>fwnA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1	
+	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	1	
<i>fwnA</i> ₁	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	+	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1	
+	+	<i>leuA</i> ₁	+	<i>pabA</i> ₁	<i>oliC</i> ₂	+	<i>metA</i> ₁	-	1	
<i>fwnA</i> ₁	+	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	+	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	1	
+	+	+	+	<i>pabA</i> ₁	<i>oliC</i> ₂	+	+	<i>cspA</i> ₁	1	
-	+	+	+	+	<i>oliC</i> ₂	<i>lysA</i> ₁	+	+	1	
+	<i>pyrA</i> ₅	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	+	+	+	<i>cspA</i> ₁	1	
+	+	+	<i>pheA</i> ₁	<i>pabA</i> ₁	<i>oliC</i> ₂	<i>lysA</i> ₁	+	<i>cspA</i> ₁	1	
Total									167	

O fato de que tanto o GL II como o GL III das linhagens derivadas da *10v10* corresponderem ao GL VI das linhagens de referência pode ser explicado pela existência de uma aberração cromossômica, do tipo translocação, por exemplo, envolvendo os grupos de ligação correspondentes.

TABELA 23 - Análise genética dos segregantes haplóides dos diplóides *N875 SM13* e *N868 SM13*

Diplóides	Marcadores (Grupos de Ligação)		Fenótipos segregantes				Porcentagem de recombinação
	a*	b**	ab	ab ⁺	a ⁺ b	a ⁺ b ⁺	
<i>N875 SM13</i>	<i>trpA</i> ₁ (II)	<i>lysA</i> ₁ (III)	30	42	66	95	53,6
	<i>pyrA</i> ₅ (III)	<i>lysA</i> ₁ (III)	28	22	68	115	61,4
	<i>hisC</i> ₃ (IV)	<i>lysA</i> ₁ (III)	57	46	39	91	63,5
	<i>pheA</i> ₁ (V)	<i>lysA</i> ₁ (III)	71	105	25	32	44,2
	<i>ptxA</i>₂(VI)	<i>lysA</i>₁(III)	6	128	90	9	6,4
	<i>nicB</i> ₅ (VII)	<i>lysA</i> ₁ (III)	45	51	51	86	56,2
<i>N868 SM13</i>	<i>pyrA</i> ₅ (III)	<i>lysA</i> ₁ (III)	19	3	109	36	32,9
	<i>leuA</i> ₁ (IV)	<i>lysA</i> ₁ (III)	70	18	58	21	54,5
	<i>pheA</i> ₁ (V)	<i>lysA</i> ₁ (III)	84	33	44	6	53,9
	<i>pabA</i>₁(VI)	<i>lysA</i>₁(III)	5	32	123	7	7,2
	<i>oliC</i> ₂ (VII)	<i>lysA</i> ₁ (III)	97	35	31	4	60,5

*- marcadores referentes às linhagens derivadas da *N402*

** - marcadores referentes às linhagens derivadas da *10v10*

4.3.4. Grupo de ligação IV

4.3.4.1. Obtenção e caracterização do diplóide *N805//SM22*

As linhagens *N805* e *SM22* (item 3.1.2) foram cruzadas, via ciclo parassexual, para obtenção de diplóide (item 3.7.1.2), com o objetivo de verificar, juntamente com os diplóides *N875 SM13* e *N868 SM13*, qual a equivalência do GL IV das linhagens derivadas da *10v10* em relação aos grupos de ligação da linhagem de referência.

Após caracterização, conforme proposto no item 3.6.2., tendo sido confirmado se tratar de um diplóide, foram obtidos 137 segregantes do diplóide *N805 SM22* (item 3.7.1) e caracterizados conforme item 3.7.2. A TABELA 24 apresenta os genótipos dos segregantes.

4.3.4.2. Mapeamento

Pela análise genética dos diplóides *N875 SM13*, *N868 SM13* e *N805 SM22* (TABELA 25), a porcentagem de recombinação encontrada entre os marcadores *metA*₁ (presente no GL IV da linhagem testadora *SM13*) e *argA*₁ (GL IV da linhagem *SM22*) e os marcadores *pheA*₁ (GL V, *N875* e *N868*) ou *metB*₁ (GL V, *N805*) foi de 2,1% nos segregantes do diplóide *N875 SM13*, 4,8% nos segregantes do diplóide *N868 SM13* e 10,2% nos segregantes do diplóide *N805 SM22*, uma evidência portanto de ligação entre esses marcadores, o que permite sugerir a equivalência do GL IV das linhagens derivadas da *10v10* com o GL V das linhagens de referência. DEBETS e col. (1989) trabalhando com as linhagens derivadas da *N402* encontraram nos segregantes analisados apenas 1% de recombinantes mitóticos (por permuta mitótica) entre os marcadores *pheA*₁, *argA*₁ e *metB*₂, os quais foram mapeados no GL V. Pode-se ainda notar que as porcentagens de recombinação obtidas entre os marcadores do GL IV das linhagens de referência e os marcadores do GL IV das linhagens *SM13*, *SM22* e

SV12 indicam ausência de ligação, e, conseqüentemente pode-se considerar que esses grupos de ligação não são equivalentes. O mesmo aconteceu com os marcadores dos demais grupos de ligação envolvidos com uma frequência de recombinação que variou de 35% a 64,8%, indicando ausência de ligação dos marcadores envolvidos.

Porém em relação ao gene *cspA*₁, através da análise mitótica dos segregantes dos diplóides heterozigotos *N875 SM13*, *N868 SM13*, *N805 SM22* e *N890 SV12* (TABELAS, 15, 21, 22 e 24), pode-se constatar a ligação entre os genes presentes no GL V das linhagens de referência, como por exemplo, *pheA*₁ das linhagens *N875*, *N868*, *N890* e *metB*₁ da *N805* e os genes *metA*₁ das linhagens *SM13* e *SV12* e *argA*₁ da *SM22*, ambos mapeados no GL IV da linhagens derivadas da *10v10* (MASIERO, 1988).

TABELA 24 - Genótipo dos segregantes do diplóide *N805 SM22* e respectivos parentais.

N805	<i>olvA₁</i>	<i>hisD₄</i>	<i>bioA₁</i>	<i>lysA₇</i>	<i>leuA₁</i>	<i>metB₁</i>	<i>pabA₁</i>	+	<i>cspA₁</i>	no. de segregantes
SM22	<i>fwnA₁</i>	+	+	+	+	+	+	<i>argA₁</i>	+	
	<i>olvA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	<i>lysA₇</i>	<i>leuA₁</i>	<i>metB₁</i>	+	+	<i>cspA₁</i>	8
	<i>fwnA₁</i>	+	+	+	+	<i>metB₁</i>	+	+	<i>cspA₁</i>	19
	<i>olvA₁</i>	<i>hisD₄</i>	-	-	<i>leuA₁</i>	<i>metB₁</i>	+	+	<i>cspA₁</i>	10
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	<i>lysA₇</i>	+	+	+	<i>argA₁</i>	-	1
	<i>olvA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	<i>lysA₇</i>	<i>leuA₁</i>	<i>metB₁</i>	<i>pabA₁</i>	+	<i>cspA₁</i>	1
	<i>fwnA₁</i>	-	+	+	+	+	+	<i>argA₁</i>	-	8
	<i>olvA₁</i>	<i>hisD₄</i>	<i>bioA₁</i>	<i>lysA₇</i>	<i>leuA₁</i>	<i>metB₁</i>	<i>pabA₁</i>	+	<i>cspA₁</i>	15
	<i>fwnA₁</i>	+	+	-	+	+	<i>pabA₁</i>	<i>argA₁</i>	+	12
	<i>olvA₁</i>	<i>hisD₄</i>	-	-	<i>leuA₁</i>	+	<i>pabA₁</i>	+	+	7
	<i>fwnA₁</i>	+	+	+	+	<i>metB₁</i>	<i>pabA₁</i>	+	<i>cspA₁</i>	16
	<i>olvA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	<i>leuA₁</i>	<i>metB₁</i>	<i>pabA₁</i>	+	<i>cspA₁</i>	17
	<i>fwnA₁</i>	+	+	+	+	+	<i>pabA₁</i>	<i>argA₁</i>	-	1
	<i>fwnA₁</i>	+	<i>bioA₁</i>	<i>lysA₇</i>	+	<i>metB₁</i>	<i>pabA₁</i>	+	<i>cspA₁</i>	1
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	<i>bioA₁</i>	<i>lysA₇</i>	+	<i>metB₁</i>	<i>pabA₁</i>	+	<i>cspA₁</i>	1
	<i>olvA₁</i>	<i>hisD₄</i>	<i>bioA₁</i>	<i>lysA₇</i>	<i>leuA₁</i>	<i>metB₁</i>	+	+	<i>cspA₁</i>	8
	<i>olvA₁</i>	<i>hisD₄</i>	<i>bioA₁</i>	<i>lysA₇</i>	<i>leuA₁</i>	<i>metB₁</i>	<i>pabA₁</i>	<i>argA₁</i>	<i>cspA₁</i>	1
	<i>olvA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	<i>leuA₁</i>	<i>metB₁</i>	<i>pabA₁</i>	+	-	3
	<i>fwnA₁</i>	+	+	+	+	<i>metB₁</i>	+	+	+	1
	<i>olvA₁</i>	<i>hisD₄</i>	<i>bioA₁</i>	<i>lysA₇</i>	<i>leuA₁</i>	<i>metB₁</i>	+	+	+	1
	<i>fwnA₁</i>	+	+	+	+	+	+	<i>argA₁</i>	<i>cspA₁</i>	2
	<i>fwnA₁</i>	+	+	+	+	<i>metB₁</i>	<i>pabA₁</i>	+	+	1
	<i>olvA₁</i>	<i>hisD₄</i>	<i>bioA₁</i>	<i>lysA₇</i>	<i>leuA₁</i>	<i>metB₁</i>	<i>pabA₁</i>	+	+	1
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	-	+	+	+	<i>pabA₁</i>	<i>argA₁</i>	-	2
	<i>fwnA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	+	+	+	<i>argA₁</i>	+	1
	<i>olvA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	<i>leuA₁</i>	<i>metB₁</i>	<i>pabA₁</i>	<i>argA₁</i>	+	1
	<i>fwnA₁</i>	+	+	+	+	<i>metB₁</i>	+	+	<i>cspA₁</i>	1
	<i>olvA₁</i>	-	+	+	<i>leuA₁</i>	<i>metB₁</i>	+	+	<i>cspA₁</i>	1
	<i>olvA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	<i>leuA₁</i>	<i>metB₁</i>	+	+	-	1
	<i>olvA₁</i>	<i>hisD₄</i>	+	+	<i>leuA₁</i>	+	+	+	+	1
	<i>fwnA₁</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	4
Total										137

TABELA 25- Análise genética de segregantes haplóides dos diplóides
N875 SM13, N868 SM13 e N805 SM22.

Diplóides	Marcadores (Grupos de Ligação)		Fenótipos segregantes				Porcentagem de recombinação
	a*	b**	ab	ab ⁺	a ⁺ b	a ⁺ b ⁺	
<i>N875 SM13</i>	<i>trpA</i> ₁ (II)	<i>metA</i> ₁ (IV)	12	60	42	119	56,2
	<i>pyrA</i> ₅ (III)	<i>metA</i> ₁ (IV)	11	39	43	140	64,8
	<i>hisC</i> ₃ (IV)	<i>metA</i> ₁ (IV)	25	78	29	101	54,1
	<i>pheA</i>₁(V)	<i>metA</i>₁(IV)	1	175	53	4	2,1
	<i>pdxA</i> ₂ (VI)	<i>metA</i> ₁ (IV)	31	103	23	76	45,9
	<i>nicB</i> ₅ (VII)	<i>metA</i> ₁ (IV)	5	91	49	88	39,9
<i>N868 SM13</i>	<i>pyrA</i> ₅ (III)	<i>metA</i> ₁ (IV)	0	22	42	103	61,7
	<i>leuA</i> ₁ (IV)	<i>metA</i> ₁ (IV)	32	56	10	69	60,5
	<i>pheA</i>₁(V)	<i>metA</i>₁(IV)	0	117	42	8	4,8
	<i>pabA</i> ₁ (VI)	<i>metA</i> ₁ (IV)	2	35	40	90	55,1
	<i>oliC</i> ₂ (VII)	<i>metA</i> ₁ (IV)	34	98	8	27	36,5
<i>N805 SM22</i>	<i>olvA</i> ₁ (I)	<i>argA</i> ₁ (IV)	1	67	47	22	65,0
	<i>hisD</i> ₄ (II)	<i>argA</i> ₁ (IV)	6	67	17	47	38,7
	<i>lysA</i> ₇ (III)	<i>argA</i> ₁ (IV)	2	28	21	86	64,2
	<i>leuA</i> ₁ (IV)	<i>argA</i> ₁ (IV)	1	67	22	47	35,0
	<i>metB</i>₁(V)	<i>argA</i>₁(IV)	1	101	22	13	10,2
	<i>pabA</i> ₁ (VI)	<i>argA</i> ₁ (IV)	15	57	8	57	47,4

*- marcadores referentes às linhagens derivadas da *N402*

** - marcadores referentes às linhagens derivadas da *10v10*

Com base nos dados da FIGURA 4, e pelas análises genéticas realizadas neste trabalho, podem ser sugeridas as equivalências dos grupos de ligação das linhagens de referência derivadas da *N402* e linhagens derivadas da *10v10*, ambas de *A. niger*, apresentadas na FIGURA 5.

Mapeamentos em linhagens de *A. niger* foram feitos por LHOAS (1967) que relatou a distribuição de 31 marcadores em seis grupos de ligação e tentou estabelecer a ordem dos genes em um desses grupos. Van TUYL (1977), a partir de um tipo selvagem diferente, estudando resistência a fungicidas, também observou seis grupos de ligação em *A. niger*.

As linhagens estudadas por LHOAS mostraram-se incompatíveis com as linhagens derivadas da *10v10* (BONATELLI Jr., comunicação pessoal) e com as linhagens *N402* (BOS e col., 1993). As de Van TUYL não estão mais disponíveis e nenhuma informação se tem quanto à sua compatibilidade com as linhagens de LHOAS ou com as linhagens derivadas da *10v10* e *N402*.

Neste trabalho, verificou-se a compatibilidade entre as linhagens derivadas da *10v10* e da *N402* de *A. niger*. Os grupos de ligação não são correspondentes, em muitos casos, porque cada autor usou denominações diferentes para esses grupos e também marcadores diversos, conforme os mutantes que iam obtendo, sem considerar os trabalhos dos outros. Para o isolamento de mutantes, a linhagem *N402* foi submetida a baixas doses de luz ultravioleta. A linhagem *10v10*, é uma linhagem de origem industrial, utilizada para produção de ácido cítrico, tendo sido submetida, anteriormente, a diversos tipos de manipulações, o que deve ter gerado alterações em vários níveis, inclusive translocação gênica.

FIGURA 5 - Esquema das equivalências dos grupos de ligação (GL) entre as linhagens 10v10 e N402 de *Aspergillus niger*.

GL, 10v10		GL, N402	
I	→	I	
II, III	→	VI	
IV	→	V	

10v10 - N402 (equivalência hipotética)*

10v10	I	<u>obA₃</u>		<u>nicA₁</u>		<u>fwnA₁</u>
N402	I	<u>obA₁</u>				<u>fwnA₁</u>
N402	II	<u>trpA₁</u>		<u>leuC₅</u>		<u>argH₁₂</u> <u>hisD₄</u>
N402	III	<u>pyrA₅</u>		<u>lysA₇</u>		<u>bioA₁</u>
N402	IV	<u>argI₈</u>		<u>leuA₁</u>		<u>hisC₃</u>
10v10	IV	<u>metA₁</u>	+			<u>argA₁</u>
N402	V	<u>metB₁</u>	<u>pheA₁</u>	<u>nicA₁</u>		+
10v10	II/III		<u>pabA₁</u>		+	+
N402	VI	<u>pabA₁</u>	+		<u>pdcA₂</u>	<u>lysD₂₅</u>
N402	VII	<u>nicB₂</u>	<u>oxc₅</u>	<u>trpB₂</u>	<u>alc₂</u>	<u>hst₂₉</u>
N402	VIII	<u>nirA₃</u>	<u>antB₁</u>	<u>pyrD₈</u>		

*. A ordem dos genes não foram consideradas.

4.4. Localização dos genes *glaA*, *aglA* e *pepA*

Para a localização no cromossomo de genes clonados usando CHEF- SOUTHERN, sondas cromossomo-específico para todos os grupos de ligação (GL), são necessárias. Como em *A. niger* o número de sondas são disponíveis apenas para poucos genes clonados, e, com o objetivo de obter algumas sondas específicas adicionais, tres genes clonados, *glaA*, *aglA* e *pepA* de *A. niger* foram mapeados usando análise genética. Para esse fim, foram usadas linhagens nas quais esses genes foram deletados por substituição de genes (item 3.1.2). Em duas dessas linhagens ($\Delta\Delta23$ e *AB1.1*), o gene foi rompido pelo gene *pyrG* de *A. oryzae* (*aglA*) e o gene *pyrG* de *A.nidulans* (*pepA*). Na linhagem *AB4.1ΔGLA* o gene *glaA* foi substituído pelo gene de resistência a fleomicina. O uso de linhagens com genes deletados e substituição de genes permite também uma análise mais direta da mutação, por auxanografia por exemplo, em mutantes que contenham mutações originalmente de caracterização laboriosa, como a de uma quantificação enzimática. Diplóides das linhagens transformadas com uma linhagem mestra (item 3.1.1) foram sintetizados de acordo com o descrito no item 3.6.1.2. Após o isolamento dos segregantes haplóides dos diplóides *N890//AB1.1* e *N890//ΔΔ23*, como descrito no item 3.7.1, a segregação da marca *pyr+* foi analisada e assim a localização do gene rompido pode ser inferida. O gene *glaA* foi localizado de maneira similar por análise da segregação do marcador fleomicina-resistente usado para substituir o gene *glaA* na análise dos segregantes haplóides do diplóide *N849 AB4.1ΔGLA*.

Os resultados desses experimentos estão sumarizados na TABELA 26. Pode-se verificar que os genes *pyrG*₁ e *pyrA*₅ são alelos (BOS e col., 1993) e podem ambos ser complementados com o gene *pyrG* de *A. oryzae* e *A. nidulans*. Como pode ser observado pela porcentagem de recombinantes, os tres genes puderam ser mapeados: *pepA* no GL I, *glaA* no GL VI e *aglA* no GL VIII. O resultado da localização de *pepA* está em concordância com os resultados

obtidos por MATTERN e col. (1992) que relataram em *A. niger*, a localização genética de uma mutação protease, alélica de *pepA*, no cromossomo I. Quanto ao gene *glaA*, VALENT e col., 1992, trabalhando com a linhagem *10v10* de *A. niger*, mapearam uma mutação para glucoamilase (*lgp61*) no cromossomo II, o qual é correspondente ao cromossomo VI das linhagens mestras usadas para a localização do gene *glaA* (TABELA 20).

TABELA 26 - Porcentagem de recombinação entre genes marcados por deleção e marcadores em grupos de ligação específicos seguidos de haploidização do diplóide heterozigoto.

Linhagens	Grupos de Ligação							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
N849	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>lysA</i> ₇	<i>hisC</i> ₃	<i>pheA</i> ₁	<i>pdxA</i> ₂	<i>nicB</i> ₅	<i>nirA</i> ₃
AB4.1			<i>pyrG</i> ₁					
%	44	53	55	49	50	8*	65	57
N890	<i>fwnA</i> ₁	<i>argH</i> ₁₂	<i>pyrA</i> ₅	<i>leuA</i> ₁	<i>pheA</i> ₁	<i>lysD</i> ₂₅	<i>oliC</i> ₂	<i>crnB</i> ₁₂
AB1.1			<i>pyrG</i> ₁					
%	0*	58	-	60	53	67	75	47
ΔΔ23			<i>pyrG</i> ₁					
%	48	39	-	37	48	44	63	14*

Para cada análise foram isolados 140-260 segregantes.

*Valor de recombinação indicando ligação.

4.5. Obtenção de protoplastos para determinação do cariótipo eletroforético

Por meio do estudo dos segregantes dos diplóides sintetizados entre as linhagens derivadas da *10v10* de *A. niger* e as linhagens mestras, há evidências que o GL I parece ser equivalente nas duas linhagens, os GL II e III seriam equivalentes ao GL VI e quanto ao GL IV da linhagem *10v10* há forte evidência de ser o mesmo que o GL V da linhagem de referência. Porém, devido ao fato de existirem relativamente poucos marcadores em cada um dos grupos de ligação das linhagens em estudo, esses resultados não são conclusivos. Outra alternativa de comparação de cromossomos seria a aplicação da técnica PFGE, que separa os cromossomos em matriz de agarose. Essa técnica foi usada por DEBETS e col. (1990a) e VERDOES e col. (1994), que estimaram o tamanho do genoma total de *A. niger* entre 35,5 a 38,5 Mb, com tamanho dos cromossomos de variando de 6,6 Mb (GL IV) a 3,5 Mb (GL V e I).

Com o objetivo de comparar os cromossomos das linhagens derivadas da *10v10* e as linhagens mestras, através do PFGE, a obtenção de protoplastos das linhagens em estudo foi feita de acordo com o item 3.8. Porém, o sucesso na separação dos cromossomos por PFGE depende, entre outros fatores, da quantidade de protoplastos obtidos, ao redor de 10^8 protoplastos/ml. Como pode ser observado nas TABELAS 27, 28, 29, 30 e 31, foram feitas mudanças nos diferentes experimentos em relação ao estabilizador osmótico, quantidade e/ou tipo de enzima utilizada, tempo de crescimento do micélio, etc. A linhagem *PF* foi escolhida, entre outras, para a padronização do protocolo a ser utilizado. Nos experimentos de 1 a 8 (TABELA 27) variou-se o tempo de crescimento do micélio, e o tempo de digestão da parede celular, porém o meio de cultura utilizado (MCS, item 3. 2.4), assim como as enzimas (Novozym 234 + Cellulase CP) permaneceram constantes. No experimento 3, o estabilizador osmótico foi o $MgSO_4$ 0,5 M, que, segundo BORGES (1987) apresentou melhor resultado na linhagem *10v10*, quando comparado com outros estabilizadores osmóticos. Porém, o mesmo resultado não foi obtido nesse experimento e, no caso do experimento 6,

onde foi utilizado KCl 0.6 M e MgSO₄ 0.5 M, a quantidade de protoplastos obtida foi de 3,7 x 10⁶ e 0,93 x 10⁶, respectivamente. Nos experimentos números 1, 4, 5 e 8 (TABELA 27) foi usada também a linhagem N623, linhagem essa derivada da N402, a qual apresentou um comportamento diferente da *PI*, com a quantidade de protoplastos produzidos variando de 1x10⁶ a 62x10⁶ nos diferentes experimentos.

Na TABELA 28 estão apresentados os resultados obtidos nos experimentos de 9 a 14, sendo que, do 9 ao 12, o estabilizador osmótico utilizado foi o NaCl-CaCl₂ (item 3.3.17), segundo o protocolo usado por DEBETS e col. (1990a) com variações na quantidade de enzima Novozym 234 e pequenas diferenças no tempo de digestão da parede celular. Dos experimentos de 9 a 14, mesmo com quantidades de protoplastos consideradas baixas, foram preparados os "plugs" para tentativa de determinação do cariótipo eletroforético, seguindo o protocolo descrito no item 3.9.. Em nenhum dos experimentos foi possível a visualização das bandas.

Com base nos protocolos utilizados por FERREIRA (1991), BORGES (1987), BOS (1985), DEBETS e col. (1990a), VERDOES (1994), os quais usaram linhagens de *A. niger* para produção de protoplastos, uma série de outras mudanças foram feitas nas preparações, na tentativa de aumentar a quantidade de protoplastos liberados pelas linhagens derivadas da 10v10 de *A. niger* (TABELAS 29 e 30). O melhor resultado obtido com a linhagem *PI* foi de 7 x 10⁶, no experimento 22, porém, quando se repetiram as mesmas condições (experimento 25) a quantidade de protoplastos obtida caiu para 2 x 10⁶. O experimento 26 (TABELA 30) foi montado com o objetivo de verificar se havia alguma enzima ou combinação entre elas que pudesse melhorar efetivamente a liberação de protoplastos. A produção de micélio da linhagem *PI* foi feita inoculando-se suspensão de conídios bem concentrada (~ 10⁹ conídios / ml) em MM e MC e suspensão contendo 10⁶ conídios / ml também em MM e MC. A seguir, o sistema lítico foi montado usando combinações de diferentes enzimas, em 100 mg de micélio úmido e 2 ml do estabilizador osmótico. A quantidade de

protoplastos obtidos nas amostras que foram determinadas variou de $0,04 \times 10^6$ a $0,55 \times 10^6$.

Nos experimentos 27 a 29, a obtenção de protoplastos foi feita de acordo com o descrito no item 3.8.1.6., sendo que, como consta na TABELA 31, a quantidade de protoplastos liberados, aumentou consideravelmente, quando comparados com os experimentos anteriores, realizados com as mesmas linhagens, mostrando ser um protocolo que gera alta concentrações de protoplastos.

TABELA 27 - Obtenção de protoplastos em linhagens de *Aspergillus niger*, usando a Novozym 234 e Cellulase CP como enzimas digestivas, na proporção de 1:1.

No. exper.	linhagens	tempo crescimento micélio (hs)	quantidade e de enzimas (mg/ml)	estabilizador osmótico	tempo de digestão (hs)	quantidade de protoplastos (x 10 ⁶)
1	PF	18	10	KCl 0,6M	2	0,16
	N623	18	10	KCl 0,6M	2	55
2	PF	18	10	KCl 0,6M	3	4
3	PF	16	10	MgSO ₄ 0,5M	2:30	0,8
4	PF	16	10	KCl 0,6M	2:30	<0,001
	N623	16	10	KCl 0,6M	2:30	16
5	PF	17	10	KCl 0,6M	2	0,44
	N623	17	10	KCl 0,6M	2	1
6	PF	23	10	KCl 0,6M	2:23	3,7
	PF	23	10	MgSO ₄ 0,5M	2:23	0,93
7	PF	18	10	KCl 0,6M	2:23	0,85
8	PF	16	10	KCl 0,6M	2:23	0,01
	N623	16	5	KCl 0,6M	2:23	62

TABELA 28 - Diferentes condições para obtenção de protoplastos em linhagens de *Aspergillus niger* utilizando a enzima Novozym 234

No. exper	linhagens	tempo crescimento micélio (hs)	quantidade de enzima (mg/ml)	estabilizador osmótico	tempo de digestão (hs)	quantidade de protoplastos ($\times 10^6$)
9	NO	18	10	NaCl 0,7M/CaCl ₂ 0,2M	2	3
	PF	18	10	NaCl 0,7M/CaCl ₂ 0,2M	2	3,6
10	PF	16	7,5	NaCl 0,7M/CaCl ₂ 0,2M	2	3,2
	SM22	16	7,5	NaCl 0,7M/CaCl ₂ 0,2M	2	1,7
	SV12	16	7,5	NaCl 0,7M/CaCl ₂ 0,2M	2	1
	PNO	16	7,5	NaCl 0,7M/CaCl ₂ 0,2M	2	2,8
	SM13	16	7,5	NaCl 0,7M/CaCl ₂ 0,2M	2	2,4
11	PF	16	10	NaCl 0,7M/CaCl ₂ 0,2M	2:30	5
	N402	16	10	NaCl 0,7M/CaCl ₂ 0,2M	2:30	25
	PNO	16	10	NaCl 0,7M/CaCl ₂ 0,2M	2:30	3
12	PF	17	10	NaCl 0,7M/CaCl ₂ 0,2M	2:23	5
	N402	17	10	NaCl 0,7M/CaCl ₂ 0,2M	2:23	46
	PNO	17	10	NaCl 0,7M/CaCl ₂ 0,2M	2:23	3,3
13	PF	18	6	MgSO ₄ 1M	2:30	1,4
	PNO	18	6	MgSO ₄ 1M	2:30	1,3
14	PF	23	6	KCl 0,6M	2:30	2,8
	PNO	23	6	KCl 0,6M	2:30	2

TABELA 29 - Diferentes condições para obtenção de protoplastos em linhagens de *Aspergillus niger*, utilizando-se diferentes enzimas líticas.

No exper	linhagens	meio de cultura/ tempo de crescimento	enzimas utilizadas	quantidade de enzimas (mg/ml)	estabilizador osmótico	tempo de digestão (hs)	quantidade de protoplastos ($\times 10^6$)
15	PF ^a	MCS ^b /18hs	1 ^c	5	NaCl-CaCl ₂	2	0,67
	PNO ^a	MCS/18hs	1	5	NaCl-CaCl ₂	2	< 0,01
16	PF	MC/18hs	1	5	NaCl-CaCl ₂	2	< 0,01
17	PF	MC/16hs	2+3	5	KCl 0.6M	3	0.11
	PF	MC/16hs	2+3	8	KCl 0.6M	3	0.35
18	PF	MC/11hs	1+2	8	Sacarose 0.8M	3	0.11
	PF	MC/11hs	1+2	8	Sacarose 1.0M	3	0.31
	PF	MC/11hs	1+2	8	Sacarose 1.2M	3	0.30
	N402	MC/11hs	1+2	8	Sacarose 0.8M	3	8
	N402	MC/11hs	1+2	8	Sacarose 1.0M	3	7.6
	N402	MC/11hs	1+2	8	Sacarose 1.2M	3	5.1
19	PF	MM/15hs	1	10	Sacarose 1M	2:30	0.76
	PF	MM/15hs	1	10	MgSO ₄ 1.0M	2:30	0.66
20	PF	MM/14hs	3	8	MgSO ₄ 1.2M	3	1
	N402	MM/16hs	3	8	MgSO ₄ 1.2M	3	10
21	PF	MC/10hs	1	10	Sacarose 1.0M	3	5
	N402	MC/10hs	1	5	Sacarose 1.0M	2	79
22	PF	MM/15hs	3	10	Sacarose 1.0M	2:40	7
	N402	MC/15hs	3	5	Sacarose 1.0M	2:40	123
23	PF	MC/16hs	1+3	5	Sacarose 1.0M	2:30	2
	N402	MC/16hs	1+3	5	Sacarose 1.0M	2:30	70
24	PF	MM/12hs	1+3	10	Sacarose 1.0M	2:50	2.2
	N402	MM/12hs	1+3	5	Sacarose 1.0M	2:50	8.1
25	PF	MM/15hs	3	10	Sacarose 1.0M	2:40	2
	N402	MM/18hs	3	5	Sacarose 1.0M	2:40	74

a: pré-tratamento do micélio com diotretitol em tampão fostato pH 7.3 por 1:30hs; b: MCS (item 3.2.4), MC (item 3.2.2), MM (item 3.1.1); c: enzimas: 1= Novozym 234, 2= Cellulase CP, 3= Lysing Enzymes.

TABELA 30- Diferentes condições para obtenção de protoplastos da linhagem

PF.

Nº experimento	meio de cultura	Nº conídios/ml	quantidade e tipo de enzimas	estabilizador osmótico	tempo de digestão (hs)	protoplastos/ml (x10 ⁶)
26	MC*	10 ⁹	teste 1**	Sacarose 1M	3	0,31
	MC	10 ⁹	teste 2	Sacarose 1M	3	0,23
	MC	10 ⁹	teste 3	Sacarose 1M	3	< 0,01
	MC	10 ⁹	teste 4	Sacarose 1M	2	< 0,01
	MC	10 ⁹	teste 5	Sacarose 1M	2	< 0,01
	MC	10 ⁹	teste 1	KCl 0,6M	3	0,06
	MC	10 ⁹	teste 3	KCl 0,6M	3	0,40
	MC	10 ⁹	teste 4	KCl 0,6M	3	< 0,01
	MC	10 ⁶	teste 2	Sacarose 1M	3	0,55
	MC	10 ⁶	teste 5	Sacarose 1M	3	0,04
	MM	10 ⁹	teste 3	Sacarose 1M	3	< 0,01
	MM	10 ⁹	teste 5	Sacarose 1M	3	< 0,01
	MM	10 ⁶	teste 3	Sacarose 1M	3	0,43
	MM	10 ⁶	teste 5	Sacarose 1M	3	< 0,01

*: MC (item 3.2.2.), MM (item 3.2.1); **: **Teste 1:** 23 mg/ml Novozym 234; **Teste 2:** 23 mg/ml Novozym 234 + 10mg/ml Celulase CP; **Teste 3:** 5 mg/ml Novozym 234 + 5mg/ml Cellulase CP + 5mg/ml Macerozyme; **Teste 4:** 5mg/ml Novozym 234 + 5mg/ml Celulase CP + 5mg/ml + 5mg/ml Driselase + 5 mg/ml Hemicelulase; **Teste 5:** 5mg/ml Novozym 234 + 5mg/ml Celulase CP + 5mg/ml Driselase + 5mg/ml Hemicelulase + 5mg/ml Macerozyme + 5mg/ml Meicelase.

TABELA 31 - Produção de protoplastos de linhagens de *Aspergillus niger* utilizando 1% da enzima helicase e 0,5 % de Novozym 234 em KCl 0,9M.

Nº do experimento	linhagens utilizadas	tempo (hs) de crescimento em celofane sobre MC	tempo (hs) de digestão	protoplastos/ml (x10 ⁶)
27	PF	16	2	84
	NO	16	3	77
	SM13	16	2:30	80
28	PF	18	2	88
	SM13	18	2:10	87
29	PF	18	2	91
	SM13	18	2	89
	N402	18	2	110

5. CONCLUSÕES

- Foi constatado a não complementação, no diplóide, do gene *metA*₁, presente no grupo de ligação IV das linhagens derivadas da *10v10* e *metB*₁, presente no grupo de ligação V da linhagem de referência (*N402*), podendo-se inferir, portanto, que são alelos.
- Baseado nos resultados obtidos pela análise genética, poder-se-ia concluir que os grupos de ligação I, II, III e IV das linhagens derivadas da *10v10* de *A. niger* são equivalentes aos grupos de ligação I, VI, VI, V, da *N402*, respectivamente. Dados de CHEF/Shouthern, poderiam vir a confirmar essas equivalências.
- Pela porcentagem de recombinação mitótica, obtida entre o gene *cspA*₁ e os genes presentes no grupo de ligação IV da linhagem *10v10*, na análise genética dos segregantes dos diplóides, pode-se concluir que o gene *cspA*₁ está localizado no grupo de ligação IV das linhagens derivadas da *10v10*.
- Foram ensaiados vários métodos para obtenção de protoplastos da linhagem *10v10*. O método no qual as linhagens foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura, coberto por papel celofane, utilizando KCl 0,9 M, como estabilizador osmótico e as enzimas helicase e Novozym 234, no processo de digestão, apresentou o melhor resultado, podendo ser utilizado no protocolo para determinação do cariótipo eletroforético das linhagens derivadas da *10v10* de *A. niger*.

6. RESUMO

Este trabalho teve como objetivo verificar a interação alélica, a equivalência dos grupos de ligação e ocorrência ou não de recombinação entre as linhagens *10v10* e *N402*, ambas de *Aspergillus niger*. A primeira, com marcadores genéticos em seis grupos de ligação, é uma linhagem industrial, utilizada para produção de ácido cítrico e boa produtora de glucoamilase, enquanto a outra, com marcadores genéticos distribuídos em oito grupos de ligação, é proveniente da Holanda. As linhagens foram cruzadas via ciclo parassexual para obtenção de diplóides, sendo possível verificar a compatibilidade entre elas. Em relação aos genes estudados, pode ser detectado alelismo entre o gene *metA*₁ (GL IV, da *10V10*) e o gene *metB*₁ (GL V, da *N402*). Os demais genes envolvidos nos cruzamentos mostraram complementação no diplóide. Pela análise genética dos segregantes dos diplóides obtidos, há evidências dos grupos de ligação I, II, III, IV das linhagens derivadas da *10V10* de *A. niger* serem, respectivamente, equivalentes aos grupos de ligação I, VI, VI, V, da *N402*, sugerindo, em alguns casos, a ocorrência de translocação gênica. Pela análise de segregação, também foi possível verificar a ligação do gene *cspA*₁ com os marcadores do grupo de ligação IV da linhagem *10v10*. Protoplastos das linhagens foram obtidos visando determinar o cariótipo eletroforético, usando a técnica de PFGE. Porém, as concentrações de protoplastos obtidas em vários experimentos mostraram-se insuficientes para a separação e visualização das bandas cromossômicas. Foram então, ensaiadas diferentes condições para a obtenção de protoplastos. A melhor concentração de protoplastos foi obtida quando as linhagens foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura, coberto por papel celofane, utilizado KCl 0,9 M, como estabilizador osmótico e as enzimas helicase e Novozym 234, no processo de digestão. Esse protocolo pode ser promissor para futura determinação do cariótipo eletroforético das linhagens derivadas da *10v10* de *A. niger*.

7. ABSTRACT

This work has been done aiming to verify the allelic interaction, the equivalence of the linkage groups and the occurrence of recombination among strains *10v10* and *N402* of *A. niger*. The first one has genetic markers distributed in six linkage groups and is an industrial strain used for producing citric acid and also a good glucoamylase producer. The other one has genetic markers assignment in eight linkage groups and is from a dutch group. The strains derived from *10v10* and *N402* were crossed using the parasexual cycle and showed to be compatible for diploids isolation. In relation to the genes studied, it could be detected that both *metA*₁ gene (localized on LG IV of strain *10v10*) and *metB*₁ gene (localized on LG V of strain *N402*) are allelic. No other gene studied, showed to be allelic. By genetic analysis by haploidization of heterozygous diploids, there is evidence that the linkage groups I, II, III and IV from strain *10v10* seems to be equivalent, respectively, to LG I, IV, IV and V from strain *N402* suggesting, in some cases, that translocation may have occurred. The haploidization analysis also showed clear linkage of the *cspA*₁ gene on the LG IV of strain *10v10*. In order to determine the electrophoretic karyotype using PFGE technique, protoplasts were obtained. The protoplast concentrations obtained were not enough for separation and visualization of the chromosomal bands. Thus, some modifications in the methodology used, was done to try to improve the protoplasts release. Among the different conditions that were assayed, the best one was obtained when the conidia were plated on cellophane on top of the culture medium, using 0,9 M KCl as osmotic stabilizer and both enzymes, helicase and Novozym 234. This protocol is very promising to be used in the future in order to determine the electrophoretic karyotype of the strains derived from strain *10v10* of *A. niger*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, I. G. e J. R. VILLANUEVA, 1963. Differences in the mode of action of strepzyme and *Helix pomatia* enzyme preparation on *Trichotecium roseum* spores. *Nature*, London, 200: 1231.
- AGUIRRE, M. J.; I. G. ACHA e J. R. VILLANUEVA, 1964. Formation of protoplasts of *Fusarium culmorum* by strepzyme. *Leeuwenhoek*, 30: 33-44.
- AL-AIDROOS, K., 1980. Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal Genetic and Cytology*, 22: 309-314.
- ANAND, R., 1986. Pulsed field gel electrophoresis: a technique for fractionating large DNA molecules. *Trends in Genetics*, 11: 278-283.
- ASSINDER, S. J. e A. UPSHALL, 1986. Mitotic recombination in stable and unstable chromosome III disomics of *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, 10: 601-605.
- ASSINDER, S. J.; B. GIDDINGS e A. UPSHALL, 1986. Mitotic crossing-over in chromosome I disomics of *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics*, 202: 382-387.
- AZEVEDO, J. L., 1972. O ciclo parassexual em fungos. *Revista de Microbiologia*, 3: 157-168.
- AZEVEDO, J. L., 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopatologica*, 2: 3-15.
- AZEVEDO, J. L. e S. O. P. COSTA, 1973. Exercícios Práticos de Genética. Ed. Universidade de São Paulo - (USP) - SP, 288p.
- BACHMANN, B. J. e D. M. BONNER, 1959. Protoplasts from *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 78: 550-556
- BAGAGHI, E.; M. C. C. VALADARES e J. L. AZEVEDO, 1991. Parameiosis in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsh.) Sorokin. *Revista Brasileira de Genética*, 14: 261-271.
- BAKER, G. E., 1945. Conidium formation in species of *Aspergilli*. *Mycologia*, 37: 582-600.

- BANCROFT, I. e C. P. WOLK, 1988. Pulsed homogeneous orthogonal field gel electrophoresis (PHOGE). *Nucleic Acids Research*, 16: 7405-7418
- BANDIERA, M.; D. ARMALEO e G. MORPURGO, 1973. Mitotic intragenic recombination as a consequence of heteroduplex formation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics*, 122: 137-148.
- BARACHO, I. R. e W. R. COELHO, 1978. Influence of age on origin of the colony in the proportion of binucleate conidia in *Aspergillus niger*. *Revista de Microbiologia*, 9: 1-3.
- BARBESGAARD, P., 1977. Industrial enzymes produced by members of the genus *Aspergillus*. In: Smith, J. E.; Pateman, J. A. (eds) *Genetics and Physiology of Aspergillus*. Academic Press, London. p. 391-404.
- BELLIS, M.; M. PAGES e C. ROIZES, 1987. A simple and rapid method for preparing yeast chromosomes for pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic acids Research*, 15: 6749.
- BENNET, J. W., 1979. Aflatoxins and anthraquinones from diploids of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of General Microbiology*, 113: 127-136.
- BERG, C. M. e E. D. GARBER, 1962. A genetic analysis of color mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Genetics*, 47: 1139-1146.
- BERRY, D. R.; A. CHMIEL e A. AL-ZUBAIDY, 1977. Citric acid production by *Aspergillus niger*. In: Smith, J. E.; Pateman, J. A. (eds) *Genetics and Physiology of Aspergillus*. Academic Press, London, p. 405-426.
- BIRREN, B. W.; E. LAI; S. M. CLARK; L. HOOD E M. I. SIMON, 1988. Optimized conditions for pulsed field gel electrophoretic separations of DNA. *Nucleic Acids Research*, 16: 7563-7582.
- BONATELLI Jr., R., 1977. Estabilidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, ESALQ/USP. 126p. (Tese de Mestrado).
- BONATELLI Jr., R., 1981. Parassexualidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, ESALQ/USP. 91p. (Tese de Doutorado).
- BONATELLI Jr., R. e J. L. AZEVEDO, 1992. A system for increasing variability in filamentous fungi? *Fungal Genetics Newsletter*, 39

- BONATELLI Jr., R.; J. L. AZEVEDO e G. U. VALENT, 1983. Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. *Revista Brasileira de Genética*, 4: 399-405.
- BORGES, M. I., 1987. Técnicas de protoplastização e isolamento de DNA de alto peso molecular de *Aspergillus niger*. Campinas, UNICAMP, 112p. (Tese de Mestrado)
- BOS, C. J., 1985. Induced mutation and somatic recombination as tools for genetics analysis and breeding of imperfect fungi. Wageningen Agricultural University, Wageningen. 156p. (Tese de doutorado).
- BOS, C. J., 1987. Induction and isolation of mutants in fungi at low mutagen doses. *Current Genetics*, 12: 471-474.
- BOS, C. J.; A. J. M. DEBETS; G. KOBUS; S. M. SLAKHORST e K. SWART, 1989a. Adenine and pyrimidine genes of *Aspergillus niger* and evidence for a seventh linkage group. *Current Genetics*, 16: 307-310.
- BOS, C. J.; A. J. M. DEBETS; K. SWART; A. HUYBERS; G. KOBUS e S. M. SLAKHORST, 1988. Genetic analysis and the construction of master strains for assignment of genes to six linkage groups in *Aspergillus niger*. *Current Genetics*, 14: 437-443.
- BOS, C. J.; A. J. M. DEBETS; K. SWART; T. GOOSEN e H. W. J. Van den BROEK, 1989b. Genetic analysis and gene manipulation in the imperfect fungus *Aspergillus niger*. EMBO - Alko Workshop on Molecular Biology on Filamentous Fungi, Finland. (to be published by Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research).
- BOS, C. J. e S. M. SLAKHORST, 1981. Isolation of protoplasts from *Aspergillus nidulans* conidiophores. *Canadian Journal of Microbiology*, 27: 408-416.
- BOS, C. J.; S. M. SLAKHORST; A. J. M. DEBETS e K. SWART, 1993. Linkage group analysis in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38: 742-745.
- BOSCHLOO, J. G.; A. PAFFEN; T. KOOT; W. J. J. van der TWEEL; R. F. M. van GORCOM e C. J. BOS, 1990. Genetic analysis of benzoate metabolism in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34: 225-228.

- BRADSHAW, R. E., J. W. BENNET e J. F. PEBERDY, 1983. Parasexual analysis of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of General Microbiology*, 129: 2117-2123.
- BROWN, J. P., 1971. Susceptibility of the cell walls of some yeasts to lysis by enzymes of *Helix pomatia*. *Canadian Journal of Microbiology*, 17: 205-208.
- BROWN, G. M. e J. J. REYNOLDS, 1983. (apud): Industrial Aspects of Biochemistry and Genetics. ed. N. G. ALAEDDINOGLU; A. L. DEMAINE and G. LANCINI. Series A: Life Sciences, Vol. 87, 240p.
- BUXTON, F. P., 1956. Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Journal of General Microbiology*, 15: 133-139.
- BUXTON, F. P.; D. I. GWYNNE; R. W. DAWIES, 1985. Transformation of *Aspergillus niger* using the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 37: 207-214.
- CALIL, M. R., 1988. Isolamento e análise genética de mutantes de *Aspergillus niger* com aumento na produção de amiloglicosidase. Campinas, UNICAMP, 108p. (Tese de Mestrado).
- CANTOR, C. R.; A. GAAL e C. L. SMITH, 1988. High-resolution separation and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis of DNA. 3. Effect of electrical field shape. *Biochemistry*, 27: 9216-9221
- CARLE, G. F. e M. V. OLSON, 1984. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 12: 5647-5664.
- CARLE, G. F. e M. V. OLSON, 1985. An electrophoresis karyotype for yeast. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 82: 3756-3760.
- CARLE, G. F. e M. V. OLSON, 1987. Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Methods Enzymology*, 155: 486-482.
- CATEN, C. E. 1981. *Parasexual processes in fungi*. In: Gull, K.; Oliver, S. G. ed. The fungal Nucleus. Cambridge University Press. 291p.
- CHANG, L. T., C. T. TERRY e R. W. TUVENSON, 1974. The influence of heterokaryotic conidia on the selective recovery of somatic diploids in *Aspergillus niger*. *Mycologia*, 66: 67-72.

- CLUTTERBUCK, A. J., 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Genetic and Microbiology*, 70: 423-435.
- CLUTTERBUCK, A. J., 1987. Loci and linkage map of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* (Eidam Winter n = 8). In: O'BRIEN, S. J. (ed). Genetic maps 1987. A compilation of linkage and restriction maps of genetically studied organisms. Vol 4. Cold Spring Harbor, New York.
- COLE, G. T. e L. M. POPE, 1981. *Surface wall components of Aspergillus niger conidia*. In: TURIAN, G. and H. R. HOHL (eds). The fungal spores: morphogenetic controls. London, Academic Press, p195-215.
- CULLEN, D.; E. B. SMALLEY e R. L. DIMOND, 1983. Heterokaryosis in *Fusarium tricinctum* and *F. sporotrichioides*. *Journal of General Microbiology*, 129: 3035-3041.
- DAS, A. e P. ROY, 1978. Improved production of citric acid by a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 24: 622-625.
- DAVIES, P. J.; W. E. EVANS e J. M. PARRY, 1975. Mitotic recombination induced by chemical and physical agents in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 29: 301-304.
- De BERTOLDI, M. e C. E. CATEN, 1975. Isolation and haploidization on heterozygous diploid strains in a species of *Humicola*. *Journal of General Microbiology*, 91: 63-73.
- DEBETS, A. J. M.; K. SWART e C.J. BOS, 1989. Mitotic mapping in linkage group V of *Aspergillus niger* based on selection of auxotrophic recombinants by Novozym enrichment. *Canadian Journal of Microbiology*, 35: 982-988.
- DEBETS, A. J. M., 1990. Genetic analysis of *Aspergillus niger*. Wageningen, Agricultural University, The Netherlands, 104p, (PhD Thesis).
- DEBETS, A. J. M.; E. F. HOLUB; K. SWART; H. W. J. van den BROEK e C.J. BOS, 1990a. An electrophoretic karyotype of *Aspergillus niger*. *Molecular and General Genetics* 224: 264-268.
- DEBETS, A. J. M.; K. SWART e C. J. BOS, 1990b Genetic analysis of *Aspergillus niger*: Isolation of chlorate resistance mutants, their use in mitotic mapping and evidence for an eighth linkage group. *Molecular and General Genetics*, 221: 453-458.

- DEBETS, A. J. M.; K. SWART; E. F. HOLUB; T. GOOSEN e C.J. BOS, 1990c. Genetic analysis of *amdS* transformants of *Aspergillus niger* and their use in chromosome mapping. *Molecular and General Genetics*, 222: 284-290.
- DEBETS, A. J. M.; K. SWART; R. F. HOEKSTRA e C.J. BOS, 1993. Genetic maps of eight linkage groups of *Aspergillus niger* based on mitotic mapping. *Current Genetics*, 23: 47-53.
- De la CRUZ, M. O.; D. CERSAPPE e E. O. SHAFFER, 1990. Dynamics of DNA during pulsed-field gel electrophoresis. *Physiology Review Letter*, 64: 2324-2327.
- den HERDER, I. F.; A. M. MATEO ROSELL; C. M. van ZUILEN; P. J. PUNT e C. A. M. J. J. van den HONDEL, 1992. Cloning and expression of a member of the *Aspergillus niger* gene family encoding α -galactosidase. *Molecular and General Genetics*, 233: 404-410.
- DEUTCH, C. E. e J. M. PARRY, 1974. Sphaeroplasts formation in yeast during the transition from exponential phase to stationary phase. *Journal of General Microbiology*, 80: 259-268
- DEUTSCH, J. M., 1987. Dynamics of pulsed-field electrophoresis. *Physiology Review Letter*, 59: 1255-1258.
- De VRIES, O. M. H. e J. G. H. WESSELS, 1973. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by combined action of purified alfa-1,3-glucanase and chitinase derived from *Trichoderma viride*. *Journal of General Microbiology*, 76: 319-330.
- DIATEWA, M.; I. VIARD e A. J. C. STAHL, 1981. Yeast protoplasts gained with various preparations of *Helix pomatia* digestive juice. *Biochimie*, 63
- DOMSCH, K. H.; W. GAMS e T. H. ANDERSON, 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press, London & New York.
- DOOIJEWAAARD, A. M. P.; J. H. SIESTMA e J. T. M. WOUTERS, 1973. Formation and regeneration of *Geotrichum candidum* protoplasts. *Journal of General Microbiology*, 74: 205-209.
- EDDY, A. A. e D. H. WILLIAMSON, 1957. A method of isolating protoplasts from yeasts. *Nature*, London, 119: 1252-1253.

- EDWARDS, J. H e T. S. AL-ZUBAIDY, 1977. Medical aspects of *Aspergillus*. In: Smith, J. E., Pateman, J. A. (eds.). Genetics and physiology of *Aspergillus*. Academic Press, London. pag. 525-538.
- EMERSON, S. e M. R. EMERSON, 1958. Production, reproduction and reversion of protoplasts - like structures in the osmotic strain *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 44: 668-671.
- ESPOSITO, M. S., 1978. Evidence that spontaneous mitotic recombination occurs at the two-strand stage. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 86: 6138-6141.
- ESPOSITO, M. S. e J. E. WAGSTAFF, 1981. Mechanisms of recombination. In: STRATHERN, J. N., E. W. JONES, J. R. BROACH (eds). The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. pag. 341-370.
- FABRE, F., 1978. Induced intragenic recombination in yeast can occur during the G1 mitotic phase. *Nature, London*, 272: 795-798.
- FAWCETT, P. A.; P. B. LODER; M. J. DUNCAN; . T. J. BEESLEY e E. P. ABRAHAM, 1973. Formation and properties of protoplasts from antibiotic - producing strains of *Cephalosporium acremonium*. *Journal of General Microbiology*, 79: 293-309.
- FERREIRA, A. V. B., 1991. Transformação genética de *Aspergillus niger* com um gene heterólogo de resistência ao Benomil. Campinas, UNICAMP, 120p. (Tese de Mestrado)
- FINKELMAN, M. A. J. ; J. E. ZAJIC e A. VARDANIS, 1980. New method of producing protoplasts of *Aureobasidium pullulans*. *Applied Environ. Microbiology*, 39: 923-925.
- FOGEL, S. e D. HURST, 1963. Coincidence relations between gene conversion and mitotic recombination in *Saccharomyces*. *Genetics*, 48: 321-328.
- FOURY, F. e A. GOUFFEAU, 1973. Combination of 2-deoxyglucose and sanil-gut enzyme treatments for preparing sphaeroplasts of *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of General Microbiology*, 75: 227-229.
- GENOVESI, A. D., C. W. MAGILL, 1976. Heterokaryosis and parasexuality in *Pyricularia oryzae* Cavar. *Canadian Journal of Microbiology*, 22: 531-536.

- GENTHNER, F. J. e P. T. BORGIA, 1978. Sphaeroplasts fusion and heterokaryon in *Mucor racemosus*. *Journal of Bacteriology*, 134: 349-352.
- GOOSEN, T. C.; G. B. LOEMHEUVEL; C. CYSLER; D. A. BIE; H. W. J. Van den BROEK e K. SWART, 1987. Transformation of *Aspergillus niger* using the homologous orotidine-5-phosphate-decarboxilase gene. *Current Genetics*, 11: 499-503.
- HAMLYN, P. F. e C. BALL, 1979. Recombination studies with *Cephalosporium acremonium*. In: SEBEK, O. K., A. I. LASKIN (eds). Genetics of industrial microorganisms. *Proceedings of the 3rd. Internacional Symposium on Genetics of Industrial Organisms*, Washington, DC: American Society for Microbiology, pp 185-191.
- HAMLYN, P. F.; R. E. BRADSHAW; F. M. MELLON; C. M. SANTIAGO; J. M. WILSON e J. F. PEBERDY, 1981. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 3: 321-325
- HASEGAWA, S. e J. H. NORDIN, 1969. Enzymes that hydrolyse fungal cell wall polysaccharides. *The Journal of Biological Chemistry*, 244: 5460-5470.
- HASTIE, A.C., 1970. Benlate induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, London, 266: 771.
- HASTIE, A. C., 1973. Hybridization of *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae*. *Transaction of the British Mycological Society*, 60: 511-523.
- HEAGY, F. C. e J. A. ROPER, 1952. Deoxyribonucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus* conidia. *Nature*, 170: 713.
- HIGHTOWER, R.C. e D. V. SANTI, 1989. Migration properties of circular DNAs using orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 10: 283-290.
- HINNEN, J.; B. HICKS e G. R. FINK, 1978. Transformation of yeast. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 75: 1929-1933.
- HOLLIDAY, R., 1961. Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genetical Research*, 2:231-248.

- HOLLIDAY, R., 1964a. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetical Research*, 5: 282-304.
- HOLLIDAY, R. 1964b. The induction of mitotic recombination by mitomycin C in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics*, 50: 323-335.
- INGLE, M. R. e A. C. HASTIE, 1974. Environmental factors affecting the formation of diploids in *Verticillium albo-atrum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 62: 313-321.
- ISAAC, S., 1979. Isolation and ultrastructure of protoplasts from fungi. In: PEBERDY, J. F., ed. *Protoplasts - Applications in Microbial Genetics*. A Handbook of Experimental Methods. UNIVERSITY OF NOTTINGHAM, cap.3. p12.
- ISAAC, S. e V. GOKHALE, 1982. Autolysis: a tool for protoplasts production from *Aspergillus nidulans*. *Transactions of The British Mycological Society*, 78: 389-394.
- ISAAC, S. e J. F. PEBERDY, 1979. Transformation of *Aspergillus nidulans* using *argB* gene. *Enzyme and Microbial Technology*, 8: 386-389.
- ISHITANI, G. e K. SAKAGUCHI, 1956. Hereditary variation and genetic recombination in Koji-moulds (*Aspergillus oryzae* and *A. sojae*). V. Heterokaryosis. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2: 345-400.
- ISHITANI, G.; Y. IKEDA e K. SAKAGUCHI, 1956. Hereditary variation and genetic recombination in Koji-moulds (*Aspergillus oryzae* and *A. sojae*). VI. Genetic recombination in heterozygous diploids. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2: 401-430.
- JACKSON, C. W. e J. B. HEALE, 1987. Parasexual crosses by hyphal anastomosis and protoplast fusion in the entomopathogen *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. *Journal of General Microbiology*, 133: 3537-3547.
- JOHNSTON, I. R., 1965. The composition of the cell wall of *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal*, 96: 651-658.
- KÄFER, E., 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46: 1581-1609.

- KÄFER, E., 1975. Reciprocal translocations and translocation disomics of *Aspergillus* and their use for genetic mapping. *Genetics*, 79: 7-30.
- KÄFER, E., 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Advanced Genetics*, 19: 33-131.
- KAKAR, S. N.; R. M. PARTRIDGE e P. T. MAGEE, 1983. A genetic analysis of *Candida albicans*: isolation of a wide variety of auxotrophs and demonstration of linkage and complementation. *Genetics*, 104: 241-255.
- KELLY, J. M. e M. J. HYNES, 1985. Transformation of *A. niger* by the amdS gene of *A. nidulans*. *EMBO Journal*, 4: 475-479.
- LAI, E.; B. W. BIRREN; S. M. CLARK; M. I. SIMON e L. HOOD, 1989. Pulsed field gel electrophoresis. *Bio Techniques*, 7: 34-42.
- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with para-fluorophenylalanine. *Nature*, London, 20: 744.
- LHOAS, P., 1967. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in *Aspergillus niger*. *Genetical Reserch*, 10: 45-61.
- LHOAS, P., 1968. Growth rate and haploidization of *Aspergillus niger* on medium containing p-fluorophenylalanine. *Genetical Reserch*, 12: 305-315.
- LOCKWOOD, L. B., 1975. Organic acid production. In: Pepler, H. J.; Perlman, D. (eds.). *Microbial technology*, 2ª ed. , vol.1. Academic Press New York. pag. 335-387.
- MA, G. L. C. e E. KÄFER, 1974. Genetic analysis of the reciprocal translocation T2 (I; VIII) of *Aspergillus* using the technique of mitotic mapping in homozygous diploids. *Genetics*, 77: 11-23.
- MACEDO, J. M. B., 1986. Avaliação do comportamento de *Humicola* sp. com vistas ao melhoramento genético para produção de celulasas. Rio de Janeiro, UFRJ. (Tese de Mestrado), 90p.
- MASIERO, M., 1988. Parassexualidade e produção de amiloglicosidase em *Aspergillus niger*. Campinas, UNICAMP, 110p. (Tese de Mestrado).

- MASIERO, M., 1992. Caracterização e mapeamento de genes que alteram a produção de glicoamilase em *Aspergillus niger*. Campinas, UNICAMP, 100p. (Tese de Doutorado).
- MASIERO, M. e R. BONATELLI Jr., 1989. Genetic study of auxotrophic and resistant mutants of *Aspergillus niger* and their glucoamilase production. *Revista Brasileira de Genética*, 12: 707-718.
- MATHEW, M. K.; C-H HUI; C. L. SMITH e C. R. CANTOR, 1988. High-resolution separation and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis of DNA. 4. Influence of DNA topology. *Biochemistry*, 27: 9222-9226.
- MATTERN, I. E.; J. M. van NOORT; P. van den BERG; D. B. ARCHER; I. N. ROBERTS e C. A. M. J. J. van den HONDEL, 1992. Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. *Molecular and General Genetics*, 234: 332-336.
- McCULLY, K. S. e E. FORBES, 1965. The use of *p*-fluorophenylalanine with master strains of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research*, 6: 352-359.
- MESELSON, M. S. e C. M. RADDING, 1975. A general model for genetic recombination. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 72: 358-361.
- MESSIAS, C. L., 1979. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsh) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP, 73p. (Tese de Doutorado).
- MESSIAS, C. L. e J. L. AZEVEDO, 1980. Parasexuality of the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 75: 473-477.
- MILLS, D e A.C.L. CHURCHILL, 1988. *Tilletia* spp., bunt fungi of the Gramineae. In: D. S. Ingrahm; P. H. Willians, (eds). *Genetics of Plant Pathogenic Fungi*, vol. 6. Academic Press, New York. pag. 401-414.
- MILLS, D. e K. McCLUSKEY, 1990. Electrophoretic karyotypes of fungi: The new cytology. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3: 351-357.
- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregation induced by *p*-fluorophenil-alanine. *Aspergillus News Letter*, 2: 10.

- MULDER, E. G., 1948. The microbiological estimation of copper, magnesium and molybdenum in soil and plant material. *Analytica Chimica Acta*, 2: 793-800.
- MUSILKOVÁ, M. e Z. FENCL, 1968. Some factors affecting the formation of protoplasts in *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica*, 13: 235-239.
- MUSILKOVÁ, M.; Z. FENCL e O. SEICHERTOVA., 1969. Release of *Aspergillus niger* protoplasts by *Penicillium purpurogenum* enzymes. *Folia Microbiologica*, 14: 47-50.
- NGA, B. H.; S. P. TEO e G. LIM, 1975. The occurrence in nature of a diploid strain of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 88: 364-366.
- OLIVEIRA, A. L. Z. G., 1991. Interação gênica e produção de glicoamilase em híbridos interespecíficos entre *Aspergillus niger* e *Aspergillus awamori*. Campinas, UNICAMP, 124p. (Tese de Mestrado).
- OLSON, M., 1989. Pulsed field electrophoresis. In: J. K. SETLOW, ed. Genetic Engineering. Plenum Press, New York, p. 183-227.
- ORR-WEAVER, T. L. e J. W. SZOSTAK, 1985. Fungal recombination. *Microbiological Reviews*, 49: 33-58.
- ORR-WEAVER, T. L.; J. W. SZOSTAK e R. J. ROTHSTEIN, 1981. Yeast transformation: A model system for the study of recombination. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 78: 6354-6358.
- ORR-WEAVER, T. L.; J. W. SZOSTAK e R. J. ROTHSTEIN, 1983. Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmids. *Methods Enzymology*, 101: 228-245.
- PAPA, K. E., 1973. The parasexual cycle in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 68:1201-1205.
- PAPA, K. E., 1976. Linkage groups in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 68: 159-165.
- PAPA, K. E., 1978. The parasexual cycle in *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, 70: 766-773.
- PAPA, K. E., 1984. Genetics of *Aspergillus flavus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 30: 68-73.

- PEBERDY, J. F., 1979. Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. *Annual Review of Microbiology*, 33: 21-39.
- PEBERDY, J. F., 1980. *Protoplasts - applications in microbial genetics*. A Handbook of Experimental Methods. Published by Department of Botany, University of Nottingham, England, 60p.
- PEBERDY, J. F.; C. E. BUCKLEY; D. C. DALTRY e P. M. MOORE, 1976. Factor affecting protoplasts release in some filamentous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 67: 23-26
- PONTECORVO, G., 1956. The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology*, 10: 393-400.
- PONTECORVO, G., 1958. *Trends in genetics analysis*. New York Columbia University Press.
- PONTECORVO, G. e E. KÄFER, 1958. Genetic analysis based on mitotic recombination. *Advances in Genetics*, 9: 71-104.
- PONTECORVO, G. e G. SERMONTI, 1954. Parasexual recombination in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of General Microbiology*, 11: 94-104.
- PONTECORVO, G. e J. A. ROPER, 1952. Genetic analysis without sexual reproduction by means of poliploidy in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 6:7.
- PONTECORVO, G.; J. A. ROPER e E. FORBES, 1953a. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *Journal General Microbiology*, 8: 198-210.
- PONTECORVO, G.; J. A. ROPER; L. M. HEMMONS; K. D. MACDONALD e W. J. BUFTON, 1953b. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5: 141-238.
- PRUTAMENT, A., 1964. Mitotic recombination in the *pabA*₁ cistron on *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 5: 316-327.
- RAPER, K. B. e D. I. FENNELL, 1965. The genus *Aspergillus*. Baltimore, The Willians & Wilkins Company. 686p.

- REYES, F. e R. LAHOZ, 1976. Liberation of protoplasts from mycelium of *Neurospora crassa* by means of enzymes obtained from autolysed cultures of this fungus. *Leeuwenhoek*, 42: 457-460
- RIBA, G. e A. M. RAVELOJOANA, 1984. The parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumoso roseus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 30: 922-926.
- ROEDER, G. S. e S. E. STEWARD, 1988. Mitotic recombination in yeast. *Trends in Genetics*, 4: 263-267.
- ROKEM, J. S.; D. KLEIN; H. TODER e E. ZOMER, 1986. Degradation of fungal cell walls taking into consideration the polysaccharide composition. *Enzyme and Microbial Technology*, 8: 588-592.
- ROMAN, H., 1956. Studies of gene mutation in *Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 21: 175-183.
- ROPER, J. A. 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia* (Basel), 8: 14-15.
- ROPER, J. A. 1966. The parasexual cycle. In: AINSWORTH, G. C. e A. S. SUSSMAN. *The fungi*. New York, Academic Press, v.2, p. 589-617.
- ROPER, J. A. e R. H. PRITCHARD, 1955. Recovery of complementary products of mitotic crossing-over. *Nature*, 175: 639.
- ROSIM, R. T.; O. GARCIA Jr. e I. R. BARACHO, 1978. Tamanho dos conídios e núcleos em linhagens haplóides e diplóides de *Aspergillus niger*. *Ciência e Cultura*, 30:487-492.
- SCHWARTZ, D. C. e C. R. CANTOR, 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37: 67-75
- SCHWARTZ, D. C. e M. KOVAL, 1989. Conformational dynamics of individual DNA molecules during gel electrophoresis. *Nature*, London, 338: 520-522.
- SERMONTI, G., 1969. *Genetics of antibiotic-producing microorganisms*. London, John Wiley. 398p.
- SHAHIM, M. M., 1971. Preparation of protoplasts from stationary phase cells of *Schizosaccharomyces pombe*. *Canadian Journal General Cytology*, 13: 714-719.

- SHAILUBHAI, K.; S. R. SAHASRABUDHE; K. A. VORA e V. V. MODI, 1984. Degradation of chlorobenzoates by *A. niger*. *Experientia*, 40: 406-407.
- SHANFIELD, B. e E. KÄFER, 1971. Chemical induction of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 67: 209-219.
- SHCERBAKOVA, E. Y. e M. N. RESVAYA, 1978. Formation of diploids in *Aspergillus niger* and their biosynthesis of citric acid. *Mikrobiologiya*, 46: 1064-1069.
- SIETSMA, J. H. e W. R. BOER, 1973. Formation and regeneration of protoplasts from *Pythium PRL 2124*. *Journal of General Microbiology*, 74: 211-217.
- SINGH, M. e U. SINHA, 1976. Choral hydrate induced haploidization in *Aspergillus nidulans*. *Experientia*, 32:114-115.
- SILVEIRA, W. D. e J. L. AZEVEDO, 1987. Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarhizium anisopliae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 9: 149-151
- SMITH, C. L. e C. R. CANTOR, 1987. Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. *Methods in Enzymology*, 155: 449-467
- SMITH, C. L.; P. E. WARBURTON; A. GAAL e C. R. CANTOR., 1986. Analysis of genome organization and rearrangements by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Genetics Engineering*, 8: 45-70
- SMITH, D. A., 1974. Unstable diploids of *Neurospora* and a model for their somatic behaviour. *Genetics*, 76: 1-17.
- SMITH, J. E., 1977. Asexual sporulation in filamentous fungi. In: Smith, J. E. e Berry, D. R. (eds.). *The filamentous fungi*, vol. III. Edward Arnold, London. pag. 214-239.
- SMITH, J. E e J.A. PATEMAN, (eds), 1977. *Genetics and Physiology of Aspergillus*. London, Academic Press, Inc. Ltda. 522p.
- SNELL, R. G. e R. J. WILKINS, 1986. Separation of chromosomal DNA molecules from *C. albicans* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 14: 4401-4406.

- SOUTHERN, E. M.; R. ANAND; W. R. A. BROWN e D. S. FLETCHER, 1987. A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 15: 5925-5943.
- STEPHEN, E. R. e A. NASIM, 1981. Production of protoplasts in different yeasts by mutanase. *Canadian Journal of Microbiology*, 27: 550-555.
- STERN, C., 1936. Somatic crossing-over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 4: 263-267.
- STRUHL, K.; D. STINCHCOMB; S. SCHERER e R. DAVIS, 1979. High-frequency transformation of yeast: autonomus replication of hybrid DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 76: 1035-1039.
- TINLINE, R. D., 1962. *Cochiobolus sativus*. V. Heterocaryosis and parasexuality. *Canadian Journal of Botany*, 40: 425-437.
- TRAIL, F. e D. MILLS, 1990. Growth of haploid *Tilletia* strains in planta and genetic analysis of a cross of *Tilletia caries* X *T. controversa*. *Phytopathology*, 80: 367-370.
- UNDERKOFER, L. A., 1976. Microbial Enzymes. In: Miller, B. M., Litsky, W. (eds.). Industrial microbiology. McGraw-Hill Book Company. pag. 128-164.
- UPSHALL, A., 1981. Naturally occurring diploid isolates of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 122: 7-10.
- UPSHALL, A., B. GIDDINGS e I. D. MORTIMORE, 1976. The use of Benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*. *Journal of General Microbiology*, 100: 413-418.
- VALENT, G. U., 1985. Isolamento e análise genética de mutantes com alteração na produção de amiloglicosidase em *Aspergillus niger*. Campinas, UNICAMP. 113p. (Tese de Mestrado).
- VALENT, G. U.; M. R. CALIL e R. BONATELLI Jr., 1992. Isolation and genetics analysis of *Aspergillus niger* mutants with reduced extracellular glucoamylase. *Revista Brasileira de Genética*, 15: 19-32.
- Van BRUNT, J., 1986. Fungi: the perfect hosts? *Biotechnology*, 4: 1057-1062.

- Van HARTINGSVELDT, W.; I. E. MATTERN; C. M. J. V. ZEIJL; P. H. POUWELS e C. A. M. J. J. Van den HONDEL, 1987. Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. *Molecular and General Genetics*, 206: 71-75.
- Van TUYL, J. M. V., 1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. Wageningen Agricultural University, Wageningen , The Netherlands (PhD Thesis)., 136p.
- VENEZIANO-LABATE, M. T., 1989. Genetic analysis of dicarboximide action and resistance in *Aspergillus nidulans*. University of Sheffield, Inglaterra. 163p. (PhD Thesis).
- VERDOES, J.C; M. R. CALIL; P. J. PUNT; F. DEBETS; K. SWART; A. H. STOUTHAMER e C. A. M. J. J. van den HONDEL, 1994. The complete karyotype of *Aspergillus niger*: the use of introduced electrophoretic mobility variation of chromosomes for gene assignment studies. *Molecular and General Genetics*, 244: 75-80.
- VIALTA, A., 1987. Genética e produção de amiloglucosidase em *Aspergillus awamori* e no híbrido interespecífico com *Aspergillus niger*. Campinas, UNICAMP. 173p. (Tese de Mestrado).
- VIALTA, A. e R. BONATELLI Jr., 1990. Parasexual analysis of *Aspergillus awamori* by using intraspecific diploids and interspecific hybrids with *A. niger*. *Revista Brasileira de Genética*, 13: 445-458.
- WARD, M. 1989. *Heterologous gene expression in Aspergillus*. In: NEVALAINEN, H. and M. PENTILÄ (eds). Proceedings of the EMBO-alko Workshop on Molecular Biology of Filamentous Fungi, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsing, pp119-128.
- WHELAN, W. L. e P. T. MAGGEE, 1981. Natural heterozygosity in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 145: 893-903.
- WOOD, B.J. B., 1977. Oriental food uses of *Aspergillus*. In: Smith, J. E. e Pateman, J. A. (eds.). Genetics and physiology of *Aspergillus*. Academic Press, London. pag. 481-498.
- WOOD, S. e E. KÄFER, 1969. Effects of ultraviolet irradiation on heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. I. UV - induced mitotic crossing-over. *Genetics*, 62: 507-518.

YAMAMURA, M.; Y. THERANISHI; A. TANAKA e S. FUKUI, 1975. Preparation of protoplasts of hydrocarbon-utilizing yeast cells and their respiratory activities. *Agric. Biol. Chem.*, 39: 12-20.

YUILL, E., 1950. The numbers of nuclei in conidia of *Aspergilli*. *Transactions of the British Mycological Society*, 49: 81-93