

**BC/22966**  
**IB/80591**

T/UNICAMP

C253<sub>e</sub>

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



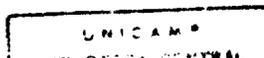
*Baracho*  
**ESTUDOS CITOGENÉTICOS DE CÉLULAS DE  
HULLE EM *Aspergillus nidulans***

**MARCOS DAVID FIGUEIREDO DE CARVALHO**

**ORIENTADOR: PROF. DR. IVANHOÉ RODRIGUES BARACHO**

Tese apresentada ao Instituto  
Biologia da UNICAMP para obtenção  
do título de Doutor em Ciências.  
Área de Concentração Genética.

Campinas - 1994



UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	C 253 e
V.	Ex.
TOMBO DO	22966
PROC.	286194
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/11/20
N.º CPD	

OK

em-00063163-7

A meu pai, Deusdedith(in memorian),  
amigo e incentivador.

A minha mãe, Nedina pelo exemplo de  
vida, de amor, trabalho e dedicação.

A minha esposa Cecília e a nossa  
filha Ana Beatriz, pelo apoio,  
carinho, estímulo e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

A todos que diretamente ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho queremos agradecer e, em especial a:

- Prof. Ivanhoé Rodrigues Baracho, meu especial agradecimento pela orientação segura, apoio, incentivo, paciência e amizade durante todo o desenvolvimento do trabalho.
- Prof. Aquiles Eugênio Piedrabuena, pela amizade, sugestões apresentadas na leitura deste trabalho e valiosa orientação na execução de análises estatísticas.
- Prof. Cláudio Luiz Messias, pelas sugestões apresentadas na leitura deste trabalho e pela amizade.
- Prof. Tomomaso Yano, pela sugestões apresentadas na leitura deste trabalho.
- A Profa. Maria Alice e as técnicas Adriana e Antônia do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia - UNICAMP, pelo auxílio valioso.
- A Profa. Débora de Queiroz Tavares e a Técnica Iara, da FEA, UNICAMP, pelo valioso auxílio na parte de microscopia eletrônica e microfotografia.
- A Profa. Christine Hackel e ao técnico Toninho pela atenção e colaboração nas fotografias.

- Aos Professores do Departamento de Genética desta instituição, pelos ensinamentos.
- Aos amigos dos curso de pós-graduação, Adalgisa, Ricardo, Ingrid, Gilberto, Maria, Christiane e Roseli pela convivência.
- Ao amigo Alfredo pela leitura do trabalho e críticas.
- As amigas Marta Baracho e Maria Regina Calil pelo carinho e auxílio nas correções.
- Companheiro e amigos do Departamento de Zootecnia, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade concedida.
- Aos funcionários do Departamento de Genética desta instituição: Ana Rita, Célia, Ernestina, Élcio, Sílvia, Tereza, pela amizade e colaboração.
- Ao Juverlandi Lugli e Ricardo Stefano pela amizade e auxílio nas análises bioquímicas.
- As bibliotecárias Norma, Zilda e Regina pela atenção e pronto atendimento.
- A todos, muito obrigado.

## ÍNDICE

	<u>Página</u>
1.0 - Introdução	01
2.0 - Revisão de Literatura	04
2.1 - Células de Hulle em <i>Aspergillus nidulans</i>	04
2.2 - Análise Citogenética em <i>Aspergillus nidulans</i>	10
3.0 - Material e Métodos	24
3.1 - Linhagens Utilizadas	24
3.2 - Meios de Cultura	28
3.2.1 - Meio Mínimo	28
3.2.2 - Meio Completo	28
3.2.3 - Meio Completo Líquido	28
3.2.4 - Meio Mínimo mais 2% de Meio Completo	29
3.2.5 - Suplementos Adicionados ao Meio Mínimo	29
3.3 - Soluções Utilizadas	30
3.3.1 - Solução de Tween	30
3.3.2 - Solução de Salina	30
3.3.3 - Solução de Vitaminas	30

3.3.4 - Solução de Ácido Nucléico	31
3.3.5 - Tampão Fosfato	31
3.3.6 - Solução de Albumina	32
3.3.7 - Solução Fixadora	32
3.3.8 - Solução de NaOH 1N	32
3.3.9 - Solução de HCl 1N	32
3.3.10 - Solução de GIEMSA	33
3.3.11 - Solução de Ácido Perclórico	33
3.3.12 - Solução 0,3N de KOH	33
3.3.13 - Solução de Acetaldeído	34
3.3.14 - Solução de Difenilamina	34
3.3.15 - Solução Estoque de DNA de Salmão (SIGMA)	34
3.3.16 - Gelatina Glicerizada	34
3.3.17 - Solução de Peptona	35
3.3.18 - Solução de Extrato de Levedura	35
3.3.19 - Solução de Caseína Hidrolisada	35
3.3.20 - Azul de Toluidina	35
3.3.21 - Esterelização	36
3.4 - Métodos	37
3.4.1 - Obtenção do Heterocário	37
3.4.2 - Obtenção de Diplóides	37

3.4.3 - Obtenção da Linhagem CH-89	38
3.4.4 - Membrana de Diálise	38
3.4.5 - Cultivo do Fungo	39
3.4.6 - Células de Hulle	39
3.4.6.1 - Dimensões das Células de Hulle	39
3.4.6.2 - Taxa de Germinação de Células de Hulle	40
3.4.6.3 - Curva de Sobrevivência	40
3.4.6.4 - Crescimento do Diâmetro do Tubo Germinativo	42
3.4.6.5 -Extração e Quantificação de DNA	43
3.4.6.5.1 - Preparo das Amostras	43
3.4.6.5.2 - Extração do DNA	44
3.4.6.5.3 - Determinação da Quantidade de DNA	45
3.4.6.5.4 - Curva Padrão	46
3.4.7 - As linhagens	46
3.4.7.1 - Taxa de Crescimento das Linhagens	46
3.4.7.2 - Produção de Células de Hulle e Conídios na Linhagem CH-89	47
3.4.8 - Núcleos de Células de Hulle	48

3.4.8.1 - Formação e Germinação de Células de Hulle	48
3.4.8.2 - Diâmetro do Macronúcleo de Células de Hulle	49
3.4.8.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura	50
3.4.8.4 - Microscopia Eletrônica de Transmissão	51
3.4.8.4.1 - Fixação	51
3.4.8.4.2 - Desidratação	52
3.4.8.4.3 - Preparo da Amostra em Gelatina	52
3.4.8.4.4 - Inclusão	53
3.4.8.4.5 - Obtenção dos Cortes Semifinos	53
3.4.8.4.6 - Obtenção dos Cortes Ultra-finos	53
4.0 - Análise Estatística	54
5.0 - Resultado e Discussão	56
5.1 - Células de Hulle	56
5.1.1 - Dimensões das Células de Hulle	56
5.1.2 - Taxa de Germinação de Células de Hulle	67
5.1.3 - Curva de Sobrevivência	71
5.1.4 - Crescimento e Diâmetro do Tubo Germinativo	75

5.1.5 - Extração e Quantificação de DNA	82
5.2 - As Linhagens	85
5.2.1 - Medidas do Crescimento das Colônias	85
5.2.2 - Produção de Células de Hulle e Conídios, na Linhagem CH-89	93
5.3 - Núcleos de Células de Hulle	100
5.3.1 - Formação e Germinação de Células de Hulle	100
5.3.2 - Diâmetro do Macronúcleo de Células de Hulle	115
5.3.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão	118
6.0 - Conclusões	126
7.0 - Resumo	128
8.0 - Summary	130
9.0 - Referências Bibliográficas	131

## 1 - INTRODUÇÃO

Células de Hulle são estruturas que apresentam formatos característicos e que normalmente aparecem em certas espécies do grupo *Aspergillus*.

EIDAM(1883) descreveu o cleistotécio de *Aspergillus nidulans*, como tendo uma cobertura externa, feita de uma rede de hifas carregando um grande número de células terminais ou intercaladas, de forma elíptica ou globosa, apresentando uma parede celular espessa, denominando-as de células de Hulle.

As células de Hulle estão associada com o cleistotécio de todas as espécies ascospóricas do grupo do *Aspergillus nidulans*, ocorrendo em grande abundância em sua volta.

Células de Hulle globosas e subglobosas aparecem também em certas espécies do grupo *Aspergillus versicolor*. Células com características iguais mais com marcada diferença de tamanho e forma, aparecem em massa de hifa em linhagens do grupo *Aspergillus ustus*. No grupo *Aspergillus flavipes*, as células de Hulle podem apresentar a forma alongada e ramificada.

Células de Hulle são estruturas especializadas de função desconhecida. SCHWARTZ(1928) mostrou que as células de Hulle são capazes de germinar, agindo como uma célula reprodutiva.

A associação de células de Hulle globosas com o cleistotécio do grupo do *Aspergillus nidulans* e a presença de estruturas homologas em outros grupos, sugere a participação das células de Hulle na formação dos cleistotécios. (EIDAM, 1983; HERMAN, KURTZ e CHAMP, 1983; ZONNEVELD, 1988).

Pouco se conhece sobre a citologia de células de Hulle. Estudos citológicos foram tentados, no entanto a espessura da parede parece dificultar a coloração da célula (DOBY, KOMBILA-FAVRY, 1978).

Para esclarecer o papel das células de Hulle em *Aspergillus nidulans*, uma série de estudos básicos faz-se necessário, especialmente sobre citologia e genética. Tais estudos poderiam fornecer informações sobre o núcleo, grau de plóidia, entre outros.

O objetivo deste trabalho foi empreender estudos iniciais citogenéticos em células de Hulle. Para isso foram seguidos os seguintes passos:

- a) estudar o núcleo no processo de formação e germinação dessas células;
- b) determinar a quantidade de DNA;
- c) determinar o tamanho da célula e do núcleo em fase de maturação;
- d) adequação de técnicas citológicas aos objetivos propostos

Tendo em vista esses objetivos, obteve-se uma linhagem de *Aspergillus nidulans* que produz poucos conídios e cleistotécios e grande quantidade de célula de Hulle, facilitando os estudos citogenéticos.

## 2.0 - Revisão de Literatura

A revisão de literatura será dividido em dois tópicos: células de Hulle em *Aspergillus nidulans* e análise citogenéticas em *Aspergillus nidulans*.

### 2.1 - Células de Hulle em *Aspergillus nidulans*

Certas espécies de fungo do gênero *Aspergillus* apresentam um tipo de célula localizadas em volta do cleistotécio denominada de células de Hulle.

EIDAM (1883), descreveu a origem e desenvolvimento de uma hifa especial associada ao ascocarpo, denominando-a de células de Hulle. Segundo EIDAM, as células de Hulle são estruturas que podem surgir tanto na posição terminal como intercalada de certas hifas. O autor sugere que elas surgem a partir de um inchamento da extremidade de hifa durante o estágio inicial da ontogenia do cleistotécio.

SCHWARTZ (1928), observou que as células de Hulle podem germinar, agindo como uma célula reprodutiva.

RAPER e FENNELL (1965) descrevem as células de Hulle como estando associadas com o cleistotécio de todas as espécies ascospóricas do grupo *Aspergillus nidulans*, apresentando desde a forma globosa até subglobosa. Células de Hulle globosas e subglobosas também aparecem em certas

espécies do grupos do *Aspergillus versicolor*. Células com as mesmas características mas com diferença marcada de tamanho e forma, aparecem também em massas de hifa em linhagens do grupo *Aspergillus ustus*. Linhagens do grupo *Aspergillus flavipes* dão origem as células de Hulle em forma ramificada e alongada. Ainda segundo RAPER e FENNEL(1965), as células de Hulle são consideradas como estruturas de função desconhecida, que normalmente ocorrem em certos grupos de *Aspergilli*. Para esses autores a associação de células Hulle com o cleistotécio no grupo *Aspergillus nidulans* e a presença de estruturas homólogas em outros grupos de *Aspergillus*, pode ser um indicativo da participação das células de Hulle na formação do cleistotécio.

MUNTANJOLA-CVETKOVIC e VUVIC (1968) sugerem que células de Hulle são estruturas com forma característica e que, normalmente, aparecem em certos grupos de espécies de *Aspergillus*, no entanto, a origem e função dessas células são desconhecidas. Segundo esses autores, as células Hulle germinam por um ou mais tubos germinativos, e, em algumas espécies, elas estão associadas com o cleistotécio (*Aspergillus nidulans* e *Aspergillus heterothallicus*), em outras são produzidas em massa (*Aspergillus protuberus* e *Aspergillus ustus*) ou individualmente na hifa (*Aspergillus versicolor*).

CLUTTERBUCK (1969), estudando mutantes de *Aspergillus nidulans* que afetam o desenvolvimento do conidióforo, encontrou dois tipos de mutantes, um tipo que forma células de Hulle e cleistotécio e outro que produz células de Hulle mas não produz cleistotécio.

HOUGHTON (1970) utilizando como fonte de carbono glicose, isolou 24 mutantes de *Aspergillus nidulans* que apresentavam um crescimento mais lento do que as linhagens normais. O autor concluiu que sob baixa condição de oxigênio, não se formava cleistotécio e que ocorria apenas pequenas quantidades de células de Hulle.

ZONNEVELD (1972) sugere que a função provável da células de Hulle seja de proteção do cleistotécio contra a falta de umidade e a proteção contra a luminosidade

MUNTANJOLA-CVETKOVIC e VUKIC (1972) cultivaram linhagens de *A. versicolor*, *A. ustus*, *A. flavipes* e *A. niveus* em quatro diferentes meios de cultura, com objetivo de observar a formação de células de Hulle na presença e na ausência da luz. Os autores observaram que a formação de células de Hulle depende diretamente da ausência da luz. Por outro lado, a presença de luz, independente do meio de cultura, inibiu o crescimento da colônia. Os autores sugeriram que a presença de luz retarda ou inibe um ou mais sistemas regulatórios os quais normalmente, retardam ou impedem a reprodução sexual.

ZONNEVELD (1973) trabalhando com *Aspergillus nidulans* utilizou o análogo de glicose, 2-deoxiglicose como fonte de carbono, verificou que na concentração acima de 40mg, o desenvolvimento do cleistotécio foi totalmente bloqueada. Na concentração de 30mg formaram-se apenas células de Hulle e nas concentrações entre 10 e 20mg, houve formação de cleistotécio maduro.

ELLIS e col. (1973) trabalharam com *Aspergillus nidulans* e mostraram que os primeiros estágios de desenvolvimento do ascocarpo foi observado entre 3 e 4 dias. No final do 7º dia encontrou-se ascocarpos maduros em poucos cleistotécios, sendo que entre o 10º e 11º dia, na maioria dos cleistotécios, os ascocarpos estavam maduros. Mostraram ainda que as de células de Hulle são usualmente globosas ou esféricas e, ocasionalmente, alongada. Elas ocorrem usualmente nas extremidades das hifas, sendo que a sua formação é acompanhada pelo espessamento da parede celular. No estudo com microscopia de transmissão em célula de Hulle verificaram a presença de vários núcleos, mitocôndrias, lipídios e grandes quantidades de produto estocado, possivelmente glicogênio.

DOBY e KOMBILA-FAVRY (1978) verificaram que em *Aspergillus nidulans* o diâmetro das células de Hulle é de 20 $\mu$  e que a espessura da parede, era, em média, de 5 $\mu$ . As células de Hulle geralmente apresentam em *Aspergillus nidulans* uma

parede porosa e refrigente. Os autores também testaram vários tipos de corantes, observando que, com o reativo de Schiff, a parede corou fracamente de rosa, enquanto o interior apresentou uma variação, entre ausência de coloração até um rosa intenso. Já na coloração com Eosina, o interior não corou, mas a parede apresentou uma fraca coloração rosa. Por outro lado, os ascósporos coraram muito bem de rosa quando foi utilizado o corante Schiff e, de rosa-vermelho quando o corante foi a Eosina.

KURTZ e CHAMPE (1981) selecionaram um mutante que produzia grande quantidade de células de Hulle, sem que houvesse necessariamente a formação de cleistotécio. Para os autores, a incapacidade de completar o desenvolvimento sexual estava relacionada com a presença de uma lacase, a qual estava associada com a formação de células de Hulle e da parede do peritécio.

HERMAN e col. (1983) trabalhando com *Aspergillus nidulans* destacaram a importância das células de Hulle no desenvolvimento dos corpos de frutificação, e propondo que, como elas são lacases positivas, semelhante aos primórdios cleistoteciais, elas podem ter uma participação direta na morfogênese cleistotecial. Segundo os autores as células de Hulle não obtêm sua lacase nos primórdios, pois células de Hulle de algumas linhagens mutantes, que não produzem cleistotécio são lacases positivas, sugerindo que o

transporte enzimático sejam de células de Hulle para os primórdios.

ZONNEVELD (1988), trabalhando com um mutante aconidial, sugeriu que o fungo filamentoso, *Aspergillus nidulans*, inicia os corpos de frutificação ou cleistotécio com a formação de uma aparente hifa dicariótica. Segundo o autor, o primeiro sinal da diferenciação do cleistotécio é a formação de uma curta hifa que tem ramos vigorosos, começando com a formação de células de Hulle, e em seguida um corpo aparece aumentando de tamanho e formando o corpo de frutificação ou cleistotécio. Na linhagem estudada, o surgimento das células de Hulle ocorreu no terceiro dia após a inoculação do fungo com a formação do grupo de células e, em volta dessas inicia-se o desenvolvimento do cleistotécio.

## 2.2 - Análise Citogenéticas em *Aspergillus nidulans*

Os estudos relacionados com aspectos citogenéticos em *Aspergillus nidulans* são difíceis devido ao reduzido tamanho dos núcleos e dos cromossomos. Por outro lado, em alguns outros microorganismos eucarióticos é possível detectar até aberrações cromossômicas, utilizando para isso técnicas microscópicas adequadas. McCLINTOCK (1945), trabalhando com *Neurospora crassa*, chamou a atenção, para a utilidade e importância de estudos genéticos, e a necessidade do conhecimento dos cromossomos e do comportamento do núcleo nesse microorganismo. Em seu trabalho descreveu os cromossomos desde a fertilização até a primeira metáfase meiótica e nas duas mitoses que ocorrem no asco. McCLINTOCK(1945) ainda testou vários métodos de coloração dos cromossomos, sendo que a orceína acética apresentou os melhores resultados.

Investigações prévias, relatando o número de núcleos em conídios de *Aspergilli*, foram realizadas por DANGEARD (1907), que mostrou que *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. flavus* apresentavam um único núcleo por conídio, enquanto *Eurotium(Aspergillus) herbariorum* apresentava mais de um núcleo.

WAKAYAMA (1931) examinou 30 espécies de *Aspergillus*, compreendendo: *A. albus*, *A. aureus*, *A. awamori*, *A. clavatus*,

*A. fumigatus*, *A. giganteus*, *A. glaucus*, *A. gymnosardae*, *A. melleus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. varians*, e verificou que em todas as espécies, os conídios eram uninucleados.

WHELDEN (1940) confirmou os dados de WAKAYAMA (1931) para *A. niger*, e BAKER (1945) investigou *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. repens* e *A. echinulatus*, descrevendo as três primeiras espécies como uninucleadas e a última como multinucleada.

YUILL (1950) determinou o diâmetro dos conídios em 15 espécies de *Aspergillus*, e verificou também o número de núcleos que esses conídios continham, como pode ser observado na TABELA 1.

Segundo YUILL (1950), há uma relação entre o diâmetro do conídio e o número de núcleos. Desta forma, conídios uninucleados raramente excedem 4 $\mu$ , por outro lado, conídios com mais de um núcleo são geralmente maiores do que 5 $\mu$ .

TABELA 1

	Diâmetro do conídio(μ)	Nº de núcleos
Grupo <i>Aspergillus clavatus</i>		
<i>A. clavatus</i>	2-4x2-3	1
<i>A. giganteus</i>	3,5-4x2,4-3	1, raro 2 ou 3
Grupo <i>Aspergillus glaucus</i>		
<i>A. repens</i>	5-6,5	1, 2, raro 3 ou 4
<i>A. pseudoglaucus</i>	5,5-7,5	-
<i>A. ruber</i>	5-6,5	1, 2
<i>A. proliferans</i>	5-9,5	1, 2
<i>A. chevaliere</i>	4,5-5,5	1
<i>A. amstelodani</i>	3,5-5,2	1
<i>A. montevidensis</i>	4,5x3-4	1
<i>A. margini</i>	6-8	-
<i>A. umbrosus</i>	7-8	3, 4-6
<i>A. echinulatus</i>	8-10	3, 5-10
<i>A. medius</i>	8-10	3-5-10
<i>A. carnoyi</i>	8-10	-
<i>A. niveu.glaucus</i>	6-8	1-5-12
<i>A. gracilis</i>	3	-
<i>A. restrictus</i>	4,5-6x3-3,5	1
<i>A. penicilloides</i>	3,5-5x3,2-4	1
<i>A. itaconicus</i>	4,3-5x3,5-4	1
Grupo <i>Aspergillus fumigatus</i>		
<i>A. fumigatus</i>	2,5-3	1
<i>A. fischeri</i>	2,5-3	1
<i>A. malignus</i>	2,5-3	1
Grupo <i>Aspergillus nidulans</i>		
<i>A. nidulans</i>	3-3,5	1
<i>A. quadrilineatus</i>	3-4	-
<i>A. rugulosus</i>	3-4	-
<i>A. varicolor</i>	3-4	-
<i>A. caespitosus</i>	3,5-4,5	-
<i>A. unguis</i>	2,5-3,5	-
Grupo <i>Aspergillus ustus</i>		
<i>A. ustus</i>	3,5-5	1
<i>A. granulosis</i>	4,8-5,5	1
Grupo <i>Aspergillus flavipes</i>		
<i>A. flavipes</i>	2-3	1
Grupo <i>Aspergillus versicolor</i>		
<i>A. sydowi</i>	2,5-3	1
<i>A. janus</i>	2-2,5	1
<i>A. versicolor</i>	2,5-3,5	1
<i>A. humicolor</i>	2-3	-
Grupo <i>Aspergillus terreus</i>		
<i>A. terreus</i>	1,8-2,4	1
<i>A. carneus</i>	2,4-2,8	-
<i>A. nivens</i>	2-2,5	-
Grupo <i>Aspergillus candidus</i>		
<i>A. candidus</i>	2,5-3,5	1
Grupo <i>Aspergillus niger</i>		
<i>A. niger</i>	2,5-4	1
<i>A. foetidus</i>	4-4,5	1
<i>A. awamori</i>	3-5	1, 2, raro 3
<i>A. miyakoensis</i>	3,7-5,6	-
<i>A. pulverulentus</i>	4	1
<i>A. fumaricus</i>	5	-
<i>A. fonsecaeus</i>	5,5-8,5	2-5
<i>A. carbonarius</i>	5,5-10,5	2-5
<i>A. luchuensis</i>	3,5-4	3, 4
<i>A. japonicus</i>	4-5	1
<i>A. violaceo-fuscus</i>	3,5-5x5-6,5	1
Grupo <i>Aspergillus wentii</i>		
<i>A. panamensis</i>	2,2-2,6	1
<i>A. alliaceus</i>	2,5-3	1

	<i>A. avenaceus</i>	4-6x3,2-4	1, raro 2 ou 3
	<i>A. wentii</i>	3,5-6	1
Grupo	<i>Aspergillus tamarii</i>		
	<i>A. citrisporus</i>	5-9x5-6	4, 5
	<i>A. lutescens</i>	5-8x7-9	-
	<i>A. terricola</i>	3,5x5-7	3, 4
	<i>A. tamarii</i>	5-6,5	3, 4
Grupo	<i>Aspergillus flavus-oryzae</i>		
	<i>A. ryzae</i>	3-5x4-6	1-3
	<i>A. micro-virido-citrinus</i>	3-4,6	-
	<i>A. flavus</i>	3,3x4, 4x5	1-3
	<i>A. parasiticus</i>	4-5	3-4
	<i>A. effusus</i>	3-5x4-7	2
Grupo	<i>Aspergillus ochraceus</i>		
	<i>A. sulphureus</i>	2-3,5	1
	<i>A. quercinus</i>	2,5-3x3,5	1
	<i>A. sclerotiorum</i>	2,2,5	-
	<i>A. melleus</i>	3	1
	<i>A. ochraceus</i>	3,5-5	1
	<i>A. ostianus</i>	3-4 ou 5	1
	<i>A. sparsus</i>	3-3,5	1

Os fungos em geral, apresentam dificuldade para estudos citológicos devido ao reduzido tamanho dos núcleos e dos cromossomos (PONTECORVO e col. 1953).

Segundo (ISHITANI e col. 1956) há uma manutenção da proporção de DNA/citoplasma, tanto em linhagens haplóides quanto em linhagens diplóides em *Aspergillus nidulans*, sendo que essa proporção pode ser mantida por dois processos. Na primeira situação, há uma redução do número de núcleos por conídios em linhagens diplóides com mais de um núcleo por conídio. Na segunda situação, há aumento da quantidade de citoplasma nos conídios das linhagens diplóides que apresentam mais de um núcleo.

ELLIOTT (1960), mostrou que, em linhagens de *Aspergillus nidulans* os ascos se originam de estruturas em forma de bastão. Os dois núcleos de uma célula terminal de uma hifa ascógena se dividem simultaneamente, resultando em célula terminal uninucleada, uma célula terminal binucleada e uma célula basal uninucleada. A célula terminal alonga-se para formar os ascos, seus núcleos se fundem para formar o zigoto o qual imediatamente entra em meiose. Na diacinese e primeira metáfase, oito bivalentes são vistos: três grandes (os cromossomos 1, 2 e 3), dois de tamanho médio (os cromossomos 4 e 5), dois pequenos (os cromossomos 6 e 7) e um muito pequeno (cromossomo 8). Para realização dessas observações os cromossomos foram corados com orceína acética. Nas linhagens

diplóides a meiose ocorre normalmente até a primeira metáfase, não observando-se as fases seguintes.

ROSEMBERGER e KESSEL (1967), estudando o sincronismo da divisão nuclear em *Aspergillus nidulans*, verificaram em conidióforos germinando, uma frequência relativa de hifas contendo 2 a 8 núcleos. No entanto os conidióforos são mononucleados, podendo completar a sincronia da hifa com  $2^n$  núcleos, sendo n o dobro após a germinação. O aspecto da hifa com o número de núcleos diferente de  $2^n$  poderá indicar falta de sincronismo. A frequência de hifas não tendo  $2^n$  núcleos, depende do grau de sincronismo em hifas individuais. As hifas foram coradas com acridina orange e observada em microcópico de fluorescência.

Mitose de hifas em crescimento de *Aspergillus nidulans* foi estudada por ROBINOW e CATEN (1969) usando microscopia ótica e de transmissão. Observaram que na periferia dos núcleos é encontrado um grânulo de forma bem definida, apresentando uma forte afinidade por fuccina ácida. A mitose começa com a duplicação desses grânulos e o desenvolvimento de fibras que aumentam o comprimento gradualmente entre grânulos irmãos. A divisão da cromatina foi observada em preparações com orceína acética, diretamente após a hidrólise. Já os cromossomos iniciam seu rearranjo em duas colunas de massa cromatínica nos quais os cromossomos individualizados não podem ser distinguidos. A divisão é

completada pela migração de cromatina para o final de cada coluna, onde os cromossomos metafásicos formam a dupla barra. Na anáfase parece haver uma quebra transversal da dupla e movimento de cromatina em direção às extremidades. Na telófase, ocorre reconstrução dos núcleos filhos, a partir da massa cromatínica, que gradualmente se torna mais granular. Estudando ainda os aspectos da coloração sucessiva para o mesmo núcleo em divisão, primeiro para fibras, utilizando fuccina ácida e depois para cromossomos com orceína acética ou HCl-Giemsa, sugeriram que as fibras retém os cromossomos e que a alongação está restritamente relacionada com os movimentos de anáfase e telófase dos cromossomos. A microscopia eletrônica revelou que a mitose ocorre sem que haja o rompimento da membrana nuclear. O fuso mitótico é composto por um feixe de fibras a qual atravessam o núcleo entre duas placas de um material denso associado com o envelope. Para explicar as configurações durante a divisão da cromatina, sugeriram que os cromossomos se ligam às fibras do fuso em vários pontos ao longo do seu comprimento. Com a alongação do fuso as cromátides irmãs separam-se assimetricamente para as extremidades do fuso. A ausência de placa metafásica é devido os cromossomos se ligarem as fibras em várias partes do seu comprimento.

Em *Aspergillus nidulans*, conídios diplóides que apresentam um único núcleo tem o dobro do volume quando

comparado com linhagens haplóides. Por outro lado, o tamanho das hifas cenocíticas não é afetado pelo grau de ploidia, mas as hifas haplóides apresentam em torno da metade do número de núcleos em relação as hifas diploídes (CLUTTERBUCK, 1969). Em trabalho posterior CLUTTERBUCK (1970) observou também que existe correlação entre a divisão nuclear e a septação.

BAINBRIDGE em 1971, afirmou que a germinação de conídios, em *Aspergillus nidulans*, apresenta uma sincronia parcial. A emergência do tubo germinal foi observada em 210 minutos após a inoculação em meio líquido e com 360 minutos, 98% dos conídios apresentavam o tubo de germinação. O autor, ainda utilizando a técnica da orceína acética, mostrou que esporos com 2, 4 e 8 núcleos, germinam em 270, 390 e 480 minutos, respectivamente.

CHANG e col. (1974) demonstraram em *Aspergillus niger* que as proporções de conídios binucleados eram de 60-65%, em três linhagens haplóides e de 87-92% em duas linhagens diplóides.

MORRIS em 1976, classificou as mutações que bloqueiam a mitose de *Aspergillus nidulans* em 4 diferentes classes, recebendo os símbolos nim, bim, sep e nud. Desta forma os mutantes que bloqueiam a interfase receberam o símbolo (nim), o bloqueio na mitose (bim), o bloqueio na septação (sep) e o movimento dos núcleos (nud). Foram isolados 45 mutantes de *Aspergillus nidulans* sensíveis a temperatura que apresentavam defeito na divisão nuclear, septação e distribuição de

núcleos ao longo do micélio. Para caracterizar esses mutantes, as células foram coradas com orceína acética ou fucsina básica. Desses mutantes, 35 exibiram uma diminuição na coordenação dos fusos e no índice de cromossomos mitóticos a 42°C, indicando que eles falham para entrar em mitose; 5 mutantes falharam na formação dos septos e outros 5 mutantes apresentaram uma distribuição nuclear anormal. Segundo o autor, esse fungo pode ser um sistema útil para analisar os eventos bioquímicos da mitose. Embora os eventos morfológicos sejam conhecidos, os processos bioquímicos, como: os eventos que levam à condensação dos cromossomos, formação dos fusos mitóticos e separação dos cromossomos em anáfase não o são.

FULLER (1976) em sua revisão sobre a mitose em fungos, sugere que um conhecimento detalhado sobre esse processo será alcançado através da análise conjunta da microscopia ótica com a eletrônica.

PAES DE BARROS (1977) trabalhando com *Aspergillus nidulans*, mostrou através de estudos citológicos, que o diâmetro médio do núcleo de conídios de linhagem que apresentava duplicação cromossômica, era maior que o da linhagem haplóide balanceada. Concluiu que a técnica citológica que apresentou melhor resultado para coloração de núcleos dos conídios foi a de HCl-Giemsa.

GABRIELLI (1978) comparou o tamanho do núcleo das linhagens V-8, dissômica e MSE, e observando que a média do

núcleo da linhagem V8 era maior que o da linhagem MSE e menor que o da linhagem dissômica. A técnica citológica que apresentou os melhores resultados para a coloração de núcleos foi a do HCl-Giemsa.

SOUZA, (1979) verificou que núcleos de conídios da linhagem A e de variantes deteriorados tiveram seus diâmetros alterados pela presença ou excisão do segmento duplicado, quando comparado com os de linhagens haplóides sem duplicação.

PIZZIRANI, (1977) mostrou que linhagens de *Aspergillus niger* podem apresentar diferentes percentagens de conídios binucleados.

ROSIM, e col. (1978), estudando diferenças de tamanho de conídios uninucleados e binucleados, em linhagens haplóides e em heterocário de *Aspergillus niger*, concluíram que a classificação de linhagens haplóides e diplóides com base no tamanho do conídio não é confiável. Por outro lado houve diferença significativa entre núcleos haplóides e diplóides.

BARACHO e COELHO (1978) analisando o número de núcleos de 34 linhagens de *Aspergillus niger* verificaram que a proporção de conídios binucleados além de variável depende das condições ambientais. Sendo que a idade da colônia não afeta a proporção de conídios binucleados.

TRINCI e MORRIS (1979), estudando a morfologia e crescimento do micélio de uma linhagem de *Aspergillus*

*nidulans* sensível a temperatura(*sepA2*), mostraram que a incubação a 25°C não ocasionava diferença na septação entre a linhagem mutante e a parental. Entre 30°C e 37°C o mutante crescia 3/4 menos que a linhagem parental. Quando cultivado a 37°C o mutante não produziu septos. Para essas observações a colônia foi posta para crescer em papel celofane.

BERGEN e MORRIS, (1983) mostraram que no gênero *Aspergillus* a colônia se estabelece a partir de uma célula haplóide uninucleada, sendo que, na fase inicial, os esporos estão na fase G1, onde cada complemento de DNA não está replicado. O primeiro ciclo de divisão nuclear ocorre entre 75 a 120 minutos, dependendo das condições de crescimento. A mitose é estimada em torno de 5 minutos a 37°C; a fase G2 ocorre em 30 minutos, fase S em 25 minutos e a fase G1 em 15 minutos.

OAKLEY e col.(1983), isolaram e caracterizaram mutantes sensíveis ao calor que apresentavam a divisão nuclear bloqueada na interfase quando cultivado em temperatura restrita. Após 3,5 horas em temperatura restrita o índice mitótico da linhagem foi igual a zero. Quando a linhagem foi colocada em temperatura normal, o índice mitótico aumentou rapidamente chegando ao máximo de 78% em 7,5 minutos. Quando essa linhagem foi examinada por microscopia eletrônica o fuso mitótico estava ausente em temperatura restrita, mas apareceram em grande número quando a linhagem foi incubada

durante 5 minutos em temperatura normal. Esses dados sugerem que, em temperatura restrita, o gene *nimA5* bloqueia o ciclo de divisão nuclear em um ponto imediatamente antes do início da condensação dos cromossomos e reunião dos microtúbulos.

BERGEN e col. (1984) isolaram e caracterizaram 32 mutantes de *Aspergillus nidulans* sensíveis a temperatura que tinham a mitose bloqueada em temperatura restrita, para verificar se a mutação bloqueava a mitose na fase G1, S ou G2 do ciclo celular. Concluíram que 5 mutantes bloqueavam em interfase, 9 bloqueavam na fase G2, 9 bloqueavam na fase G1. Nove mutações não puderam ser classificadas. O bloqueio imposto pela temperatura restrita foi irreversível em 3 linhagens.

OAKLEY e RINEHART (1985), trabalhando com *Aspergillus nidulans* examinaram o efeito do agente benomil no microtúbulo e no comportamento de mitocôndrias em várias linhagens de *Aspergillus nidulans* em início de germinação. Os autores verificaram que as divisões e os movimentos nucleares foram inibidos mas, o movimento mitocondrial não. Também examinaram o efeito de 5 mutantes sensíveis ao calor que inibem o movimento do núcleo mas não inibem a divisão nuclear. Sugerindo que o mecanismo de movimento nuclear e mitocondrial não são idênticos e que os movimentos mitocondriais não requerem o funcionamento dos microtúbulos.

MIMS e col. (1988) sugeriram que a conidiação em *Aspergillus nidulans* pode ser dividida convenientemente em cinco estágios morfológicamente distintos: o desenvolvimento do talo do conidióforo, formação da vesícula do conidióforo, diferenciação da *metulae*, diferenciação dos *philiades*, e produção de conídios. Para essas observações trabalharam com microscopia de transmissão onde demonstraram que a substituição da fixação química pela fixação a frio, facilitou as observações. As características da ultraestrutura da vesícula, mitocôndria, microtubulos e núcleo foi mais clara quando a fixação da amostra foi a frio quando comparada com a fixação química. Por outro lado certas estruturas e eventos da amostra não são visíveis quando fixado quimicamente. Como exemplos, citam certas divisões mitóticas associadas com vários estágios da conidiação.

DOONAN e MORRIS, (1989) mostraram que o mutante *bimG11*, sensível a temperatura, causava um elevado índice mitótico quando incubado à temperatura de 43°C e uma incapacidade para completar a separação em anáfase para formar os núcleos filhos. Para essas observações as hifas foram postas para crescer em papel celofane, coradas com DAPI e analisadas em microscópio de fluorescência.

EL-ANI, (1990) corou as hifas de *Aspergillus flavus* comorceína acética e mostrou que há uma variação de diâmetro de 2 a 11µ e acima de 55 núcleos nas hifas mais longas.

ENOS e MORIS, (1990) mostraram que no fungo *Aspergillus nidulans* a mutação bimC4, sensível a temperatura, causa um elevado índice mitótico quando cultivado em temperatura restrita. A mutação interfere na morfologia dos fusos, não deixando ocorrer a divisão nuclear. Para realizar as observações os conídios foram postos para germinar em papel celofane e corados com DAPI e em seguida examinada em microscopia de fluorescência.

Segundo MORRIS e ENOS em 1992, recentes progressos genéticos e bioquímicos da mitose em *Aspergillus nidulans* tem sido substancial para o entendimento do processo. Sabe-se que uma quinase especial e uma fosfatase regulam a mitose. No entanto, muitos estudos da mitose do ponto de vista bioquímico continuam desconhecidos. Ainda não se conhece como a cromatina se condensa, como os fusos se formam, como os cromossomos se movem para os polos, ou como a divisão nuclear é coordenada na célula em crescimento ou síntese de DNA e citocinese.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Linhagens Utilizadas

3.1.1 - Linhagem A - Possui conídios de coloração verde e apresenta duplicação cromossômica de um segmento do grupo de ligação I translocada para o grupo de ligação II (NGA e ROPER, 1968). Figura 1 - mostra os marcadores genéticos da linhagem A.

#### 3.1.2 - Linhagem MSE (Master Strain E)

Apresenta conídios de coloração branca e marcadores nos oito grupos de ligação (McCULLY e FORBES, (1965)).

#### 3.1.3 - Linhagem proA1; pabaA6; yA1

Possui conídios amarelos e apresenta deficiência para prolina e ácido p-aminobenzóico.

#### 3.1.4 - Linhagem biA1; methG1

Apresenta conídios verdes e deficiência na síntese de biotina e metionina.

#### 3.1.5 - Linhagem CH-89

Caracteriza-se por apresentar deficiência de prolina e metionina, como também de produzir pouco peritécios e bastante células de Hulle.

3.1.6 - Diplóide MSE//A - Resulta do cruzamento da linhagem A com a MSE.

3.1.7 - Diplóide proA1;pabaA6; yA1//MSE

Resulta do cruzamento entre as linhagens proA1;pabaA6;yA1 e a MSE. A primeira apresenta deficiência de prolina e do ácido  $\alpha$ -aminobenzóico.

Com exceção dos diplóides e da linhagem CH-89, todas as linhagens usadas são do estoque do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP. Os marcadores genéticos dessas linhagens é mostrado na figura 2.

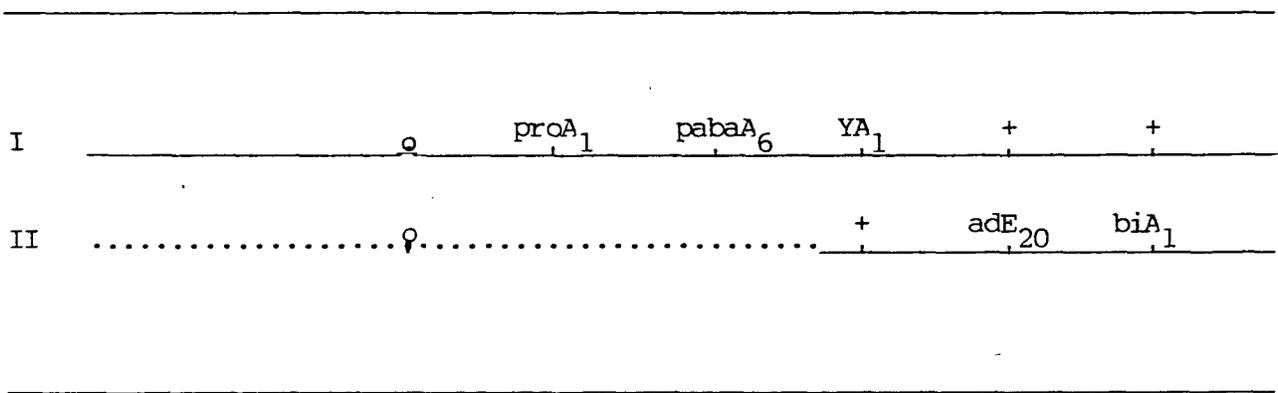


Figura 1. Marcadores genéticos da linhagem A

Os centrômeros estão designados por 0. Os fenótipos determinados pelos genes podem ser encontrados no item 3.1.1

-----grupo de ligação I

.....grupo de ligação II

Obs. as distâncias não estão em escala no mapa.

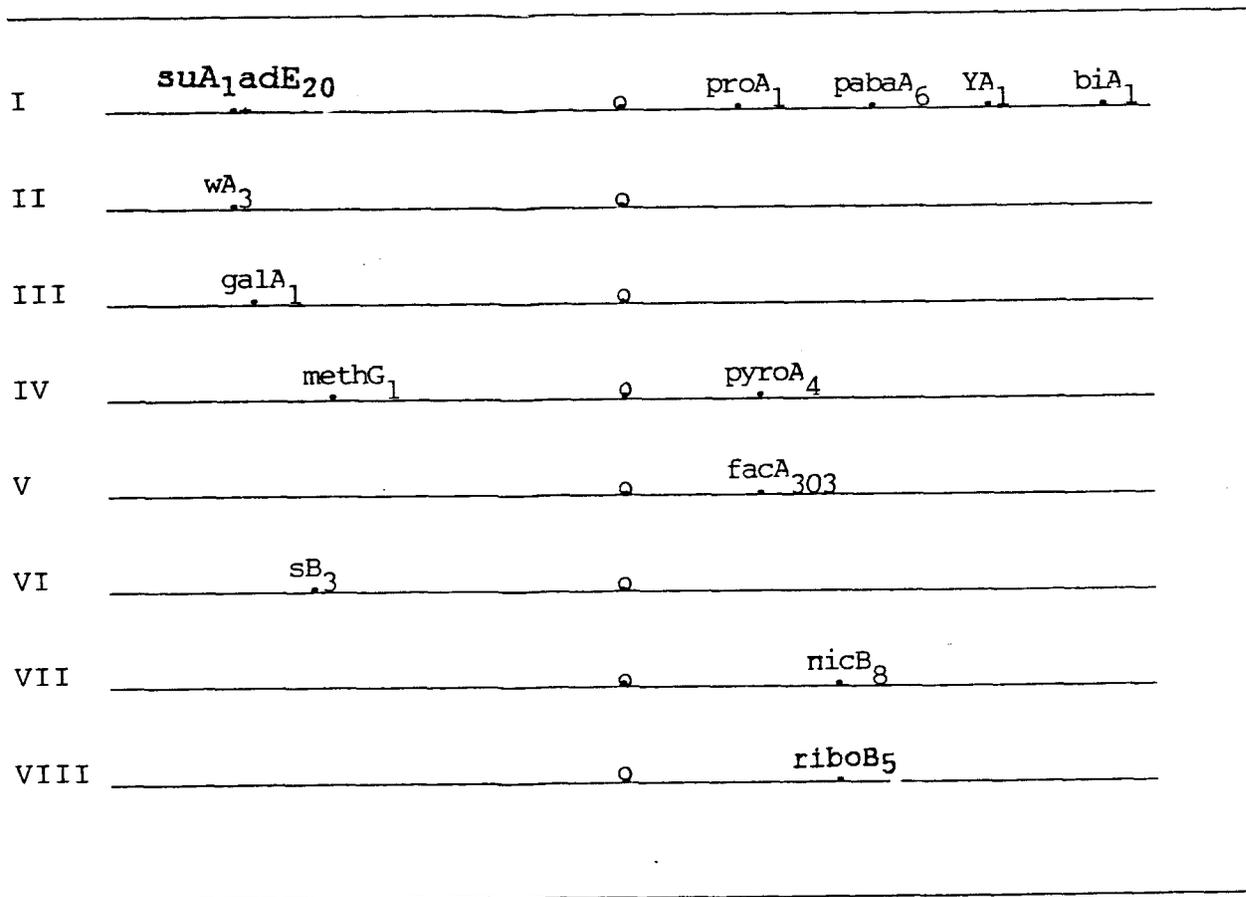


Figura 2. Grupos de ligação e localização dos marcadores genéticos, das linhagens de *A. nidulans* utilizadas. As distâncias dos marcadores não estão em escala no mapa.

0 = centrômero.

### 3.2 - Meios de Cultura

#### 3.2.1 - Meio Mínimo Líquido( PONTECORVO e *col.*, 1953)

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

O pH foi ajustado para 6,5 com 1N de HCl ou NaOH 4%; quando o meio desejado era sólido adicionava-se 15,0 gramas de ágar por litro.

#### 3.2.2 - Meio Completo Líquido( PONTECORVO e *col.*, 1953)

Foram adicionados a 1 litro de meio mínimo líquido(ítem 3.2.1):

Peptona	2,0g
Extrato de levedura	0,5g
Caseína hidrolizada	1,5g
Solução de vitaminas	1,0ml

Ácido nucléico de leveduras 2,5ml

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 4% ou HCl 1N; quando sólido, foram adicionados 15,0 gramas de agar por litro.

### 3.2.3 - Meio Mínimo Mais 2% de Meio Completo

Em tubos de ensaio, foram adicionados 3 ml de meio mínimo líquido mais 2% de meio completo líquido. Em seguidas estes tubos foram autoclavado e conservados em refrigerador.

### 3.2.4 - Suplementos Adicionado ao Meio Mínimo.

Preparou-se o estoque de suplementos com água destilada esterilizada. As soluções foram aquecidas em banho-maria por 15 minutos e conservados no refrigerador a 4°C.

	Solução estoque em 100ml H <sub>2</sub> O	Quantidade em 20ml de meio	Concnetração final
Ácido $\alpha$ -aminobenzóico	50 mg	0,1ml	0,25 $\mu$ g/ml
Prolina	1,0 g	0,1ml	50,0 $\mu$ g/ml

### 3.3 - Soluções Utilizadas

#### 3.3.1- Solução de Tween

Adicionou-se 0,1ml de tween-80 em 99,9ml de água destilada. Foram colocados 2,5 ml da solução de tween em tubos de ensaio, em seguida autoclavados e conservados sob refrigeração (4°C).

#### 3.3.2 - Solução Salina

Foram dissolvidos 8,5g de cloreto de sódio em 1000ml de água destilada. Distribui-se 9ml da solução em frascos, autoclavou-se a solução e os frascos foram conservados à temperatura ambiente.

#### 3.3.3 - Solução de Vitaminas

Biotina	0,20mg
Aneurina ou tiamina	10,0mg
Ácido $\alpha$ -aminobenzóico	10,0mg
Piridoxina	50,0mg
Ácido nicotínico	100,0mg
Riboflavina	100,0mg
Água destilada	100,0ml

A solução foi guardada em frasco escuro no refrigerador a 4°C, sobre cloroformio, após ter sido aquecida em banho-maria a 60°C por 15 minutos.

#### **3.3.4 - Solução de Ácido Nucléico de Leveduras**

Preparou-se duas soluções de ácido nucléico de leveduras. Essa dissolveu-se 2g em 15ml de solução de HCl a 1N e, na outra 2g em 15ml de solução 1N de NaOH. Ambas soluções foram aquecidas a 100°C por 20 minutos, misturadas, e o pH ajustado para 6,0 com solução de NaOH a 4%. Filtrou-se e completou-se o volume para 40ml e, em seguida conservou-se no refrigerador à 4°C, em cloroformio.

#### **3.3.5 - Tampão Fosfato (Furtado, 1968)**

Solução A - fosfato dihidrogenado de potássio            2,4g/L.

Solução B - fosfato dihidrogenado de sódio            2,8g/L

Após as soluções serem dissolvidas em água destilada, foram misturadas 7 partes da solução B com 3 partes da solução A. Na solução final o pH foi ajustado para 6,5 e, em seguida estocada em frasco escuro a 4°C.

### **3.3.6 - Solução de Albumina (ROBINOW e CATEN, 1969)**

Preparou-se uma solução com 5ml de clara de ovo em 100ml de água destilada. Filtrou-se e conservou-se em refrigerador(4°C) utilizando-se frasco escuro.

### **3.3.7 - Solução Fixadora**

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

### **3.3.8 - Solução de NaOH a 4%.**

NaOH	40,0g
Água destilada	1000,0ml

A solução foi conservada a temperatura ambiente.

### **3.3.9 - Solução de HCl 1N**

HCl(37%)	85,0ml
Água destilada	915ml

A solução foi conservada a temperatura ambiente.

### 3.3.10 - Solução de Giemsa

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

A Giemsa foi dissolvida em glicerina, e em seguida adicionado o metanol. A solução foi filtrada, guardada em frasco escuro com tampa esmerilhada a temperatura ambiente por três dias antes do início do uso.

### 3.3.11 - Solução de Ácido Perclórico

Foram preparadas várias soluções com diferentes normalidades. As soluções foram preparadas em banho de água e gelo, em frasco escuros e guardadas a 4°C.

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

### 3.3.12 - Solução 0,3N de KOH

Foi colocado 1,34g de KOH em um recipiente de plástico com 80ml de água.

### 3.3.13 - Solução de Acetaldeído

O volume de 0,1 ml de acetaldeído (1,6mg/ml), foi adicionado em 49,9 ml de água. Em seguida guardado em frasco escuro com tampa esmerilhada.

### 3.3.14 - Solução de Difenilamina

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

### 3.3.15 - Solução Estoque de DNA de Salmão (Sigma).

Em 10 ml de ácido perclórico 1,5N, foram diluídos 15mg de DNA purificado. A solução foi posta em frasco escuro e mantida sob refrigeração.

### 3.3.16 - Gelatina Glicerizada

Gelatina	5,0g
Água destilada	30,0ml
Glicerina	35,0ml
Fenol	0,125g

A gelatina foi dissolvida em água destilada aquecida a

temperatura de 60 a 80°C. Sob agitação constante foi adicionado a glicerina e o fenol. A solução foi conservada em vidro a temperatura ambiente.

### 3.3.17 - Solução de Peptona

Peptona	0,5mg
Água esterelizada	25ml

### 3.3.18 - Solução de Extrato de Levedura

Extrato de Levedura	2g
Água esterelizada	100ml

### 3.3.19 - Solução de Caseína Hidrolisada

Caseína hidrolisada	1,5g
Água esterelizada	75ml

### 3.3.20 - Azul de Toluidina

Preparar um tampão com pH 3,6, misturando 13,56ml de ácido cítrico(0,1M) com 6,44ml de fosfato ácido dissódico(0,5M). Completar o volume para 100ml. Em seguida dissolver 1 grama de azul de toluidina nos 100ml da solução

tampão. Filtrar e guardar em frasco escuro.

### **3.3.21 - Esterilização**

Quando não foi descrita outra metodologia , as soluções utilizadas foram esterelizadas em autoclave a temperatura de 120°C e a pressão de uma atmosfera por 15 minutos.

### **3.4- Métodos**

#### **3.4.1-Obtenção do Heterocário**

Conídios das diferentes linhagens com complementação para marcas auxotróficas e/ou morfológicas) foram colocados em tubos de ensaio contendo 2,5 ml de meio mínimo líquido suplementado com 2% de meio completo líquido. Após 4 dias de incubação a 37°C formou-se uma película à qual foi transferida para meio mínimo sólido. Essa película foi dividida em quatro partes e incubada a 37°C por 6 dias afim de se formarem setores heterocários.

#### **3.4.2-Obtenção de Diplóides**

Os diploides originam-se da fusão de núcleos haplóides de constituição genética diferentes.

Para obtenção dos diplóides heterozigotos, usou-se o método descrito por ROPER(1952), cuja técnica consiste em semear em meio mínimo elevada quantidade de conídios ( $10^6$  a  $10^7$ ) originários de setores heterocários. Como os conídios haplóides auxotróficos não conseguem se desenvolver em meio mínimo, somente os diplóides heterozigotos prototróficos se desenvolvem sendo, então selecionados e isolados. Pela medida do diâmetro dos conídios em microscópio, confirmava-se o

caráter diplóide dos mesmos, e esses diplóides assim obtidos foram purificados em meio mínimo.

#### **3.4.3-Obtenção da Linhagem CH-89**

O diplóide obtido resultado do cruzamento da linhagem A com a linhagem biA1; methG1, foram induzido a haploidização pela técnica de p-fluorofenilalanina (pFA), um análogo da fenilalanina que tem a propriedade de inibir o crescimento de linhagens diplóides, no entanto permite o crescimento de setores haplóides que surgem como segregantes. Segundo KAFER (1961) a haploidização ocorre espontaneamente através de aneuploidia com a perda sucessiva de cromossomos.

Selecionou-se setores de coloração que apresentava produção de conídios retardadas e produção de células de Hulle sem formar peritécios. Estes setores foram purificados obtendo-se colônias isoladas geneticamente pura para análise.

#### **3.4.4- Membrana de Diálise**

Após terem sido recortadas em dimensões de 18mm x 18mm, as membranas foram colocadas em vidro com água destilada e a seguir autoclavadas.

### **3.4.5- Cultivo do Fungo**

Com o auxílio de uma pinça, colocou-se uma membrana de diálise sobre uma superfície de meio completo. A seguir, foram feitas inoculações com a linhagem CH-89 produtora de células de Hulle em cada lado da membrana a uma distância aproximada de 1 cm, e incubadas por três dias.

### **3.4.6 - Células de Hulle**

#### **3.4.6.1- Dimensões das Células de Hulle**

Foram feitas medidas de células de Hulle provenientes das linhagens MSE, A, biA1; methG1//MSE. As linhagens foram inoculadas em meio completo e incubadas por 8-9 dias. Dessas linhagens foram retiradas células de Hulle, que foram colocadas em uma gota de água sobre uma lâmina, espalhadas e coberta com lamínula. Essa lâmina foi levada ao microscópio fazendo-se em seguida as medidas de dois diâmetros de 50 células, de cada linhagem, com a ocular micrométrica.

#### **3.4.6.2- Taxa de Germinação de Células de Hulle**

As linhagens A e CH-89 foram incubadas a 37°C em meio completo. A linhagem A foi incubada por 6, 8, 10 e 12 dias e

a linhagem CH-89 6, 8, 10, 12, 14 e 25 dias. Em cada data foi colhido material para determinar a taxa de germinação das células de Hulle. Para determinação dessa taxa procedeu-se da seguinte maneira:

a) cleistotécios da linhagem A foram retirados com uma pipeta de Pasteur distendida, isolados e rolados sobre uma lamina esterelizada. A seguir era colocado sobre o material 2 a 3 gotas de meio completo líquido;

b) com relação a linhagem CH-89, células de Hulle foram diretamente colhidas da colônia e colocadas em lâmina com 2 a 3 gotas de meio completo líquido;

c) as lâminas foram postas em placas de Petri contendo papel de filtro humedecido;

d) após 8 horas de incubação as lâminas foram retiradas e observadas ao microscópio;

e) em 30 campos escolhido ao acaso foram observado as células de Hulle e anotado o número das células germinadas e não germinadas.

#### **3.4.6.3 - Curva de Sobrevivência**

Células de Hulle e conídios da linhagem CH-89 incubada por 6 dias em placa com meio completo, foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 4ml de solução de tween. Em seguida o tubo foi agitado e a suspensão filtrada em papel de

filtro de número 10.

1 - Preparação dos conídios

O material filtrado foi transferido para tubos de ensaio e centrifugados por 3 minutos na posição 3 da centrífuga Baby. Em seguida os sobrenadantes foram descartados e o precipitado ressuspense em 2,5ml de solução de tween.

2 - Preparação da células de Hulle

O material retido no papel de filtro foi ressuspense em água destilada e distribuída em tubos de ensaio. As etapas posteriores foi de acordo com a da preparação de conídios.

3 - As suspensões preparadas em solução de tweem-80, foram agitadas e seu número estimado através de contagem com o hematómetro no microscópio. Essas suspensões foram diluídas em soluções salina(1:10) e colocadas em placa de Petri esterilizadas, e em seguida submetidas à irradiação ultravioleta em ambiente escuro, nos tempos 0, 2, 4, 8, 16 e 32 minutos. -Após cada tempo de irradiação, semeou-se 0,1ml em placa contendo meio completo. As placas foram incubadas a 37°C por um tempo aproximado de 72 horas. Em seguida contou-se o número de colônias por placa. A curva de sobrevivência foi realizada tomando-se o tempo zero de irradiação como 100% de sobrevivência.

#### 3.4.6.4 - Crescimento e Diâmetro do Tubo Germinativo

As linhagens A e CH-89 foram incubadas à 37°C em meio completo durante 6, 8, 10 e 12 dias. Em cada data foi colhido material para medições da largura e do comprimento do tubo germinativo dos conídios e das células de Hulle. Para determinação das medidas procedeu-se da seguinte maneira:

a) conídios de ambas as linhagens foram transferidos diretamente para uma lâmina contendo 2 a 3 gotas de meio completo líquido;

b) cleistotécios da linhagem A foram retirados com uma pipeta de Pasteur distendida, isolados e roladas sobre uma lâmina esterelizadas. A seguir foram colocadas 2 a 3 gotas de meio completo líquido sobre o material que então era espalhado;

c) com relação a linhagem CH-89, células de Hulle foram diretamente colhidas da colônia e colocadas em lâmina em 2 a 3 gotas de meio completo líquido;

d) as lâminas foram postas em placa de Petri contendo papel de filtro umedecido;

e) após 8 horas de incubação as lâminas foram retiradas e observadas ao microscópio. Com o auxílio de uma ocular micrométrica mediu-se a largura e comprimento dos tubos germinativos das células de Hulle e dos conídios.

### **3.4.6.5- Extração e Quantificação de DNA**

#### **3.4.6.5.1- Preparação das Amostras**

As linhagens A e CH-89 foram colocadas para crescer em meio completo e vedadas com fita celulósica durante 8 dias. Após esse período o material era transferido para tubos de ensaio contendo solução de tween a 1% da maneira como segue:

##### **1 - Preparação dos conídios**

Os conídios eram transferidos para tubos de ensaio contendo 4ml da solução. Depois eram desagregados por agitação e feita a contagem no hematímetro com o fim de estimar a quantidade por ml;

##### **2 - Preparação das Células de Hulle**

a) - Da linhagem CH-89 foram transferidas células de Hulle para tubos de ensaio contendo 4ml de solução de tween;

b) - Da linhagem A foram transferidos cleistotécios, envolto em células de Hulle para tubos de ensaio com 4ml de solução de tween;

c) Nos tubos de ensaio contendo o material foram colocado cerca de 20 pedras esféricas de vidro de número um.

Em seguida os tubos eram agitados e a suspensão filtrada em uma peneira de 40 $\mu$ m;

d) O filtrado obtido foi novamente filtrado em papel de filtro número 10;

e) O material retido no filtro foi lavado 6 vezes com água destilada;

f) Depois da lavagem, o material era ressuspensionado em água destilada e novamente filtrado em papel de filtro de número 10. O filtrado novamente era ressuspensionado em água destilada e a suspensão distribuída em tubos de ensaio;

g) A suspensão era então centrifugada e o sobrenadante descartado. Os precipitados foram colocados em um único tubo de ensaio e ressuspensionado em 4ml de solução de tween. Em seguida fez-se a quantificação com o hematímetro do número de células de Hulle e conídios por ml.

#### **3.4.6.5.2- Extração do DNA (VAN TUYLL, 1977)**

Tanto as suspensões de conídios quanto as células Hulle preparadas de acordo com o item anterior, foram transferidas para tubos de ensaio cônicos e centrifugadas por 10 minutos na posição 5 da centrífuga Excelsa Baby. Os precipitados foram lavados 2 vezes em água destilada estéril por meio de ressuspensão. Em seguida o material foi incubado em 5ml de ácido perclórico 0,2N por 10 minutos em banho de água e gelo

e centrifugado por 10 minutos. O precipitado foi suspenso em 4ml de KOH (item 3.3.12) e mantido a 37°C por mais ou menos 16 horas.

O DNA foi precipitado com a adição de 0,6 ml de ácido perclórico 3,75N (item 3.3.11) à suspensão, que foi mantida em banho de água e gelo por 10 minutos. Em seguida fez-se uma centrifugação com o mesmo tempo. Os sobrenadantes foram desprezados e o precipitado foi lavado duas vezes com 4 ml de ácido perclórico 0,2N (item 3.3.11) em banho de água e gelo. Foi adicionado ao precipitado 1ml de ácido perclórico 1,5N (item 3.3.11) por 20 minutos a 70°C, em seguida fez-se a centrifugação por 10 minutos. Uma segunda repetição foi realizada e os sobrenadantes obtidos nas duas etapas foram combinados completando-se o volume final com 3ml de ácido perclórico 1,5N.

#### **3.4.6.5.3- Determinação da Quantidade de DNA (GILES e MYERS, 1965).**

Misturou-se 2ml da solução de difenilamina (3.3.14) com 2 ml da solução teste de ácido perclórico 10% (item 3.3.11) mais 0,1ml da solução de acetaldeído 1,6mg/ml (item 3.3.13). A mistura foi incubada por 18 a 20 horas a 30°C e em seguida a leitura feita em espectrofotometro 595 e 700nm. A diferença entre as duas leituras e a comparação com a curva padrão

fornece a quantidade de DNA nas amostras.

Para as suspensões contendo células de Hulle e conídios, o cálculo final da quantidade de DNA foi feita levando-se em conta a quantidade de conídios e de células de Hulle estimada nessas suspensões e as estimativas da quantidade de DNA por conídio obtidas.

#### **3.4.6.5.4- Curva Padrão**

Retirou-se 1ml da solução estoque de DNA e adicionou-se em 36,5ml de ácido perclórico 1,5N (item 3.3.11), obtendo-se uma solução de 40µg/ml. A partir dessa solução fez-se diluições a fim de obter concentrações 20, 10, 5 µg/ml. Em seguida foram realizadas as leituras e com isso traçada a curva padrão conforme metodologia descrita no item anterior. Para controle utilizou-se ácido perclórico 1,5N (3.3.11) sem DNA.

#### **3.4.7 - As linhagens**

##### **3.4.7.1-Taxa de Crescimento das Linhagens**

As linhagens CH-89, A e biA1;methG1 foram inoculadas no centro de placas de Petri contendo meio completo e incubadas a 37°C. Foram efetuadas 6 repetições por linhagem. Após o segundo

dia de incubação fez-se diariamente a medição do diâmetro das colônias utilizando-se uma régua milimetrada. Os dados foram anotados e analisados estatisticamente por meio de análise de variância (PIMENTAL GOMES, 1984).

#### 3.4.7.2 - Produção de Células de Hulle e Conídios na Linhagem CH-89

A linhagem CH-89 foi inoculada a 37°C em placas de Petri contendo os seguintes tratamentos:

a) meio completo;

b) meio mínimo;

c) meio mínimo + (0,1ml) de extrato de levedura + (0,1ml) de prolina + (0,1ml) paba;

d) meio mínimo + (0,1ml) de peptona + (0,1ml) prolina + (0,1ml) de paba;

e) meio mínimo + (0,1ml) de solução de vitamina + (0,1ml) de prolina + (0,1ml) de paba;

d) meio mínimo + (0,1ml) de caseína hidrolisada + (0,1ml) de prolina + (0,1ml) de paba.

Para cada tratamento fez-se 4 repetições. Após 3 dias de incubação procedeu-se da seguinte maneira:

e) Mediu-se o diâmetro da colônia com uma régua milimetrada;

f) Conídios e células de Hulle da colônia inteira foram removidos para tubos de ensaio contendo 2,5ml de tween e o

número estimados em hematímetro;

g) Os resultados foram anotados e analisados estatisticamente por meio de análise de variância.

A comparação do diâmetro da colônia, do número de células de Hulle e conídios foram feitas utilizando o delineamento inteiramente casualizado. Na comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey (PIMENTEL GOMES, 1984).

### **3.4.8 - Núcleos de Células de Hulle**

#### **3.4.8.1- Formação e Germinação de Células de Hulle**

Membranas de diálise esterilizadas era colocadas em placas de Petri contendo meio completo sólido, na superfície do meio. A seguir, próximo a cada lado da membrana foi inoculada a linhagem CH-89, incubando-se por 3-4 dias. Depois desse período de incubação, quando o fungo crescia sobre a membrana, essa era retirada, e fixada em solução de CARNOY, por 25 minutos. A seguir lavava-se em água destilada e procedia-se a hidrólise com HCl 1N a 15 minutos a frio e 10 minutos a 60°C. Depois da hidrólise o material foi lavado três vezes em água destilada, e a seguir procedeu-se a coloração utilizando a mistura de 10ml de tampão e 18 gotas de solução de GIEMSA, deixando-se o material nessa mistura durante uma hora. O material assim corado era colocado em uma

lâmina e adicionado sobre a membrana três gotas de gelatina, cobrindo-se a seguir com uma lamínula e examinada ao microscópio. Já para observar o macronúcleo durante o processo de germinação, células de Hulle da linhagem CH-89 com 6 dias de incubação foram transferidas com fina pipeta de Pasteur distendida, para uma lâmina dentro de uma placa de Petri contendo papel de filtro umedecido. Em seguida colocou-se duas a três gotas de meio mínimo suplementado sobre a lâmina, homogeneizando-se com uma alça de platina. As placa foram fechada e incubadas em estufa a 37°C durante oito dias. Após esta etapa as lâminas foram retiradas e adicionadas sobre a lâmina duas gotas de solução de albumina que foram espalhadas por gravidade. As lâminas foram postas para secar durante 40 a 60 minutos. Após essa fase foram para a solução fixadora por 25 minutos e em seguida lavada quatro vezes com água destilada. Após a hidrólise e coloração conforme descrito acima, as laminas foram lavadas com solução fosfato. Uma lamínula juntamente com uma gota de gelatina glicerinada foi posta sobre uma lâmina para posterior avaliação do material no microscópio.

#### **3.4.8.2- Diâmetro do Macronúcleo de Células de Hulle**

As linhagens A, CH-89, biA1; methG1//MSE e proA1; pabaA6; y1//MSE foram cultivadas em placa de Petri contendo

meio completo, incubadas a 37°C durante oito dias. Com exceção da linhagem CH-89, as demais linhagens retirou-se com uma pinça os peritécios que foram rolados em meio com com 4% de agar a fim de separar as células Hulle. Em seguida as células de Hulle eram transferidas para uma lâmina contendo uma gota de solução de albumina. Homogeneizava-se a suspensão por toda a placa com o auxílio de uma lamínula e colocava-se para secar durante 10 minutos. Após a secagem o material foi colocado em solução fixadora durante 25 minutos. As lâminas foram lavadas três vezes em diferentes frascos com água destilada. Após essa etapa fez-se a hidrólise em ácido clorídrico 1N durante 15 minutos a temperatura ambiente e a 56°C durante 10 minutos. As lâminas foram lavadas cinco vezes em diferentes frascos com água destilada. A coloração foi realizada colocando-se 10 ml solução fosfato e 18 gotas do corante GIEMSA durante 20 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas em solução fosfato e colocada uma lamínula sobre o material corado juntamente com uma gota do tampão para serem analisadas no microscópio. Foram medidos os diâmetros de 25 núcleos ao acaso utilizando uma ocular micrométrica, optovar um e objetiva de imersão.

#### **3.4.8.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura**

Em placas contendo meio completo sólido, colocou-se três

lâminulas 15x15mm esterilizadas. Fizeram-se quatro inóculos em volta da lâminula com a linhagem CH-89 a uma distância aproximada de 0,5cm da lâminula. O material foi incubado a 37°C por 72 horas. As amostras foram transferidas para um suporte próprio, na qual foram metalizadas com ouro em metalizador à vácuo (marca JEOL), e examinadas ao microscópio eletrônico de varredura (Jeol 25SH), voltagem de aceleração 12 kV, com aumentos de 100 a 10.000 vezes. Fotografias foram feitas dos melhores campos, usando filme preto e branco Kodak (tipo VF20). Os filmes foram revelados e copiados seguindo o processo normal de rotina.

#### **3.4.8.4 - Microscopia Eletrônica de Transmissão**

##### **3.4.8.4.1- Fixação**

As células de Hulle foram colocadas em tubo de ensaio e fixadas em uma mistura 1:1 (v/v), solução de glutaraldeído 6% e tetróxido de ósmio 2% em 0,1M do tampão cacodilato de sódio pH 7,2 por quatro horas, à 4°C no escuro. A suspensão com células de Hulle foi centrifugada na posição 4 da centrífuga Baby por 3 minutos em cada mudança ou lavagem de solução. Desta forma após a primeira fixação as células foram lavadas seis vezes no tampão cacodilato de sódio 0,1M. Em seguida foram para o segundo fixador, tetróxido de ósmio 1% por duas

horas à 40°C no escuro. Fez-se nova lavagem por seis vezes no tampão cacodilato de sódio, deixando no mesmo até o momento da desidratação.

#### **3.4.8.4.2- Desidratação**

A mostra foi submetido a banhos de 15 minutos em soluções alcólicas de concentração crescente, ( 50%, 70%, 90% ) e finalizando com 100% de álcool etílico absoluto, também com dois banhos por 15 minutos.

#### **3.4.8.4.3- Preparo da Amostra em Gelatina**

Após a centrifugação por 3 minutos na posição 4 da centrífuga Baby, preparou-se uma solução de agarose à 1,5%. Após a dissolução completa manteve-se a solução gelatinosa em banho maria. A solução foi distribuída sobre uma lâmina a fim de se obter uma fina camada. Após o resfriamento fez-se orifícios com diâmetro de 3mm, e, com a ponta de uma espátula pequenas amostra foram colocadas no interior dos orifícios, seguida de uma nova camada de gelatina colocada sobre a anterior. As amostras foram cortadas com uma bisturi e individualizadas em pequenos cubos de gelatina.

#### **3.4.8.4.4 - Inclusão**

A infiltração foi em solução de acetona PA:Epon 8120 1:1 (v/v) por 15 horas. Em seguida as amostras foram incluídas em Epon e colocado na estufa por 72 horas a fim de acelerar a polimerização.

#### **3.4.8.4.5- Obtenção de Cortes Semifinos**

Cortes semifinos de aproximadamente 0,5 micra de espessura foram obtidos em ultramicrótomo LKB, com utilização de navalha de vidro. Esses cortes foram coletados em lâmina de vidro, e depois de secos e aderidos nas referidas lâminas, processou-se à sua coloração, colocando-se sobre os mesmos a solução de azul de toluidina a 1%. Depois de corados os cortes foram lavados em água corrente a fim de remover o excesso de corante. Depois de secos foram observados em microscópio e quando de interesse células foram fotografadas.

#### **3.4.8.4.6- Obtenção de Cortes Ultra-finos.**

Cortes ultrafino foram feitos com navalha de vidro em ultramicrótomo LKB e corados durante 20 minutos a temperatura ambiente em solução aquosa de acetato de uranila a 2%

(WATSON, 1958) e durante 5 minutos em solução de acetato de chumbo a 0,2% em hidróxido de sódio 1N (VENABLE E COGGESHALL, 1965).

A análise do material foi em Microscópio Eletrônico ZEISS 9S-2, operado a 60kV, aumentos de 800 a 9.200 vezes. As eletromicrografias foram realizadas em filme Kokalite 2656 ou Fuji (Fuji Eletromicroscopic Film-FG)

#### **4.0 - Análise Estatística**

Os seguintes testes estatísticos foram aplicados:

4.1 - Para comparar o tamanho das células de Hulle entre as linhagens haplóides e diplóides utilizou-se o teste de KRUSKAL e WALLIS (1952).

4.2 - Para analisar o diâmetro do núcleo de células de Hulle, e estudar o efeito ambiental no diâmetro da colônia, produção de células de Hulle e conídio, foi usada a análise de variância.

4.3 - Para comparação do crescimento em diâmetro das colônias utilizou-se a análise de variância por polinômios ortogonais.

4.4 - Para comparação do poder germinativo, usou-se o teste de paralelismo na transformação logarítmica dos

dados (SCOSSIROLI, 1962).

4.5 - A determinação das LD<sub>50</sub> e o cálculo da potência fez-se pelo método do Probit (FINNEY, 1947).

#### 4.6- Cálculo do Volume das Células de Hulle

Foram baseado na formula  $V = (4/3)\pi R^2 H$  onde,

V-Representa o volume da célula

$\pi$ -3,14

R-Raio maior

H-Raio menor, considerando que as células se assemelham a forma geométrica elipsóide.

## 5.0 - RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1 - Células de Hulle

#### 5.1.1 - Dimensões das Células de Hulle

A fim de verificar se as células de Hulle de linhagens haplóides, duplicadas e diplóides apresentavam alguma diferença de tamanho, foram feitas medidas das células de Hulle provenientes da linhagem MSE, A e biA1, methG1//MSE. Essas medidas foram realizadas da maneira descrita no item 3.4.6.1, e os resultados estão apresentados nas TABELAS 2, 3 e 4. Com as medidas foram calculados os respectivos volumes (item 4.3) que estão apresentados na TABELA 5. As médias do volume de 10 células está apresentado na TABELA 6. Esses dados foram analisados pelo teste não paramétrico de KRUSKAL-WALLIS (1952), e os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 7. Essa análise mostra que não há diferenças significativa entre os volumes das células de Hulle das três linhagens analisadas. A TABELA 8 apresenta as frequências dos volumes das células de Hulle para as três linhagens analisadas, enquanto as FIGURAS 3, 4 e 5 mostram os respectivos histogramas dessa distribuição de frequência.

Em alguns fungos verifica-se que há diferença de diâmetro de conídios entre linhagens diplóides e haplóides. Em *A. nidulans* esta diferença é constatada, sendo um dos critérios usados para caracterizar diplóides (PANTECORVO e col., 1953). Mas não parece ser um critério que possa ser estendido indiscriminadamente a qualquer espécie, pois em *Aspergillus niger*, ROSIM e col. (1978), verificaram que a classificação de linhagens haplóides de diplóides, baseada em tamanho de conídio não é confiável.

Quanto a linhagens com duplicação cromossômica, PAES de BARROS (1977) e SOUZA (1977) trabalhando com *A. nidulans* verificaram que o diâmetro dos conídios de linhagens portadora de duplicação apresentavam diferença em relação a linhagens não duplicadas.

TABELA 2. Medidas do diâmetro longitudinal(1) e transversal(2) das células de Hulle da linhagem biA1, methG1//MSE(em micra) de *Aspergillus nidulans*.

Amostra	Medidas	
	1	2
1	16,5	15,0
2	15,0	15,0
3	15,0	15,0
4	15,0	15,0
5	18,0	16,5
6	13,5	13,5
7	15,0	15,0
8	18,0	15,0
9	18,0	15,0
10	12,0	12,0
11	12,0	12,0
12	12,0	10,5
13	18,0	15,0
14	24,0	21,0
15	18,0	15,0
16	18,0	12,0
17	15,0	12,0
18	16,5	15,0
19	13,5	12,0
20	15,0	15,0
21	16,5	15,0
22	18,0	15,0
23	15,0	15,0
24	18,0	15,0
25	18,0	18,8
26	15,0	13,0
27	15,0	15,0
28	18,0	12,0
29	18,0	18,0
30	15,0	13,5
31	15,0	15,0
32	15,0	15,0
33	15,0	15,0
34	18,0	18,0
35	21,0	21,0
36	15,0	12,0
37	15,0	15,0
38	12,0	12,0
39	12,0	12,0
40	15,0	13,5
41	18,0	18,0
42	18,0	15,0
43	15,0	15,0
44	12,0	12,0
45	18,0	15,0
46	12,0	12,0
47	18,0	15,0
48	12,0	12,0
49	21,0	18,0
50	18,0	16,5

TABELA 3. Medidas do diâmetro longitudinal(1) e transversal(2) de células de Hulle da linhagem A(em micra) de *Aspergillus nidulans*.

Amostra	Medida	
	1	2
1	15,0	12,0
2	18,8	18,0
3	21,0	21,0
4	15,0	15,0
5	21,0	21,0
6	18,0	15,0
7	18,0	16,5
8	24,0	15,0
9	18,0	15,0
10	15,0	15,0
11	18,0	18,0
12	18,0	18,0
13	18,0	18,0
14	21,0	18,0
15	12,0	12,0
16	13,5	12,0
17	21,0	18,0
18	15,0	15,0
19	21,0	15,0
20	18,0	18,0
21	15,0	15,0
22	15,0	15,0
23	21,0	15,0
24	18,0	15,0
25	15,0	15,0
26	15,0	15,0
27	16,5	15,0
28	16,5	15,0
29	21,0	18,0
30	15,0	15,0
31	15,0	12,0
32	21,0	18,0
33	18,0	15,0
34	24,0	18,0
35	16,5	16,5
36	21,0	18,0
37	13,5	12,0
38	16,5	15,0
39	21,0	15,0
40	15,0	15,0
41	24,0	13,5
42	18,0	12,0
43	15,0	12,0
44	15,0	15,0
45	19,5	18,0
46	15,0	15,0
47	18,0	15,0
48	18,0	13,5
49	18,0	15,0
50	13,5	12,0

TABELA 4. Medidas do diâmetro longitudinal(1) e transversal(2) de células de Hulle da linhagem MSE(em micra) de *Aspergillus nidulans*.

Amostra	Medidas	
	1	2
1	21,0	21,0
2	21,0	21,0
3	15,0	15,0
4	18,0	15,0
5	18,0	18,0
6	15,0	15,0
7	15,0	13,5
8	16,5	16,5
9	15,0	15,0
10	21,0	18,0
11	15,0	15,0
12	18,0	15,0
13	18,0	15,0
14	15,0	12,0
15	12,0	12,0
16	18,0	18,0
17	27,0	15,0
18	18,0	18,0
19	9,0	9,0
20	15,0	15,0
21	15,0	12,0
22	15,0	15,0
23	15,0	15,0
24	15,0	15,0
25	15,0	15,0
26	15,0	15,0
27	18,0	15,0
28	21,0	21,0
29	15,0	15,0
30	15,0	12,0
31	18,0	15,0
32	15,0	13,5
33	18,0	15,0
34	15,0	15,0
35	18,0	15,0
36	24,0	21,0
37	12,0	12,0
38	15,0	15,0
39	12,0	12,0
40	12,0	13,0
41	15,0	12,0
42	18,0	18,0
43	21,0	21,0
44	12,0	12,0
45	18,0	18,0
46	24,0	24,0
47	18,0	18,0
48	15,0	15,0
49	19,5	18,0
50	21,0	21,0

Tabela 5. Volume( $\mu\text{m}^3$ ) das células de Hulle das linhagens A, MSE e biA1; methG1//MSE.  
Linhagens

<u>A</u>	<u>MSE</u>	<u>biA1; methG1//MSE</u>
1131	4849	1942
3054	4849	1767
4849	1767	1767
1767	2121	1767
4649	3054	2566
2120	1767	1288
2566	1431	1767
2827	2352	2121
2120	1767	2121
1767	3563	0905
3054	1767	0905
3054	2121	0693
3054	2121	2121
3563	1131	5542
0905	0905	2121
1618	3054	1357
3563	3181	1131
1767	3054	1944
2474	0382	1018
3054	1767	1767
1767	1131	1944
1767	1767	2121
2474	1767	1767
2121	1767	2121
1767	1767	3054
1767	1767	1431
1944	2121	1767
1944	4849	1357
3563	1767	3054
1767	1131	1431
1131	2121	1767
3563	1432	1767
4072	1767	3054
2352	2121	4849
3563	5542	1131
1018	0905	1767
1944	1767	0905
2474	0905	0905
1767	3308	1431
2290	1131	3054
1357	3054	2121
1131	4849	1767
1767	0905	0905
3308	3054	2121
1767	7238	0905
2121	3054	2121
1718	1767	0905
2121	3308	2474
1018	4849	2566

TABELA 6. Média do volume de 10 células de Hulle.

	<u>A</u>	<u>Linhagens</u> <u>MSE</u>	<u>biA1;methG1//MSE</u>
	2705,15	2751,98	1801,25
	2550,35	1948,11	1859,75
	2088,06	1983,45	2004,65
	2400,32	2198,69	1934,32
	1859,74	3320,83	1893,67
Total	11603,62	12203,06	9493,64

TABELA 7. Teste de Kruskal-Wallis para os dados da tabela 6.

<u>A</u>	<u>MSE</u>	<u>Linhagens</u> <u>biA1;methG1//MSE</u>
13	14	1
12	6	3
9	7	8
11	10	5
2	15	4
47	52	21

$$H=12/240(441,8 + 540,8 + 88,2) - 48 = 5,54ns$$

ns=não significativo

TABELA 8. Frequências do volume de células de Hulle das linhagens A, MSE e biA1, methG1//MSE.

Volume em $\mu\text{m}^3$	<u>Linhagens</u>		
	<u>A</u>	<u>MSE</u>	<u>biA1, methG1//MSE</u>
238-1238	6	9	11
1239-2238	23	23	30
2239-3238	12	8	7
3239-4238	7	3	0
4239-5238	2	5	1
5239-6238	0	1	1
6238-7238	0	1	0
Totais	50	50	50

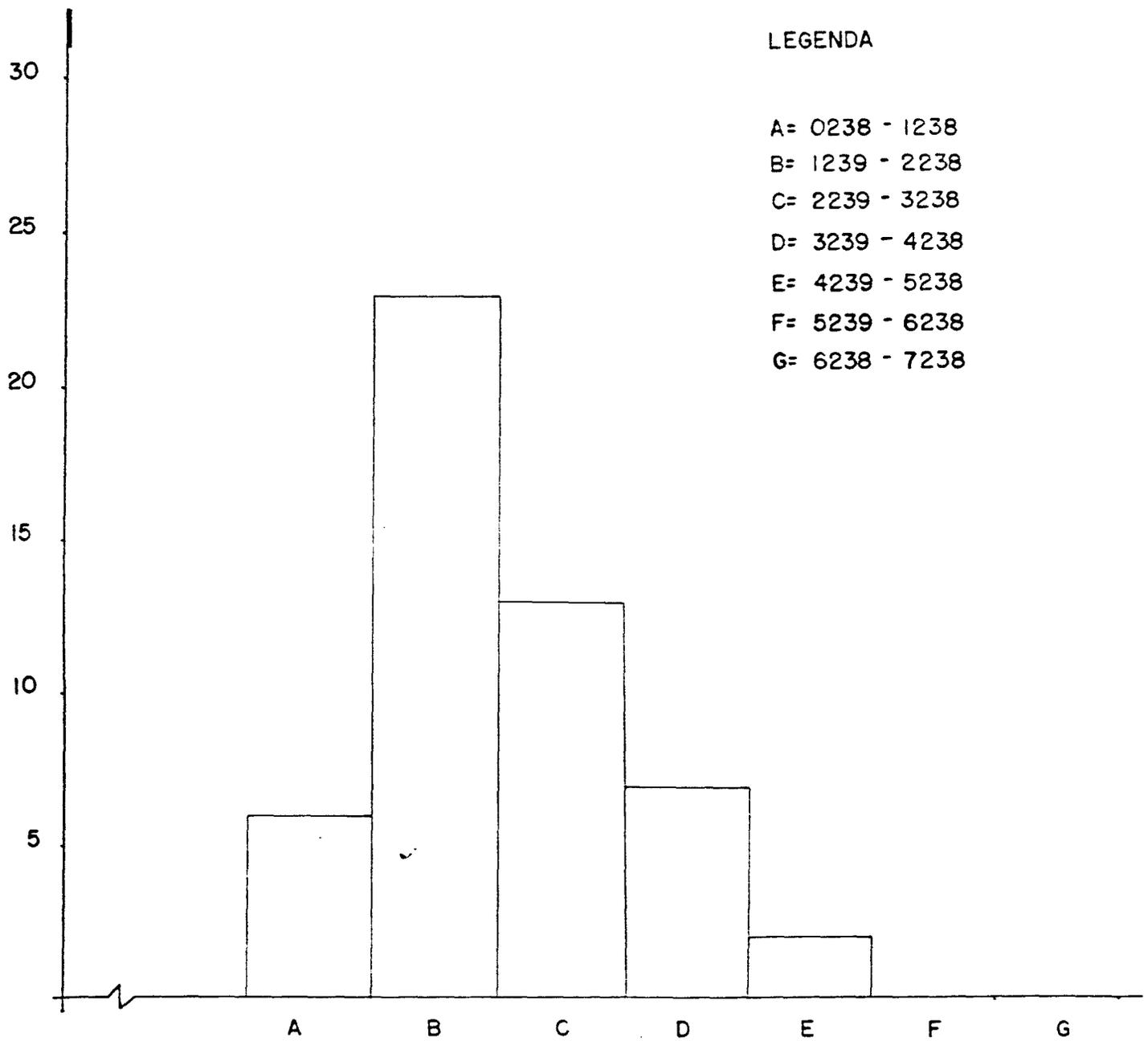


FIGURA - 3. Histograma do volume de células de Hulle da linhagem MSE de *A. nidulans*.

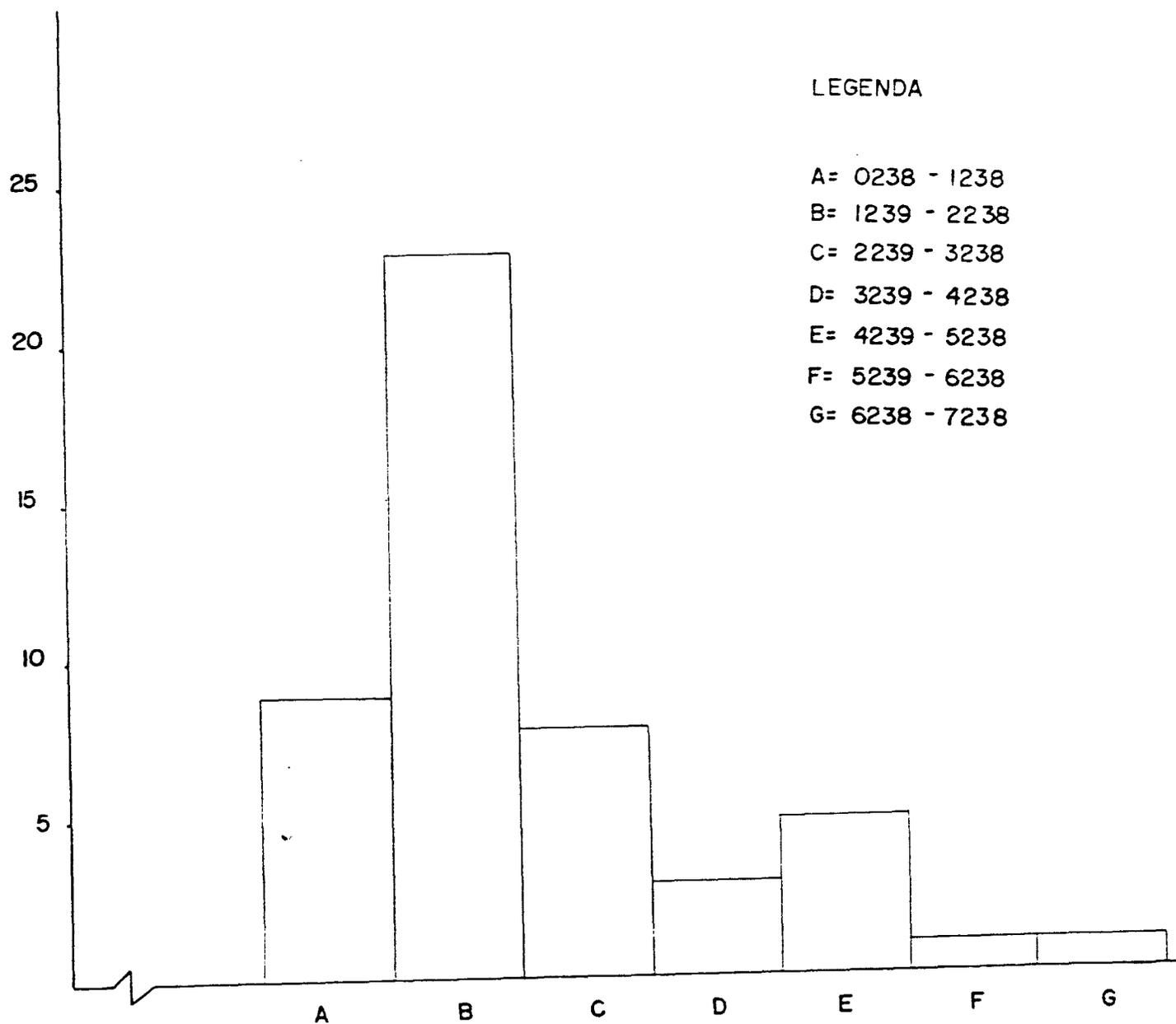


FIGURA - 4. Histograma do volume de células de Hulle da linhagem A de *A. nidulans*.

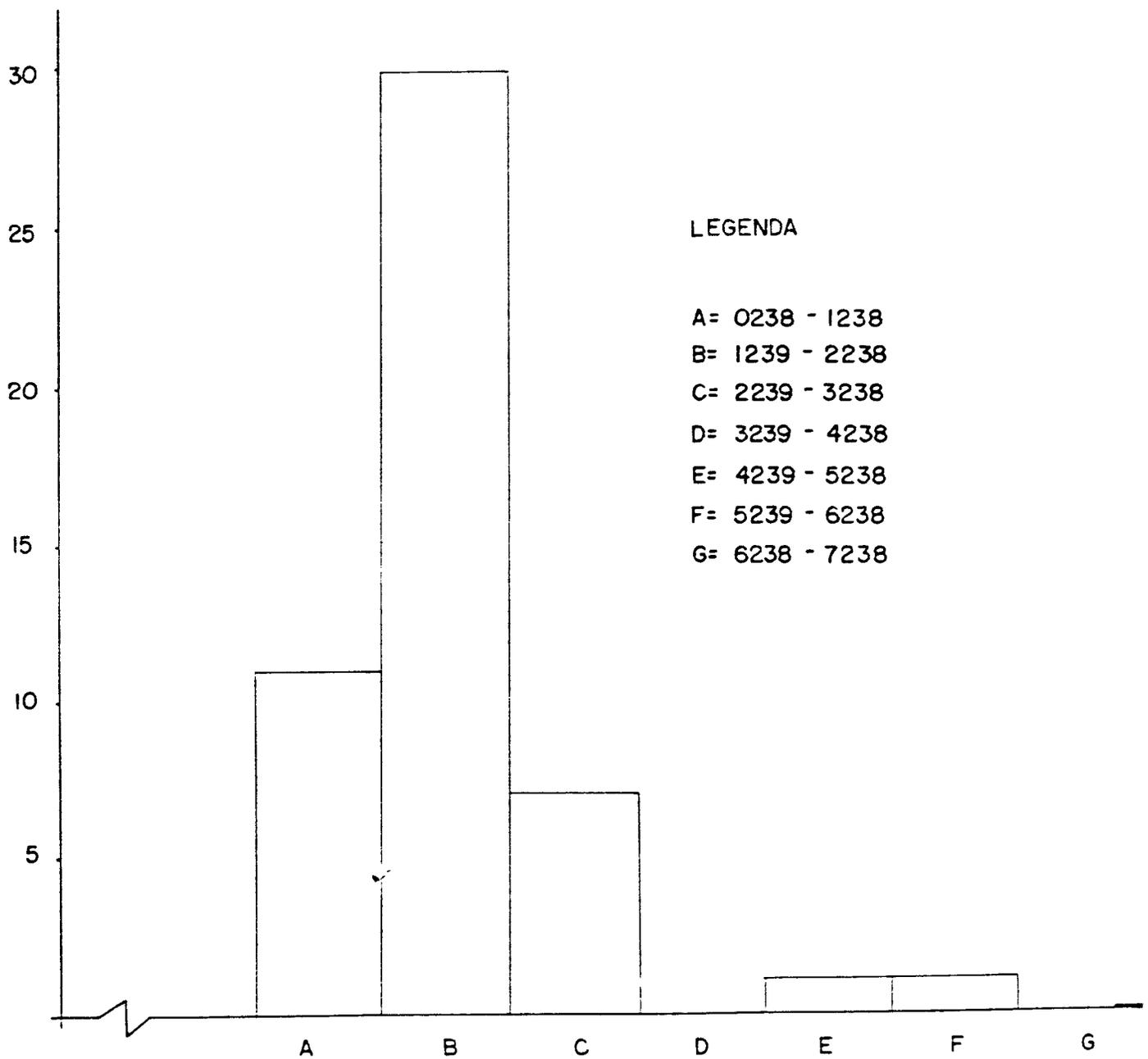


FIGURA - 5. Histograma do volume de células de Hulle da linhagem biA1;methG1//MSE de *A. nidulans*.

### 5.1.2 - Taxa de Germinação de Células de Hulle

A contagem do número de células de Hulle, germinadas e não germinadas, em diversos dias de cultivo, estabelecido de acordo com o item 3.4.6.2 para as linhagens A e CH-89, estão apresentadas na TABELA 9. A percentagem de germinação observada e esperada de células de Hulle que germinaram estão apresentada TABELA 10.

A partir dos dados da TABELA 10 obteve-se as equações, com transformação logaritmica, para que se pudesse fazer a comparação do paralelismo entre as duas retas (SCOSSIROLI, 1962). A equação obtida para a linhagem A foi  $\text{Log}Y=2,8290 - 1,2756\text{Log}X$  e para a linhagem CH-89 foi  $\text{Log}Y=2,5715 - 1,440\text{Log}X$ . Aplicando-se o teste t com 6 graus de liberdade para os coeficientes de  $\text{Log}X$ , encontrou-se que  $t_{b_a-b_{ch}}=0,590$ , portanto não existindo diferença significativa entre os coeficientes. Isto indica que as retas não se afastam do paralelismo, assim podem ser consideradas como paralelas porque os coeficientes de regressão são iguais ( $b_a=b_{ch}$ ). Por outro lado as coordenadas da origem são diferentes ( $a_a \neq a_{ch}$ ), porque aplicando-se o teste t para os interceptos mostrou-se altamente significativo ( $t_{a_a-a_{ch}}=6,677^{**}$ ) para 6 graus de liberdade. No entanto, para fazer a representação gráfica da curva do poder germinativo a equação gráfica para a linhagens A ( $Y=674,56/X^{1,275}$ ) e

para linhagem CH-89 ( $Y=372,85/X^{1,440}$ ), estão apresentadas sem transformação logaritmica, cuja a representação gráfica esta na FIGURA 6.

Observar-se na TABELA 10 que o poder germinativo das células de Hulle observados em vários dias, mostra uma variação na percentagem de germinação de 31,8 com 6 dias de cultivo a 4,08 para 25 dias, para a linhagem CH-89. Já a linhagem A apresentou uma variação de 63,0 para 6 dias a 25,5 com 14 dias de cultivo. Os valores encontrados mostram diferenças na percentagem de germinação em relação a idade da colônia e em relação a linhagem.

TABELA - 9. Número de células de Hulle das linhagens A e CH-89 germinando (G) e não germinando (NG).

<u>Dias</u>	<u>Linhagem A</u>			<u>Linhagem CH-89</u>		
	G	NG	Total	G	NG	Total
6	92	54	146	63	135	198
8	53	47	100	70	314	384
10	40	63	103	47	323	370
12	36	97	105	32	268	300
14				9	122	129
25				4	94	98

TABELA - 10. Percentagem de germinação das células de Hulle das linhagens A e CH-89.

<u>Dias</u>	<u>CH-89</u>		<u>Linhagem A</u>	
	% obs.	% esp.	% obs.	% esp.
6	31,80	28,23	63,0	68,60
8	18,22	18,65	57,0	47,53
10	12,70	13,53	38,80	35,76
12	10,66	10,40	25,50	28,34
14	6,97	8,33		
25	4,08	3,61		

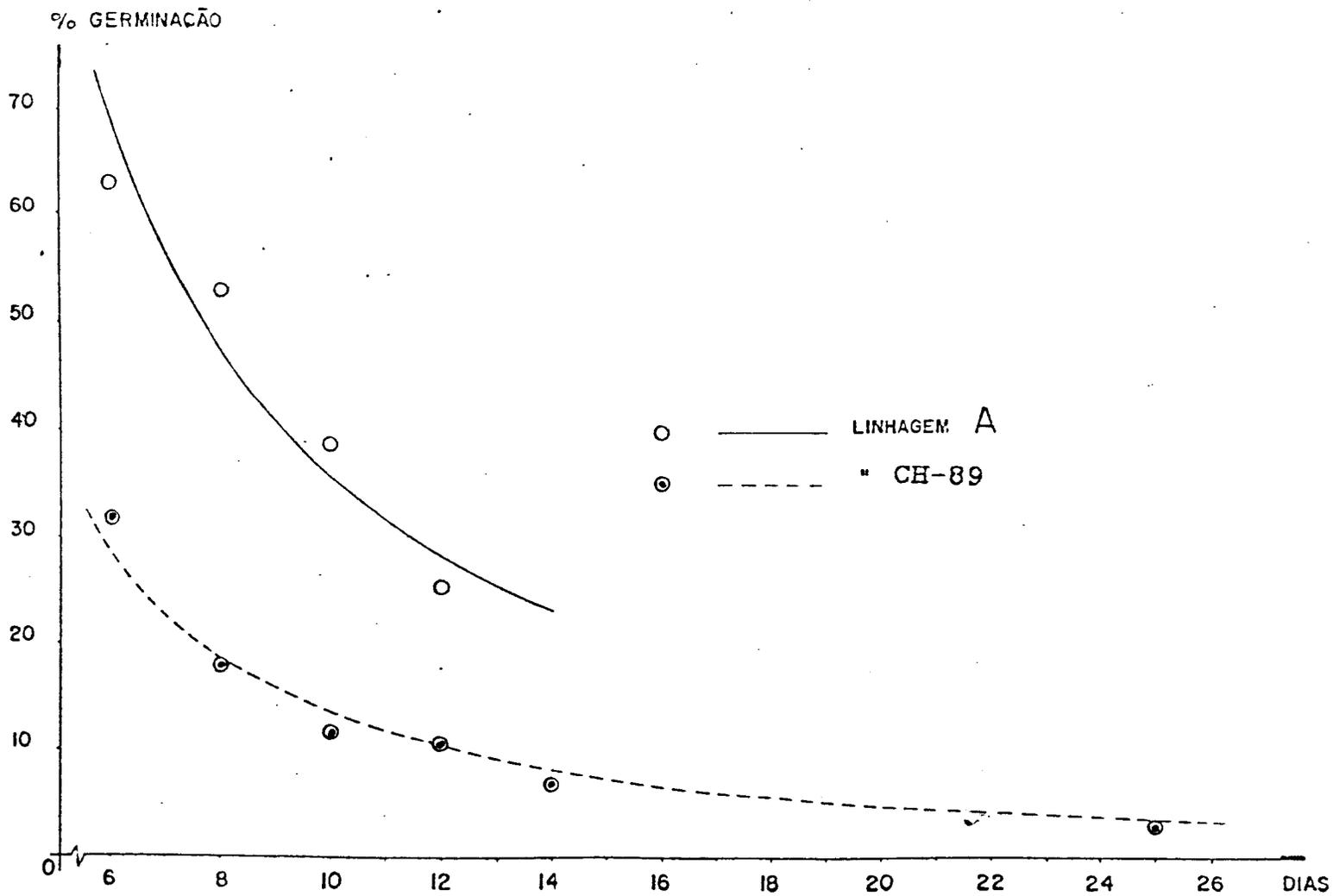


FIGURA 6. Representação gráfica da germinação das células de Hulle das linhagens A e CH-89 de *Aspergillus nidulans*.

### 5.1.3 - Curva de Sobrevivência

Suspensões de células de Hulle e de conídio da linhagem CH-89 de *Aspergillus nidulans*, foram irradiadas com luz ultravioleta conforme descrito no item 3.4.6.3. A TABELA 11 apresenta os resultados de mortalidade obtidos para conídios e células de Hulle, e a FIGURA 7 apresenta as respectivas curvas de sobrevivência. Utilizando-se os dados da TABELA 11, calculou-se as doses para 95% e 50% de mortalidade. Para esses calculos foi usado o método do probito (FINNEY, 1947).

A dose de 3,86 minutos de irradiação permitiu a sobrevivência de 5% dos conídios, com intervalos de confiança variando entre 3,22 a 4,62 minutos. Para obter a mesma percentagem de sobrevivência para as células de Hulle precisou-se 11,48 minutos de irradiação, com intervalo de variação entre 10,08 a 13,09 minutos. Já a dose de irradiação que matou 50% dos conídios foi 1,40 minutos, com intervalo de confiança entre 1,26 a 1,56 minutos. Para as células de Hulle a dose que matou 50% das células foi 3,56 minutos, com intervalos de confiança entre 3,32 a 3,96 minutos.

A interpretação dos resultados indicam que as células de Hulle são mais resistentes aos efeitos desse mutagênico do que os conídios. Tal resistência pode estar relacionada com o

tamanho da célula, a espessura da parede, número de núcleos por célula, ou grau de ploídia.

Tem-se verificado que, quanto maior o número de núcleos por conídio menor é a sensibilidade à irradiação (FUNGARO 1984). Isso pode ser atribuído ao fato das mutações letais em um núcleo, de conídios multinucleados, serem mascaradas pelo alelo selvagem do(s) outro(s) núcleo(s), possibilitando maior sobrevivência.

Visando saber quanto a célula de Hulle era mais resistente, do que o conídio, calculou-se a potência da célula de Hulle em relação ao conídio, dividindo-se a LD<sub>50</sub>, calculado para células de Hulle, pela LD<sub>50</sub>, calculada para conídio. O valor encontrado foi R=2,58. Isso significa dizer que as células de Hulle são, em proporção relativa, 158% mais resistente do que o conídio. Fazendo-se a correção do cálculo da potência pelo paralelismo encontrou-se R=2,67 com intervalos de confiança entre 2,34 a 3,04.

Com os dados da TABELA 11, calculou-se as equações probíticas, para os conídios ( $Y=1,452 + 1,125x$ ) e para as células de Hulle ( $Y=3,176 + 0,984x$ ). Para verificar se as retas se afastavam do paralelismo calculou-se o  $\chi^2$ . O resultado encontrado foi 1,527 para 1 grau de liberdade, sendo não significativo. Isso significa dizer que as retas não se afastam significativamente do paralelismo.

TABELA 11. Percentagem de mortalidade de conídios e células de Hulle da linhagem CH-89, após irradiação com luz ultravioleta.

<u>Dose</u> (min)	<u>Log da</u> Dose (x)	<u>%Conídios</u>		<u>%Células</u>	
		<u>observado</u>	<u>esperado</u>	<u>observado</u>	<u>esperado</u>
1	0	30,25	29,20	1,40	3,41
2	1	67,23	71,92	13,98	20,08
4	2	97,23	95,57	69,23	55,81
8	3	100,0	99,77	90,21	87,10
16	4		100,0	96,50	98,28
32	5			98,60	99,03

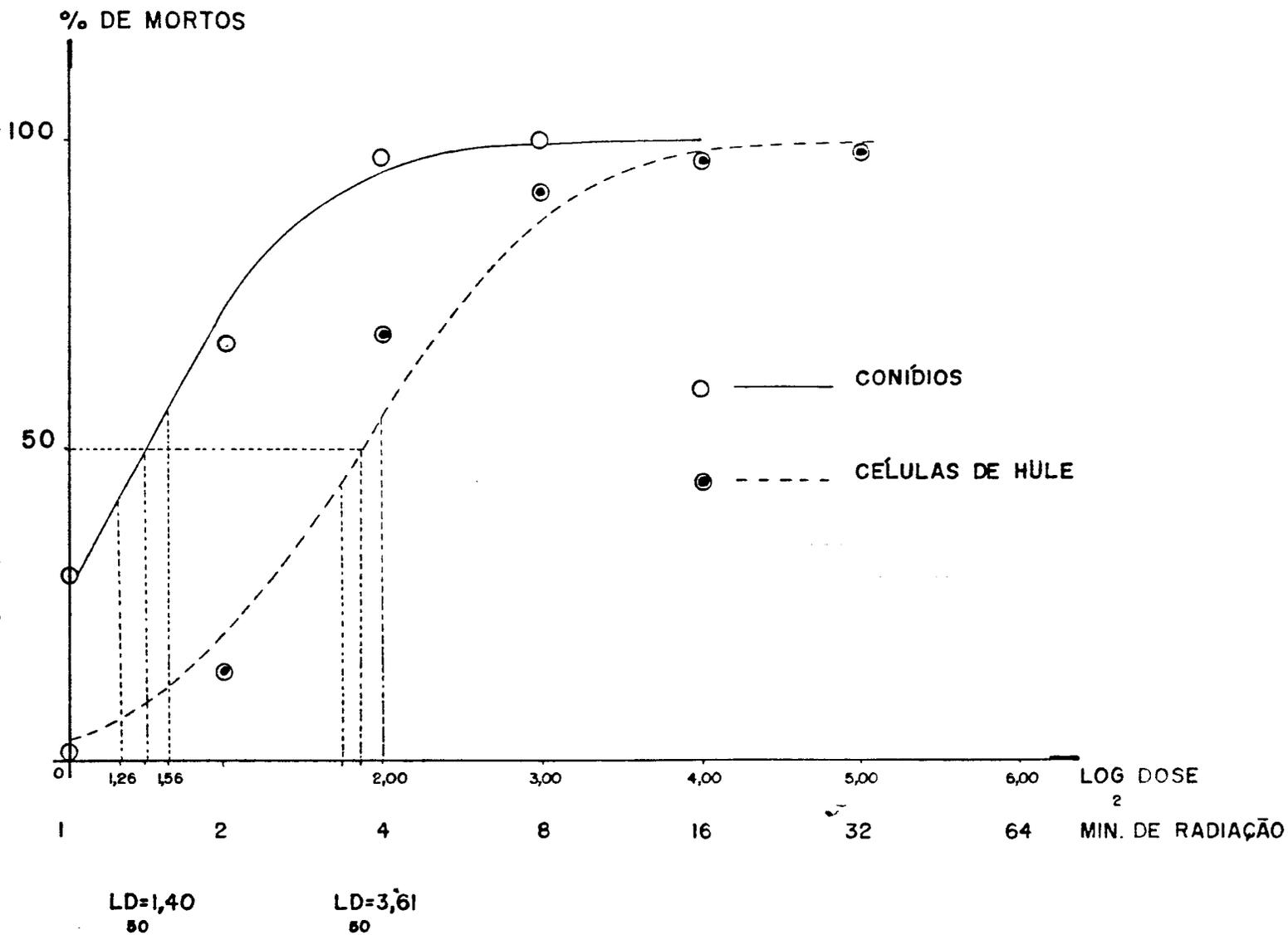


FIGURA 7. Curva de sobrevivência de células de Hulle e conidios da linhagem CH-89 de *Aspergillus nidulans*.

#### 5.1.4 - Crescimento e Diâmetro do Tubo Germinativo

O crescimento e o diâmetro do tubo germinativo de células de Hulle e de conídios das linhagens A e CH-89 foram analisados conforme a metodologia descrita no item 3.4.6.4.

Os dados referentes ao comprimento de tubo germinativo de células de Hulle das linhagens A e CH-89 estão apresentados nas tabelas 12 e 13. E os dados referente aos conídios, das respectivas linhagens, estão apresentados nas tabelas 14 e 15. Os resultados obtidos indicam que os tubos germinativos das células de Hulle, das linhagens A e CH-89 apresentam um crescimento médio maior do que o crescimento dos tubos germinativos dos conídios dessas linhagens. Também pode-se verificar que, os tubos germinativos da linhagem A, apresentaram um crescimento médio superior ao da linhagem CH-89.

As observações sobre germinação de células de Hulle vêm confirmar os dados de SCHWARTZ em 1928. Segundo o autor essas podem germinar, agindo como uma célula reprodutiva. Essa células podem apresentar também um ou mais tubos germinativos (MUNTANJOLA-CVETKOVIC e VUVIC, 1968).

Observa-se também, na referida tabela que, o crescimento dos tubos germinativos das células de Hulle apresentam uma maior desvio padrão em relação ao crescimento dos tubos germinativos dos conídios.

O diâmetro médio dos tubos germinativo dos conídios foi 3,03 micra e o da célula de Hulle 4,11 micra. A comparação entre essas médias pelo teste de t apresentou diferença significativa para  $0,001 < p < 0,01$ .

A FIGURA 8 mostra células de Hulle e conídio germinados, podendo-se observar as diferenças nos tubos germinativos.

TABELA 12. Medidas(em micra) do comprimento do tubo germinativo de células de Hulle da linhagem A, e valores da média e desvio padrão.

N <sup>o</sup> das amostras	Dias			
	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	<u>12</u>
1	11	19	25	10
2	18	31	10	40
3	50	9	30	22
4	9	19	18	30
5	15	12	20	37
6	18	16	12	15
7	12	19	12	14
8	19	19	18	20
9	21	9	20	5
10	15	53	26	45
11	14	14	25	15
12	13	14	14	20
13	20	9	66	17
14	65	24	10	5
15	25	38	25	23
16	29	26	8	28
17	25	45	27	47
18	30	19	18	29
19	22	41	15	15
20	45	50	12	12
21	30	24	24	35
22	30	24	23	40
23	9	9	21	10
24	50	19	35	12
25	10	24	30	6
26	15	9	35	14
27	17	29	21	10
28	18	14	18	8
29	12	16	17	5
30	17	12	25	5
médias	22,8	22,2	22,0	19,8
desvio padrão	13,65	12,33	10,95	12,79

TABELA 13. Medidas (em micra), do comprimento do tubo germinativo de células de Hulle da linhagem CH-89, e valores da média e desvio padrão.

Nº das amostras	<u>Dias</u>			
	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	<u>12</u>
1	12	5	10	4
2	5	20	15	5
3	5	11	5	7
4	18	25	9	25
5	9	40	6	13
6	10	17	8	7
7	6	7	11	5
8	9	6	8	4
9	10	7	10	7
10	13	2	5	7
11	13	10	25	10
12	12	5	7	8
13	7	20	25	8
14	30	30	7	8
15	5	10	5	7
16	12	9	19	7
17	4	5	13	25
18	14	12	7	19
19	8	14	5	14
20	9	22	5	10
21	6	8	18	16
22	6	5	12	10
23	14	6	7	10
	13	17	7	12
	9	7	6	14
	16	8	12	16
	10	10	14	18
28	11	14	16	19
29	15	6	29	18
30	18	14	10	15
médias	10,96	12,40	11,20	11,60
desvio padrão	5,28	8,49	6,48	5,85

TABELA 14. Medidas (em micra) do comprimento do tubo germinativo de conídios da linhagem A, e valores da média e desvio padrão.

N <sup>o</sup> das amostras	Dias			
	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	<u>12</u>
1	8	7	9	7
2	5	7	9	7
3	8	8	9	6
4	6	8	3	11
5	10	8	3	8
6	7	8	4	5
7	6	8	3	5
8	9	5	4	4
9	5	5	11	11
10	3	10	11	11
11	6	12	11	6
12	7	11	6	5
13	6	11	6	5
14	8	12	6	5
15	9	6	9	9
16	11	6	9	8
17	6	6	9	9
18	6	6	10	11
19	8	6	9	13
20	12	5	12	6
21	9	6	5	5
22	11	7	6	5
23	6	7	5	4
24	8	9	5	6
25	6	13	5	3
26	5	10	13	10
27	6	10	6	10
28	5	8	4	9
29	7	7	3	12
30	8	3	5	4
médias	7,26	7,83	7,06	7,33
desvio padrão	2,08	2,4	2,9	2,8

TABELA 15. Medidas (em micra) do comprimento do tubo germinativo de conídios da linhagem CH-89, e valores da média e desvio padrão.

N <sup>o</sup> das amostras	Dias			
	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	<u>12</u>
1	3	2	9	3
2	2	5	2	2
3	7	6	2	3
4	6	1	2	7
5	2	2	3	6
6	2	8	5	7
7	8	3	3	2
8	10	4	3	8
9	3	5	3	3
11	4	3	2	4
10	10	3	2	4
12	3	5	2	3
13	4	6	3	5
14	4	4	5	8
15	6	10	5	6
16	3	2	8	6
17	5	9	7	3
18	6	8	5	4
19	7	4	5	7
20	4	4	7	6
21	4	3	3	4
22	3	5	4	5
23	2	6	4	6
24	2	4	4	8
25	3	3	5	10
26	3	4	6	8
27	4	3	7	9
28	4	4	3	7
29	2	5	3	4
30	3	6	4	8
médias	4,3	4,5	4,2	5,5
desvio padrão	2,26	2,12	1,93	2,20



FIGURA 8. Células de Hulle e conídios germinando de *Aspergillus nidulans* (aum. 40x)

### 5.1.5 - Extração e Quantificação de DNA

Células de Hulle e conídios das linhagens A e CH-89 foram preparados de acordo com o descrito no item 3.4.6.5.1. Os experimentos de extração e quantificação do DNA dessas linhagens foram descritos nos itens 3.4.6.5.2 e 3.4.6.5.3. A TABELA 16 apresenta os resultados da curva padrão descrito conforme o item 3.4.6.5.4 e representados na FIGURA 9. A partir dos dados da tabela 16, foi traçada a reta de regressão, cuja equação é  $X = -9,13 + 121,8Y$ . O coeficiente de correlação foi  $r = 0,999$ .

Os resultados da quantificação de DNA encontram-se na TABELA 17. Verifica-se que as células de Hulle apresentaram em média 14,81 vezes mais DNA do que os conídios.

TABELA 16. Absorbância observada em função da concentração de DNA.

DNA (µg/ml)	Absorbância
5	0,1179
10	0,1563
20	0,2373
40	0,4043

Equação da reta  $X = -9,14 + 121,8Y$

TABELA 17. Conteúdo médio de DNA por células de Hulle e por conídios das linhagens A e CH-89 de *Aspergillus nidulans* (µg DNA x 10<sup>-8</sup>).

<u>Linhagem</u>	<u>DNA</u>	
	<u>Células de Hulle</u>	<u>Conídio</u>
A	29,29	2,3
CH-89	34,4	2,0

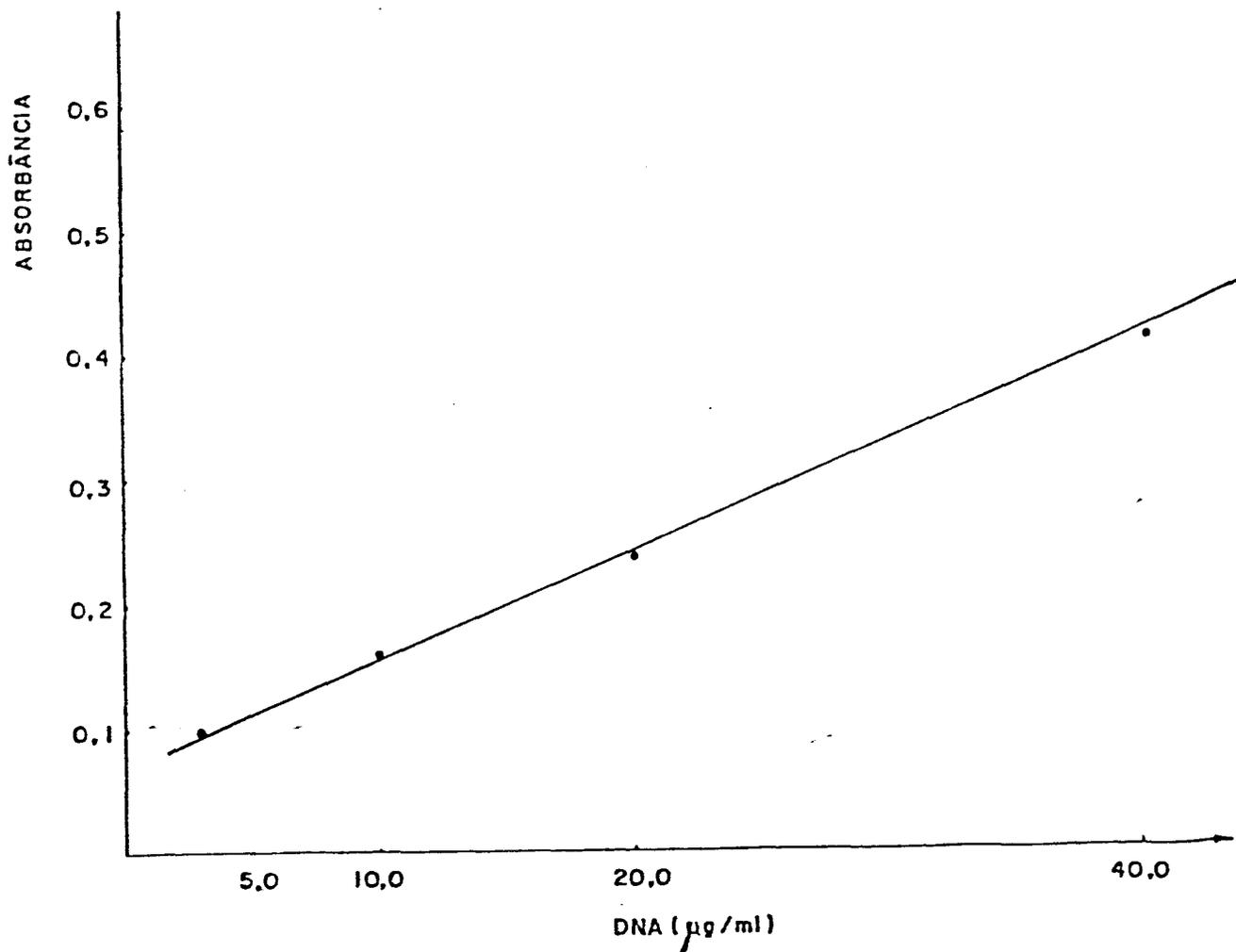


FIGURA 9. Curva padrão de absorvância em função da concentração de DNA (Salmão).

## 5.2 - As linhagens

### 5.2.1 - Medidas do Crescimento das Colônias

Este experimento foi montado com o objetivo de analisar o comportamento do crescimento das linhagens. Para isso as medidas do diâmetro das linhagens CH-89, A e biA1;methG1, foram feitas em colônias em crescimento durante seis dias, com seis repetições (item 3.4.7.1). Esses resultados são apresentados na TABELA 18. A análise de variância dos dados estão apresentados na TABELA 19. Essa análise indica que todos os efeitos foram significativos. Desta forma o efeito de dias mostrou que existe diferenças significativa de crescimento entre os dias. O efeito de linhagem, indica que há diferenças entre as linhagens. A interação dias x linhagens indica que o crescimento entre dias é diferente. Em função dos resultados apresentados na TABELA 19 fez-se o desdobramento da análise da variância para saber como era o comportamento das linhagens entre os dias. Os resultados encontrados estão apresentados na TABELA 20. Pode-se concluir que no 2º dia não houve diferença de crescimento entre as linhagens, no entanto a partir do 3º dia a diferença no comportamento do crescimento das colônias foram diferentes.

Para saber como era a forma dessas interações, usou-se como controle a linhagem biA1;methG1. Os resultados obtidos estão apresentados nas TABELAS 21 e 22. Conclui-se que a forma de equação que melhor representa as interações dos resultados apresentados nas TABELAS 21 e 22, é a equação de 1º grau devido apresentar um maior nível de sigficância para o teste F. Já os desvios do paralelismo foram significativos, indicando que as retas não se afastam do paralelismo, em função de prováveis flutuações individuais ocorridas entre os dias, em decorrência das medidas terem sido diáriamente, ou de fatores intrínsecos das linhagens.

Com as médias de crescimento das linhagens, apresentadas na TABELA 23 obteve-se as equações de crescimento para linhagens cujo o gráfico está representada na FIGURA 10. As equações de crescimento encontradas para as linhagens CH-89, A e biA1;methG1 foram respectivamente  $Y = -0,912 + 0,855X$ ;  $Y = -0,661 + 1,083X$  e  $Y = -0,176 + 1,235X$ . A comparação dos coeficientes de X entre as linhagens CH-89 e biA1;methG1 e da linhagem CH-89 com a linhagem A mostram que as retas não são paralelas. Por outro lado a comparação entre os coeficientes de X das linhagens A e biA1;methG1 indica que existe paralelismo entre as duas retas. Já as coordenadas da origem foram evidentemente diferentes.

Tabela - 18. Medidas do diâmetro (em centímetro) de colônias das linhagens CH-89, A e biA1;methG1.

Linhagem	Repetição	Dias					
		20	30	40	50	60	70
CH-89	1	0,8	1,7	2,0	3,6	4,3	5,0
	2	0,8	1,5	2,3	3,4	4,5	5,0
	3	0,8	1,8	2,2	3,6	4,5	5,0
	4	0,7	1,6	2,5	3,6	4,2	5,0
	5	0,9	1,8	2,2	3,6	4,5	5,0
	6	0,8	1,8	2,4	3,5	4,2	4,6
A	1	1,5	2,9	3,7	4,9	5,4	7,3
	2	1,5	2,5	3,5	5,0	5,5	7,0
	3	1,4	2,7	3,5	5,0	5,5	6,7
	4	1,5	2,5	3,6	5,0	5,5	7,0
	5	1,5	2,7	3,6	5,0	5,2	7,5
	6	1,5	2,8	3,7	5,0	5,2	7,5
biA1; methG1 (padrão)	1	1,9	3,7	5,0	6,5	7,5	8,0
	2	1,9	3,8	4,5	6,3	7,4	8,2
	3	2,0	3,8	4,5	6,4	7,4	8,0
	4	1,9	3,7	4,7	6,5	7,3	8,0
	5	1,9	3,6	4,8	6,5	7,2	8,1
	6	2,0	3,8	5,0	6,6	7,4	8,0

TABELA - 19. Análise da variância dos dados da tabela 18.

Causas de variação	GL	F
Dias	5	62,30***
Linhagens	2	47,34***
Dias x Linhagens	10	57,45***
Resíduo	90	0,019
Total	107	

CV=3,37%

\*\*\*significativo ao nível 0,1%.

TABELA - 20. Análise da variância da tabela 18, considerando linhagens dentro de cada dia.

Causas de variação	GL	F
Entre linhagens dentro 2º dia	2	1,71ns
3º	2	5,44*
4º	2	8,134**
5º	2	11,201**
6º	2	12,259**
7º	2	13,589**
Linhagens x Dias	12	

ns não significativo

\* significativo ao nível 5%

\*\* significativo ao nível 1%

\*\*\* significativo ao nível 0,1%

TABELA-21. Análise dos dados da tabela 18, por polígonos ortogonais entre as colônias CH-89 e a biA1;methG1 (tomada como padrão).

Causas de variação	GL	F	Significância
Entre colônias	1	6609,451	***
Regressão de 1º grau	1	14060,408	***
Paralelismo	1	461,319	***
Regressão de 2º grau	1	98,786	***
Paralelismo	1	63,459	***
Regressão de 3º grau	1	24,037	***
Paralelismo	1	2,051	ns
Regressão de 4º grau	1	19,359	***
Paralelismo	1	0,017	ns
Regressão de 5º grau	1	55,884	***
Paralelismo	1	1,606	ns
Dias	(11)	1945,125	***
Resíduo	60		
Total	71		

CV=2,98%

ns= não significativo

\* significativo a 5%

\*\* significativo a 1%

\*\*\* significativo a 0.1%

TABELA - 22. Análise dos dados da tabela 18 por polinômios ortogonais entre as linhagens A e biA1;methG1( tomada como padrão ).

Causa de variação	GL	F	significância
Entre colônias	1	1176,188	***
Regressão de 1º grau	1	13532,426	***
Paralelismo	1	57,795	***
Regressão de 2º grau	1	42,361	***
Paralelismo	1	81,630	***
Regressão de 3º grau	1	4,111	*
Paralelismo	1	25,996	**
Regressão de 4º grau	1	2,766	ns
Paralelismo	1	3,215	ns
Regressão de 5º grau	1	10,841	***
Paralelismo	1	0,463	ns
Dias de crescimento	(11)	1366,430	***
Resíduo	60	-	
Total	71		

ns não significativo CV=3,01%

\* significativo ao nível de 5%

\*\* significativo ao nível de 1%

\*\*\* altamente significativo ao nível de 0,1%.

TABELA - 23. Média do diâmetro das colônias(em centimetro) das linhagens CH-89, A, biAlmethG1 em meio completo.

Dias	Linhagens		
	CH-89	A	biA1;methG1
2º	0,80	1,48	1,93
3º	1,70	2,68	3,73
4º	2,27	3,60	4,75
5º	3,55	4,98	6,46
6º	4,37	5,38	7,37
7º	4,93	7,17	8,05

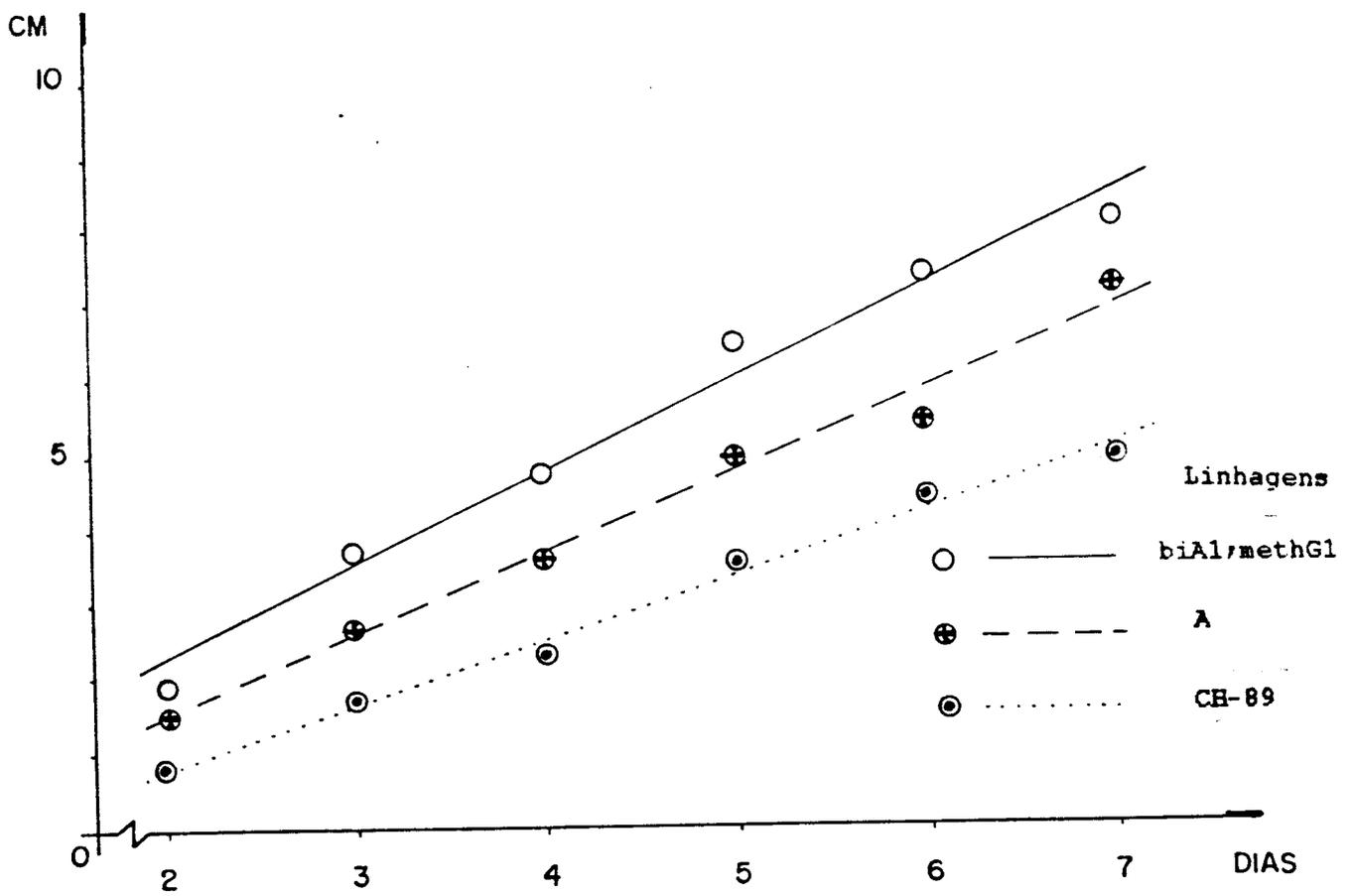


FIGURA 10. Representação gráfica das equações de crescimento das linhagens A, CH-89 e biA1;methG1 de *Aspergillus nidulans*.

### 5.2.2 - Produção de Células de Hulle e Conídios, na linhagem CH-89

Este experimento foi montado com o objetivo de avaliar o comportamento da linhagem CH-89 em meio completo e meio mínimo suplementado, na produção de células de Hulle e conídio. A incubação foi realizada a 37°C durante 3 dias. Verificou-se o diâmetro da colônia e a produção de células de Hulle e conídios, conforme descrito no item 3.4.7.2. O tamanho da colônia foi determinado pela mensuração da mesma em centímetros, com 4 repetições. A análise estatística dos dados foi em delineamento inteiramente casualizado. A comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey.

Os dados coletados para o diâmetro da colônia estão apresentados na TABELA 24. A análise da variância para o diâmetro estão apresentados na TABELA 25. Os resultados obtidos indicam que houve diferença entre os tratamentos. Os resultados da aplicação do teste de Tukey estão apresentados na TABELA 26. Nesta tabela estão indicados os tratamentos que diferem entre si. As colônias foram raspadas e colocadas individualmente em tubos de ensaio e a estimativa do número de células de Hulle e conídios foi realizada com o hematímetro.

Os dados obtidos para número de células de Hulle e de conídios foram transformados por  $\sqrt{X}$ , conforme recomenda STEEL

e TORRIE (1960). A TABELA 27 apresenta os dados coletados para o número de células de Hulle. A análise de variância dos dados encontram-se na TABELA 28, indicando que houve diferença entre os tratamentos. A aplicação do teste de Tukey para as médias de produção de células de Hulle, pode ser vista na tabela 29, no qual indica os tratamentos que diferem entre si.

A TABELA 30 mostra a produção de conídios. A análise da variância dos dados obtidos estão na TABELA 31. Indica que os efeitos de tratamentos foram significativos. Os resultados do teste de comparação de médias para número de conídios estão apresentados na TABELA 32, onde se indica os tratamentos que diferem.

TABELA 24. Diâmetro da colônia da linhagem CH-89 com 3 dias de crescimento.

Tratamento	Repetição			
meio completo	1,6	1,7	1,5	1,8
meio mínimo+extrato de levedura+ prolina+ácido $\alpha$ -aminobenzóico	1,4	1,7	1,5	1,4
meio mínimo+peptona+prolina+ácido $\alpha$ -aminobenzóico	1,3	1,3	1,2	1,3
meio mínimo+caseína hidrolizada+ prolina+ $\alpha$ -aminobenzóico	1,0	1,1	0,9	1,1
meio mínimo+solução de vitaminas prolina+ácido $\alpha$ -aminobenzóico	1,7	1,7	1,7	1,7
*média de 4 repetições				

TABELA 25. Análise da variância dos dados da tabela 24.

Causa de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	4	1,31	0,32	40 **
Resíduo	15	0,12	0,008	
Total	19	1,43		

\*\* significativo a 1%.

TABELA 26. Teste de Tukey para os dados da tabela 24.

Tratamento	Diâmetro médio da colônia(cm)		
meio mínimo+solução de vitaminas+ prolina+ácido $\alpha$ -aminobenzóico	1,72	a	
meio completo	1,65	a	b
meio mínimo+extrato de levedura+ prolina+ácido $\alpha$ -aminobenzóico	1,50		b
meio mínimo+peptona+prolina+ ácido $\alpha$ -aminobenzóico	1,27		c
meio mínimo+caseína hidrolizada+ prolina+ $\alpha$ -aminobenzóico	1,02		d

dms (5%)=0,194

\*média de 4 repetições

\*letras iguais indicam que os tratamentos não diferem entre si

TABELA 27.- Média do número de células de Hulle( $\times 10^4$ ), por ml, e por colônia, em vários meios de cultura.

Tratamento	Repetição			
meio completo	2,5	14,5	3,5	9,5
meio mínimo+extrato de levedura+ prolina+ácido $\alpha$ -aminobenzóico	1,5	10,5	6,0	16,0
meio mínimo+peptona+prolina+ ácido $\alpha$ -aminobenzóico	3,0	7,3	4,0	2,5
meio mínimo+caseína hidrolizada prolina+ $\alpha$ -aminobenzóico	2,0	2,5	0,5	2,0
meio mínimo+solução de vitaminas prolina+ácido $\alpha$ -aminobenzóico	2,0	0,0	0,5	0,0

\*média de 4 repetições

TABELA 28. Análise da variância dos dados da tabela 27 transformados.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	4	13,2	3,3	4,9 *
Resíduo	15	10,1	0,67	
Total	19	23,4		

\*significativo a 5%.

Tabela 29. Teste de Tukey para os dados da tabela 27, transformados.

Tratamento	médias (x10 <sup>2</sup> ml)	
meio mínimo+extrato de levedura+ prolina+ácido α-aminobenzóico	2,70	a
meio completo	2,52	a
meio mínimo+peptona+prolina+ ácido α-aminobenzóico	1,90	a b
meio mínimo+caseína hidrolizada+ prolina+α-aminobenzóico	1,20	a b
meio mínimo+solução de vitaminas+ prolina+ácido α-aminobenzóico	0,50	b

dms (5%)=1,77

\*média de 4 repetições

\* letras iguais indicam que os tratamentos não diferem entre si

TABELA 30.- Média do número de conídios ( $\times 10^4$ ), por ml, e por colônia, em vários meios de cultura.

Tratamento	Repetição			
meio completo	2,0	14,0	6,5	5,0
meio mínimo+extrato de levedura+ prolina+ácido $\alpha$ -aminobenzóico	72,0	107,0	65,5	126,5
meio mínimo+peptona+prolina+ácido $\alpha$ -aminobenzóico	98,0	141,5	98,5	66,5
meio mínimo+caseína hidrolizada prolina+ $\alpha$ -aminobenzóico	26,5	33,5	26,5	56,0
meio mínimo+solução de vitaminas prolina+ácido $\alpha$ -aminobenzóico	19,0	17,5	21,0	12,0
*média de 4 repetições				

TABELA 31. Análise dos dados da tabela 30, transformados.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	4	170,3	170,3	31,5**
Resíduo	15	20,2	1,35	
Total	19	190,6		

\*\*Significativo a 1%.

Tabela 32. Teste de Tukey para os dados da tabela 30, transformados.

Tratamento	médias ( $\times 10^2$ )		
meio mínimo+peptona+prolina+ácido $\alpha$ -aminobenzóico	9,90	a	
meio mínimo+extrato de levedura+prolina+ácido $\alpha$ -aminobenzóico	9,40	a	
meio mínimo+caseína hidrolizada+prolina+ácido $\alpha$ -aminobenzóico	5,80	b	
meio mínimo+solução de vitaminas	4,00	b	c
meio completo	2,45		c

dms (5%) = 2,53

\*média de 4 repetições

\*letras iguais indicam que os tratamentos não diferem entre si

### 5.3 - Núcleos de Células de Hulle

#### 5.3.1 - Formação e Germinação de Células de Hulle

Pouco se conhece sobre a citologia de células de Hulle. A esse respeito podemos citar o trabalho de ELLIS e col. em 1973, que utilizando microscopia de transmissão constataram a existência de vários núcleos nessas células. Podemos nos referir ainda a DOBY e KOMBILA-FAVRY (1978) que embora não tendo obtido bons resultados com os corantes que usaram, constataram que células de Hulle de *Aspergillus nidulans* tinha diâmetro de 20 micra e a espessura da parede 5 micra. No presente trabalho diversas técnicas de coloração utilizadas para corar núcleo de conídio (ELLIOTT, 1960; WEISER e WEISBERG, 1966; ROBINOW e CATEN, 1969), foram testadas para corar o núcleo da célula de Hulle. A técnica que apresentou o melhor resultado foi a do GIEMSA-HCl com algumas modificações que estão apresentadas no item 3.4.8.1. As dificuldades encontradas na coloração de células de Hulle parecem estar relacionadas com o tempo de fixação e de hidrólise, devido provavelmente a espessura da parede celular que essas células apresentam. Com a utilização da linhagem CH-89, que se caracteriza por formar poucos clistotécios e grande quantidade de células de Hulle em diferentes estágios, foi possível acompanhar os aspectos

morfológicos das células de Hulle desde a fase inicial, passando por fases intermediárias até a fase de maturação.

Utilizando-se a técnica de cultivo e de coloração (item 3.4.8.1), verificou-se que a formação da célula de Hulle inicia-se com um inchamento na extremidade da hifa, no qual aparecem núcleos de tamanho aparentemente normais (FIGURA 11). Nessa fase a parede da célula de Hulle apresenta-se fina e transparente. A partir daí passa-se a uma fase que podemos chamar de intermediária no qual vai ocorrendo o crescimento da célula, o espessamento da parede e um aumento do número de núcleos (FIGURAS 12, 13 e 14). O aumento do número de núcleos nesta fase parece ocorrer por divisões mitóticas no interior da célula (FIGURAS 15 e 16). A seguir observa-se a formação de uma estrutura que parece resultar do agrupamento desses núcleos (FIGURA 17). Nesta fase a parede celular fica mais espessa. Depois dessa fase vem o estágio que chamamos de maturação no qual se observa um único núcleo (FIGURA 18), várias vezes maior do que os núcleos dos conídios e das hifas. Esta fase de maturação foi observada também utilizando-se a técnica de coloração do HCl-Giemsa e também a partir de cortes semifinos (FIGURAS 19 e 20) coradas com azul de toluidina (item 3.4.8.4.5).

Essas observações citológicas mostram então, que as células de Hulle apresentam uma natureza multinucleada em algumas etapas de sua formação e que dependendo do estágio

da célula há uma variação quanto ao número e ao tamanho desses núcleos. Na fase de maturação o núcleos parece atingir o tamanho máximo, constituindo o que se poderia chamar de macronúcleo. A existência de um macronúcleo em fungo não fora até então relatada. Esse tipo de núcleo é bem estudado em alguns protozoários. Em Paramecium existe dois tipos de núcleo, um macronúcleo que é poliploide e um micronúcleo que é diplóide. No processo de divisão celular o macronúcleo é desintegrado, absorvido pelo citoplasma e novamente formado a partir do micronúcleo (RAIKOV, 1985).

Com o fim de observar o comportamento do macronúcleo durante o processo de germinação, células de Hulle em fase de maturação (FIGURA 21) foram colocada para germinar e a seguir coradas conforme indicado no item 3.4.8.2. A análise das lâminas não permitiu um esclarecimento conclusivo. Na maioria dos casos houve uma coloração intensa da célula, como que indicando uma desintegração do macronúcleo. Em outros casos, observa-se nas células germinando a existência de um macronúcleo e de um pequeno núcleo aparentemente normal próximo da formação do tubo germinativo (FIGURA 22). É possível que no processo de germinação o macronúcleo se desintegre e o tubo germinativo seja formado a partir de um micronúcleo. No entanto, são necessárias outros experimentos utilizando-se técnicas de coloração diferentes para melhor esclarecimento do problema.



FIGURA - 11. Fase inicial de formação de célula de Hulle de *Aspergillus nidulans*, vendo-se algumas células com 3 núcleos (aumento 100x).



FIGURA - 12. Células de Hulle de *Aspergillus nidulans* em formação. A parede é fina e transparente (aumento 100x).

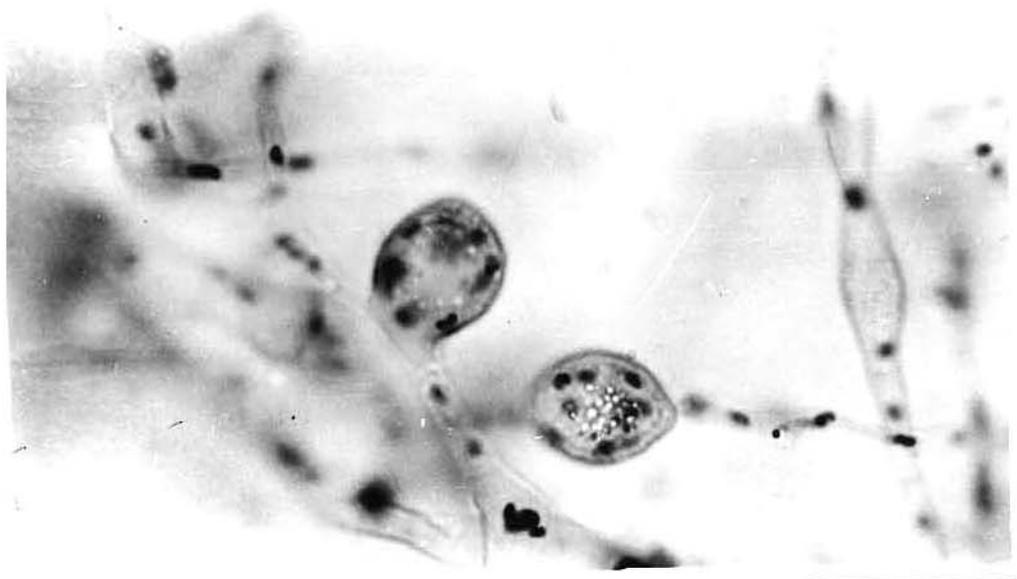


FIGURA - 13. Células de Hulle de *Aspergillus nidulans* com número de núcleos variáveis (aumento 100x).

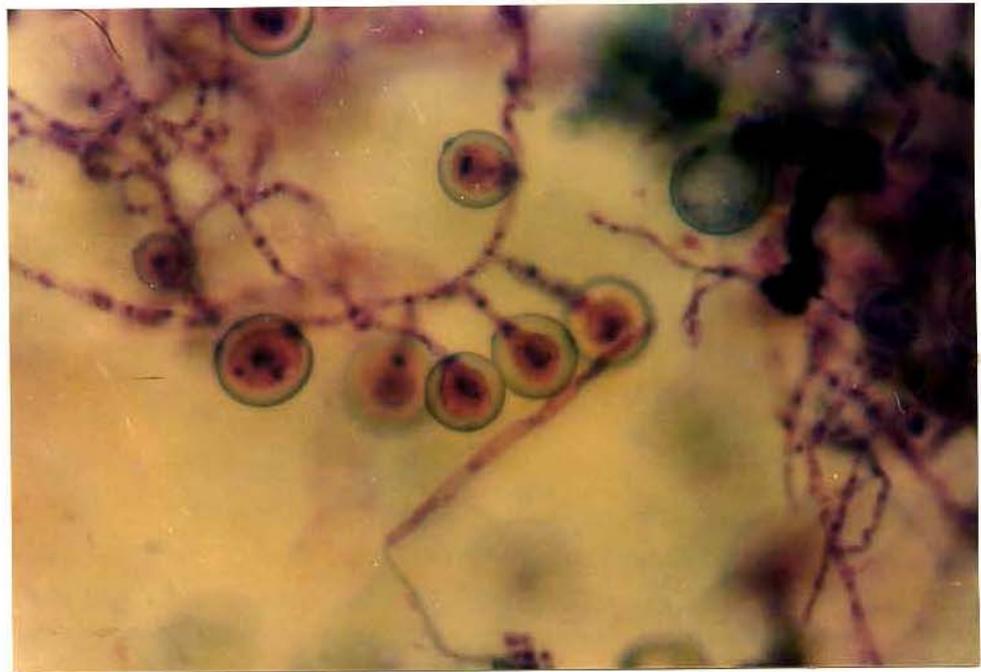


FIGURA - 14. Micélio de linhagem CH-89, mostrando células de Hulle e hifas de *Aspergillus nidulans*, corados com HCl-Giemsa (aumento 40x).

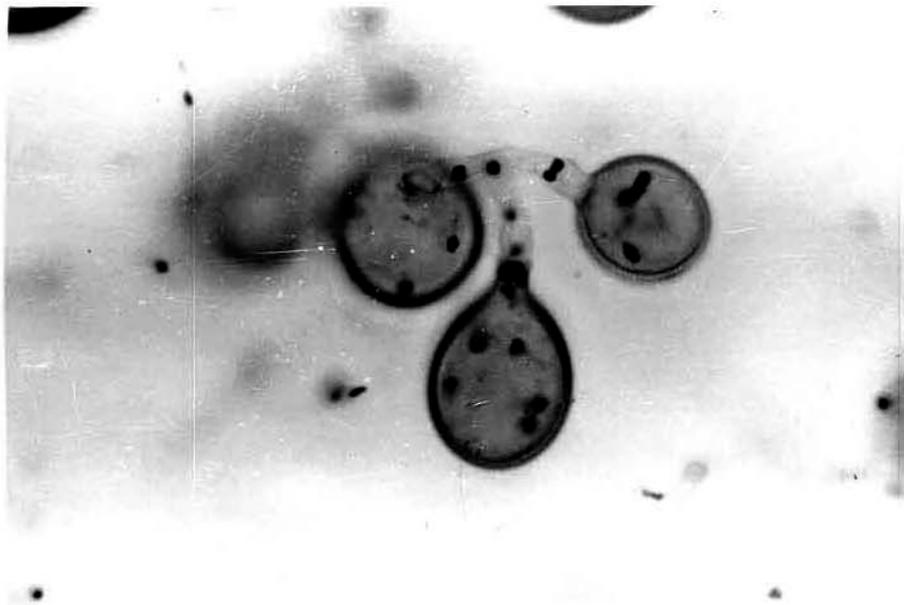


FIGURA - 15. Células de Hulle de *Aspergillus nidulans* de diferentes tamanhos, com variação no número de núcleos. Observa-se a parede celular mais espessa (aumento 100x).



FIGURA - 16. Células de Hulle de *Aspergillus nidulans*, com número de núcleos variáveis, apresentando possíveis divisões mitóticas (aumento 100x).

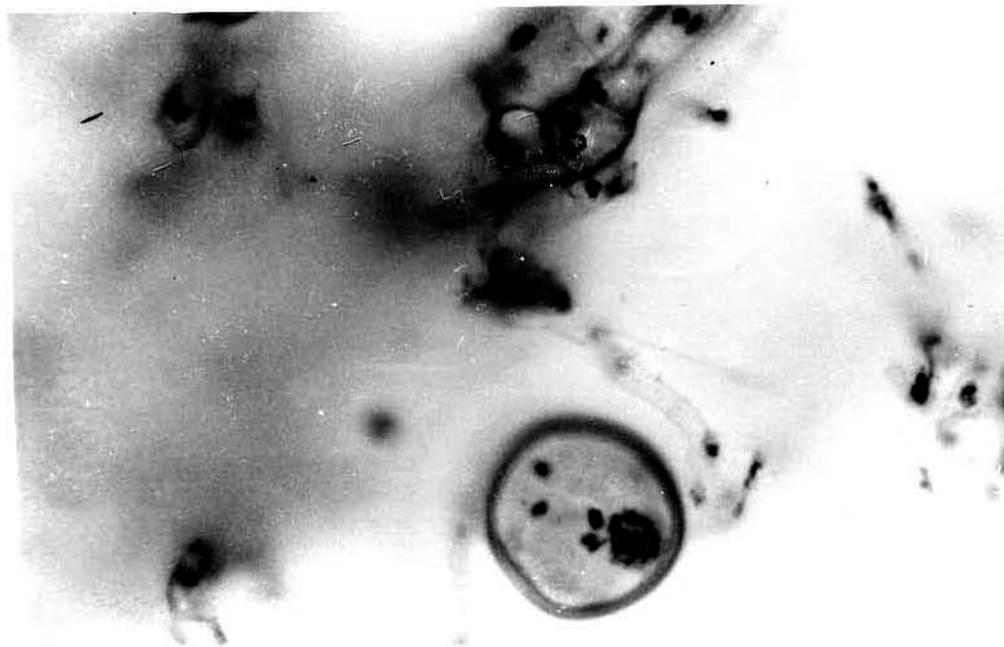


FIGURA - 17. Célula de Hulle de *Aspergillus nidulans*, com redução no número de núcleos, apresentando uma possível formação do macronúcleo.



FIGURA - 18. Células de Hulle de *Aspergillus nidulans* em fase de maturidade, apresentando parede espessa e o macronúcleo (aumento 100x).

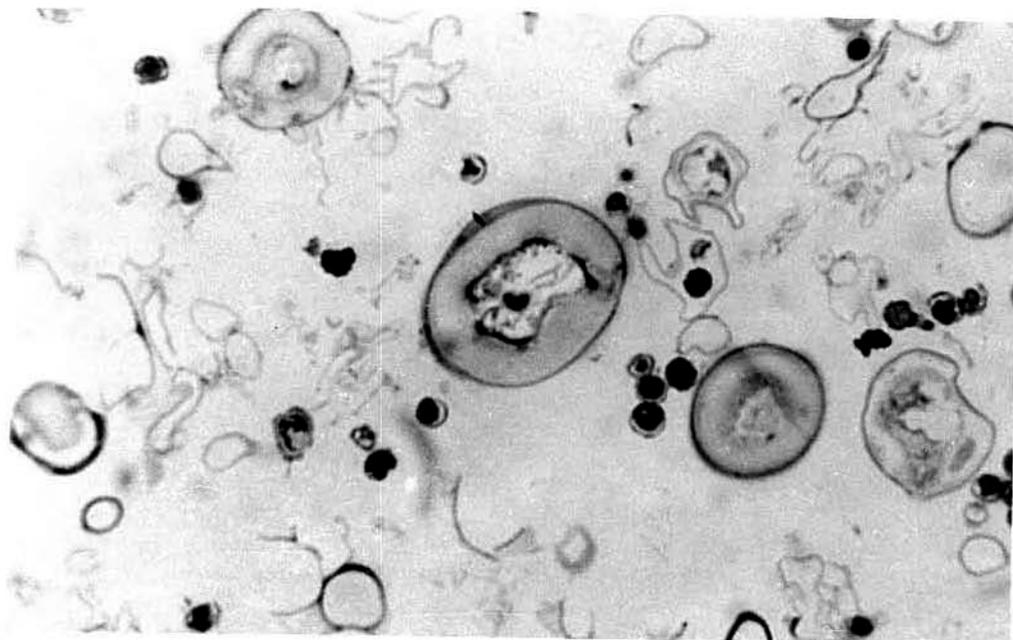


FIGURA - 19. Célula de Hulle de *Aspergillus nidulans* com o macronúcleo, corada com azul de toluidina a partir de cortes simifinos (aumentol00x).

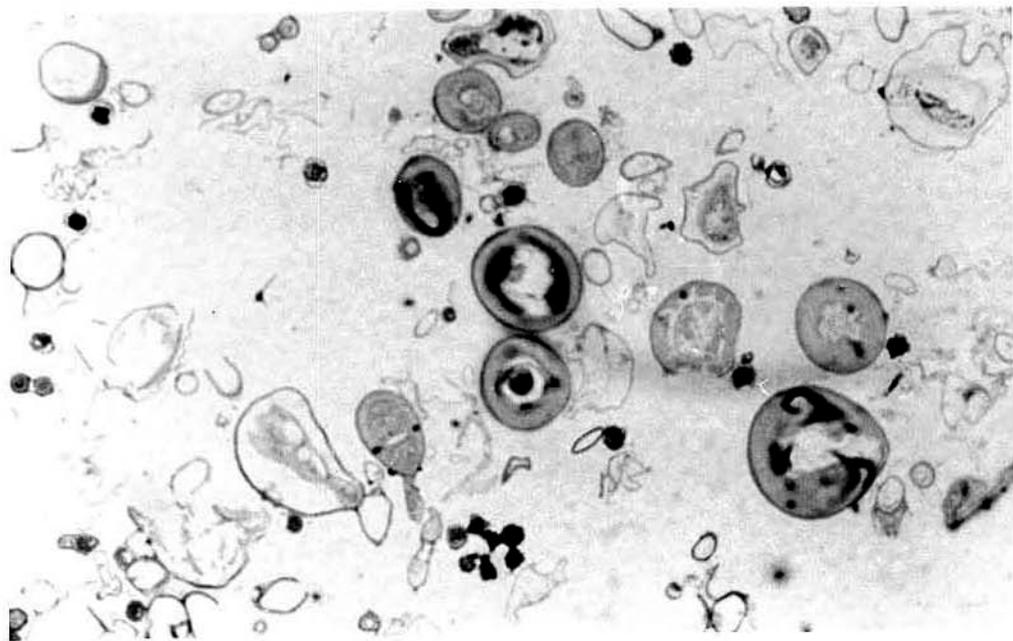


FIGURA - 20. Célula de Hulle de *Aspergillus nidulans* com macronúcleo corada com azul de toluidina (aumento 100x).



FIGURA - 21. Células de Hulle em fase de maturação de *Aspergillus nidulans*. Coradas com HCl Giemsa (aumento 40x).



FIGURA 22. Célula de Hulle de *Aspergillus nidulans* com macronúcleo e pequeno núcleo próximo ao tubo germinativo (aumento 100x4)

### 5.3.2 - Diâmetro do Macronúcleo de Células de Hulle

Após a coloração pelo método descrito no item 3.4.8.2, foi possível observar o macronúcleo das linhagens CH-89, A, biA1;methG1//MSE e proA1;pabaA6;y1//MSE. A TABELA 33 apresenta as medidas em micra de 25 macronúcleo das respectivas linhagens e suas médias. A análise de variância dos dados estão apresentados na TABELA 34. O resultado da análise indica que não existe diferença significativa entre os diâmetro dos macronúcleos nas linhagens estudadas.

Em *Aspergillus nidulans* constatou-se uma diferença significativa entre os núcleos de conídios de linhagens haploídes, duplicada e diploíde (PAES DE BARROS, 1977; GABRIELLI, 1978). Nas células de Hulle não foi possível evidenciar essa diferença. Entretanto, essas células, na fase de maturidade, onde se constata a existência do macronúcleo apresentaram uma quantidade de DNA 14,81 vezes maior do que a quantidade de DNA dos conídios.

O diâmetro médio do macronúcleo (FIGURA 23) foi de 3,2 micra e as medidas do macronúcleo para cada linhagem analisada se encontram na TABELA 33.

Tabela 33. Diâmetro do macronúcleo(micra) de 25 células de Hulle das linhagens CH-89, A, biA1;methG1//MSE e proA1;pavaA6;y1//MSE.

Célula	<u>Linhagens</u>			
	<u>CH-89</u>	<u>A</u>	<u>biA1;methG1//MSE</u>	<u>proA1;pavaA6//MSE</u>
1	4,0	3,5	3,0	2,9
2	3,0	3,0	4,0	3,0
3	3,5	3,0	3,5	3,0
4	3,0	3,0	3,0	4,0
5	3,0	3,0	3,0	3,2
6	2,5	3,0	3,0	3,0
7	4,0	3,0	4,0	3,2
8	4,0	3,0	4,0	4,0
9	3,0	4,0	3,5	4,0
10	2,5	3,5	3,0	3,0
11	2,5	3,0	3,0	3,0
12	2,5	3,5	3,0	3,0
13	3,0	2,5	3,5	3,2
14	3,5	3,0	3,0	3,2
15	3,0	3,8	3,0	3,0
16	3,0	3,0	3,0	4,0
17	3,0	4,0	3,0	4,0
18	3,0	3,0	3,0	3,5
19	2,8	2,5	2,5	3,2
20	3,2	3,0	3,5	3,5
21	3,1	4,0	3,0	3,0
22	3,0	3,0	3,0	3,0
23	2,8	2,8	3,0	3,0
24	3,0	3,0	3,0	3,0
25	3,0	3,0	3,2	3,0
médias	3.056	3,164	3,276	3,188

Diâmetro médio do macronúcleo 3,171

Tabela 34. Análise da variância dos dados da tabela 34.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Entre núcleos	3	0,615	0,205	1,20ns
Dentro de núcleos	96	16,271	0,169	
Total	99			

ns=não significativo

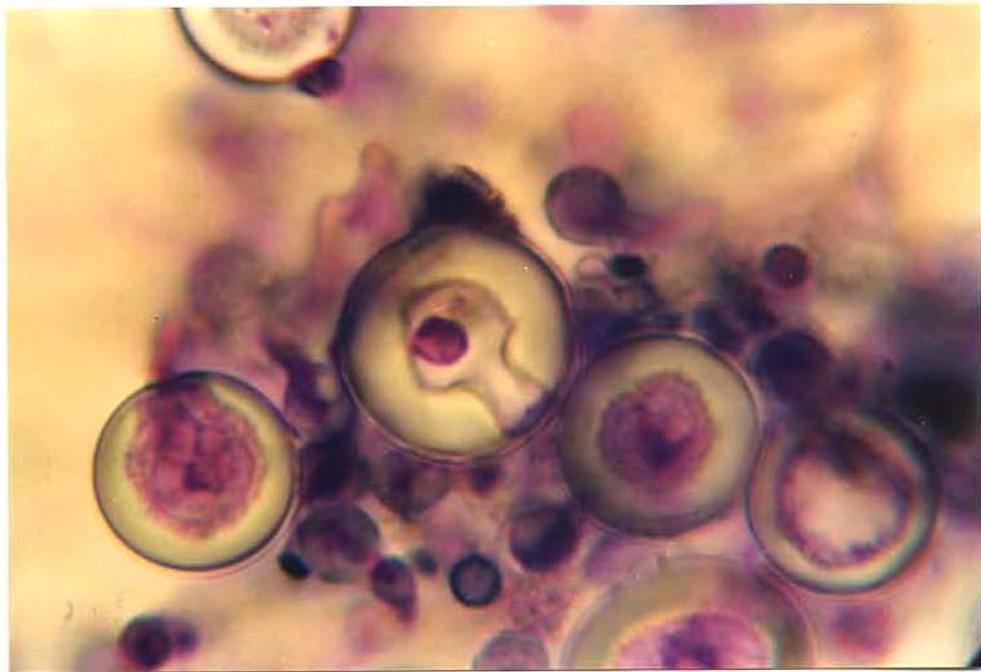


FIGURA - 23. Vista do macronúcleo da célula de Hulle de *Aspergillus nidulans* corada segundo a técnica do HCl-Giemsa (aumento 100x).

### 5.3.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão

Utilizando-se a técnica descrita no item 3.4.8.3. Células de Hulle da linhagem CH-89 foram observadas e fotografada em microscopia de varredura. As FIGURAS 24, 25 e 26 apresentam uma visão geral de células de Hulle formadas entre cabeças conidiais e micélio do fungo. Essas células são mostradas com maior detalhe na FIGURA 27, na qual pode-se vê células maduras com formato globosas e células em formação com formato semigloboso.

Além da microscopia de varredura foram feitas preparações para observações em microscopio de transmissão de acordo com o item 3.4.8.4. As FIGURAS 28 e 29 mostram detalhes das células de Hulle, vendo-se cortes de núcleo e de mitocôndrias. Na FIGURA 30 vê-se um corte de célula de Hulle numa fase de maturação apresentado possivelmente degeneração do macronúcleo.

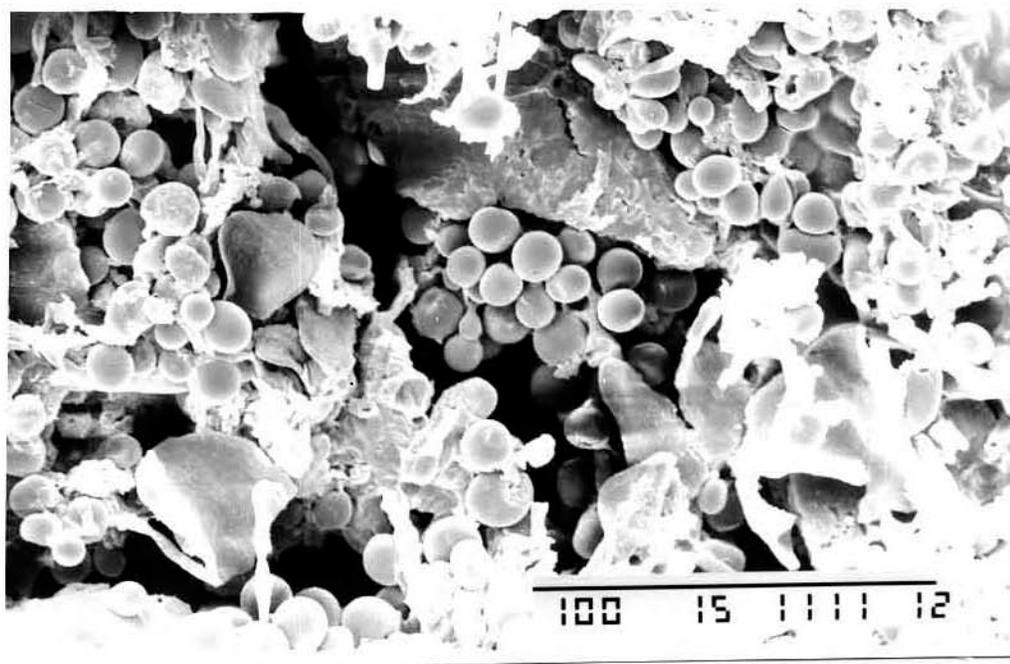


FIGURA 24. Visão geral mostrando a produção de células de Hulle em *Aspergillus nidulans* (aumento 5000x)

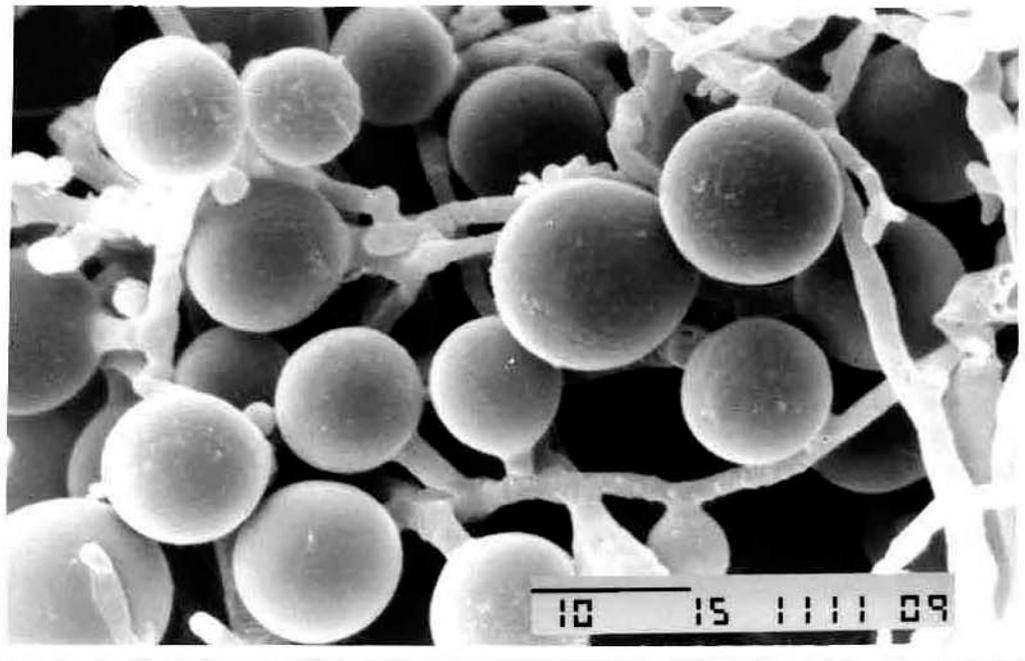


FIGURA 25. Células de Hulle de *Aspergillus nidulans* em diferentes fases (8000x).

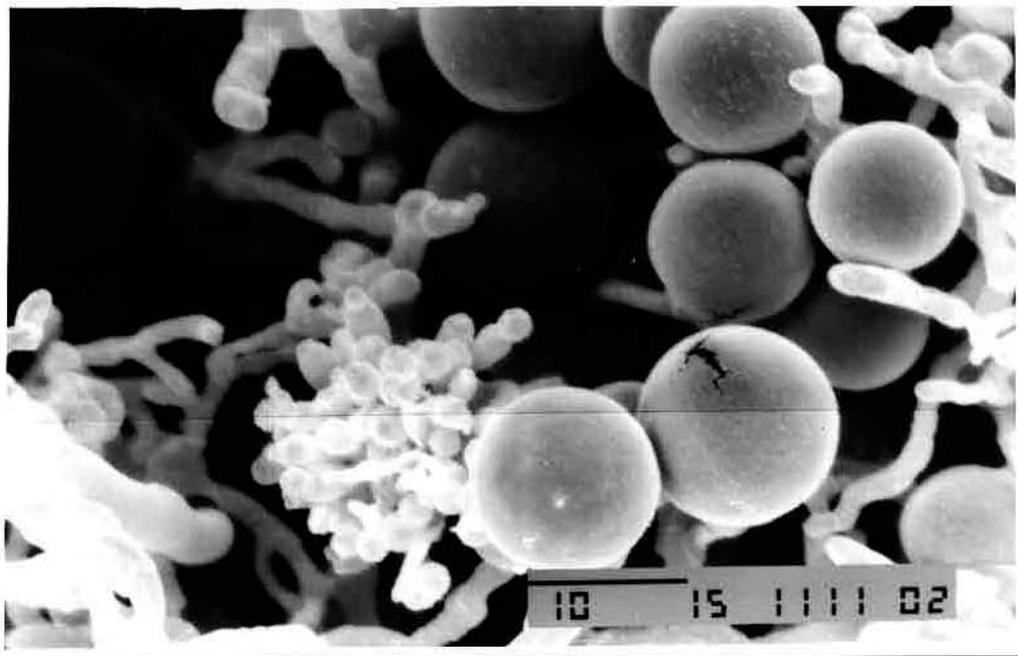


FIGURA 26. Células de Hulle de *Aspergillus nidulans* em diferentes fases entre cabeça conidial (aumento 8000x).

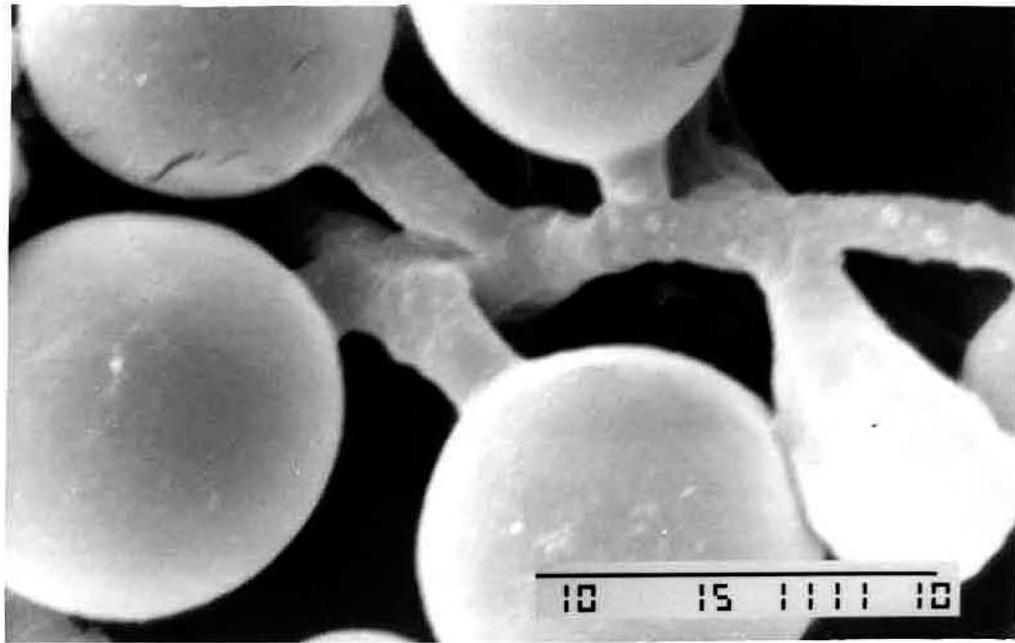


FIGURA 27.- Células de Hulle de *Aspergillus nidulans* na fase de maturação apresentando um formato globoso e na fase intermediária, um formato semigloboso (aumento 10000x)

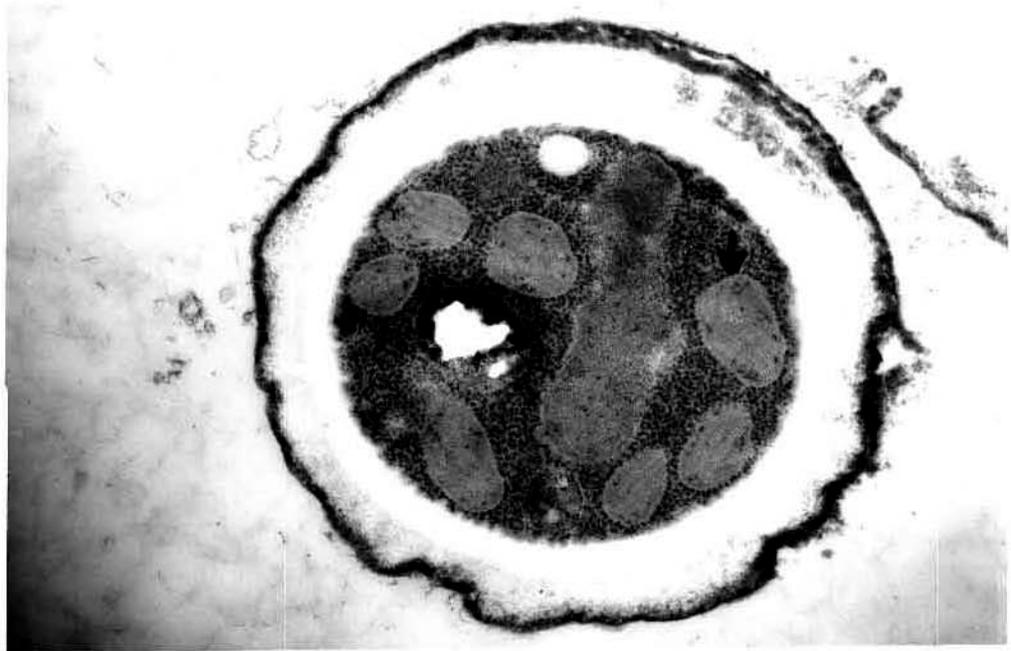


FIGURA 28. A seta indica uma mitocôndria em célula de Hulle de *Aspergillus nidulans* (aumento 10000x).

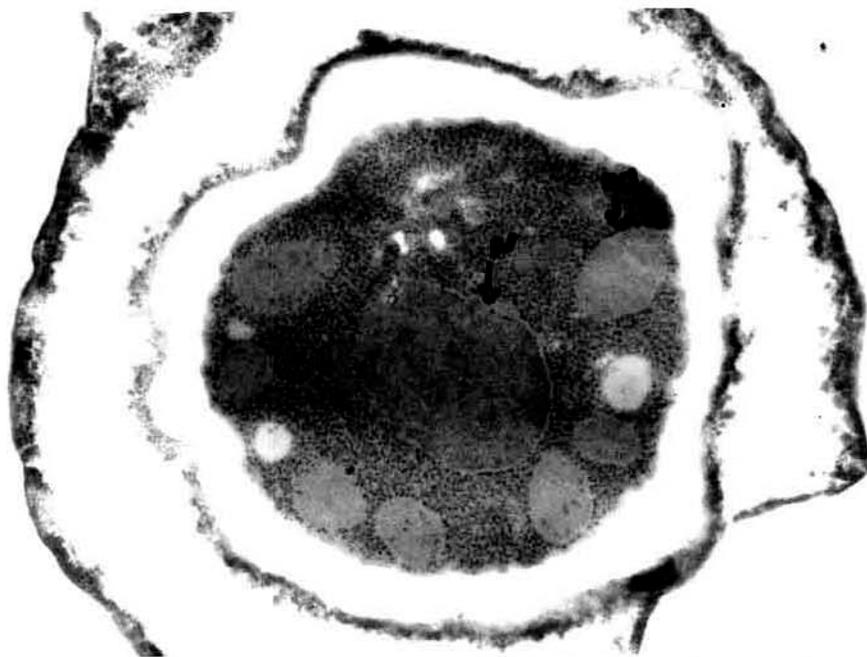


FIGURA - 29. As setas indicam um núcleo e uma mitocôndria em célula de Hulle de *Aspergillus nidulans* (aumento 10000x)

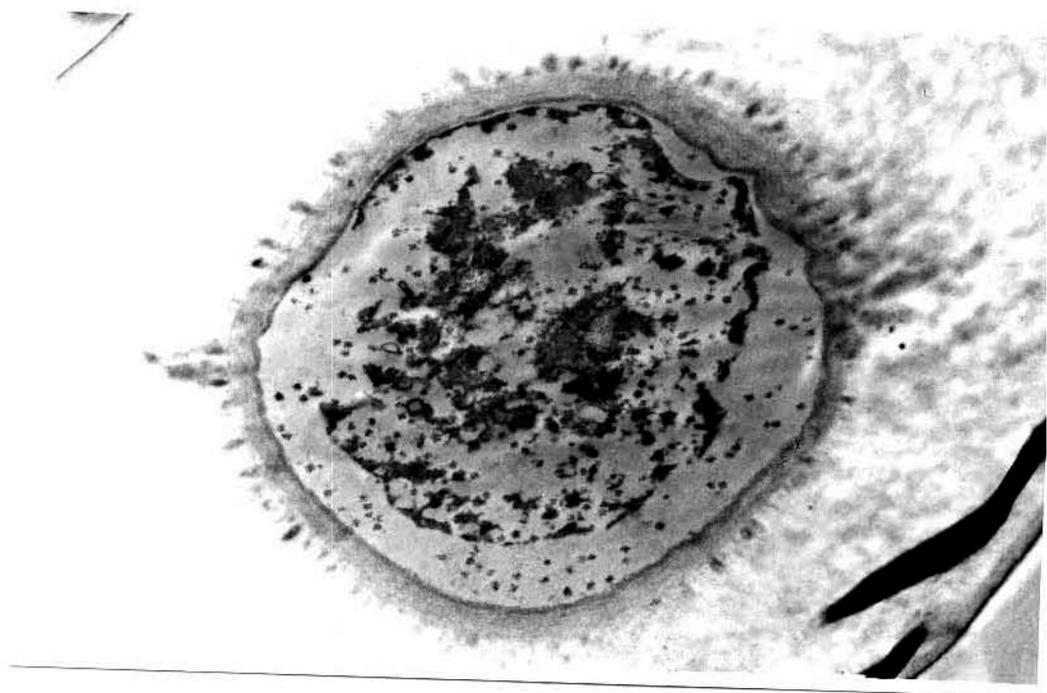


FIGURA - 30. Célula de Hulle de *Aspergillus nidulans* em fase de maturação com sinais degenerativos do macronúcleo (aumento 12000x).

## 6 - CONCLUSÕES

Dos estudos citogenéticos de células de Hulle em *Aspergillus nidulans* apresentados no presente trabalho, podemos tirar as seguintes conclusões:

1 - As células de Hulle são estruturas que na fase de desenvolvimento são formadas por vários núcleos e na fase de maturação apresenta um macronúcleo.

2 - O diâmetro do macronúcleo das células de Hulle foi em média de 3,2 micras.

3 - As células de Hulle apresentam uma maior resistência a radiação ultravioleta do que o conídio.

4 - A quantidade de DNA por célula de Hulle foi em média 14,8 vezes maior do que a do conídio.

5 - Não houve diferença significativa entre os volumes de células de Hulle de linhagens haploides e diploides.

6 - A técnica citológica com melhores resultados para coloração de núcleos de células de Hulle foram a do HCl-Giemsa.

7 - No início da formação as células de Hulle apresentam uma parede celular fina e transparente e na fase de maturação, com a formação do macronúcleo, a parede tem espessura grossa.

## 7 - RESUMO

### Análise Citogenética de Células de Hulle em *Aspergillus nidulans*

Certas espécies de fungo do gênero *Aspergillus* apresentam um tipo de célula em volta do cleistotécio, que são denominadas de células de Hulle. A fim de analisar com mais facilidade a formação dessas células, procurou-se obter uma linhagem de *A. nidulans* com baixa produção de conídios e cleistotécio e alta produção de células de Hulle. Células de Hulle provindas dessa linhagem foram colocadas para crescer em membrana de diálise, onde foi possível observar os seus núcleos. A fixação do material foi com Carnoy, hidrolizando-se com HCl e corando com Giemsa. Na fase de formação de células de Hulle foram observados vários núcleos de tamanho aproximadamente igual aos núcleos das hifas e dos conídios. Nas células de Hulle madura foi observado a formação de um macronúcleo de tamanho aproximado a 3,2 micra. Para comparar a quantidade de DNA, células de Hulle e conídios das linhagens A e CH-89 foram isoladas e feito a extração de DNA (Van Tuyl, 1977). A quantidade de DNA por célula foi em média 14,81 vezes maior do que a do conídio. As células de Hulle apresentaram maior resistência a radiação ultravioleta

do que o conídio. Não houve diferença significativa dos volumes de células de Hulle entre linhagens haplóides e diplóides.

## 8 - SUMMARY

### Cytogenetic Analysis of Hulle Cells of *Aspergillus nidulans*

Certain species of fungi of the *Aspergillus* genus present a type of cells around the cleistothecium that are denoted Hulle cells. To facilitate analysis of the formation of these cells, an *A. nidulans* strain with low conidium and cleistothecium production and with high Hulle cell production was obtained. Hulle cells from this strain were allowed to grow on dialysis membranes, where it was possible to observe their nuclei. The material was fixed with Carnoy, hidroylized with HCl and stained with Giemsa. Several nuclei approximately equal in size to the nuclei of hyphae and conidia were observed during the phase of Hulle cell formation. The formation of a macronucleus measuring approximately 3.2  $\mu\text{m}$  was observed in mature Hulle cells. To compare the DNA amount, Hulle cells and conidia of the A and CH-89 strains were isolated and submitted to DNA extraction (Van Tuyll, 1977). The amount of DNA per cell was, on average, 14.81 times greater than the amount of DNA in the conidia. Hulle cells presented greater resistance to ultraviolet radiation than did the conidia. There was no significant difference in Hulle cell volume between haploid and diploid strains.

## 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, G. E., 1945. Conidium formation in species of *Aspergilli*. *Mycologia*, 37:582-600.
- BAINBRIDGE, B. W., 1971. Macromolecular composition and nuclear division during spore germination in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 66: 319-325.
- BARACHO, I. R. e W. R. COELHO., 1978. Proporção de conídios binucleados em *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Cultura*, 30(5): 605-608.
- BERGEN, L. G. e N. R. MORRIS., 1983. Kinetics of the nuclear division cycle of *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol*, 156: 155-160.
- BERGEN, L. G; A. UPSHALL e N. R. MORRIS., 1984. S-phase, G<sub>2</sub>, and nuclear division mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 159(1): 114-119.
- CHANG, L. T.; C. TERRY; R. W. TUVESON., 1974. The influence of heterokaryotic conidia on the selective recovery of somatic diploids in *Aspergillus niger*. *Mycologia*, 66:67-77.

- CLUTTERBUCK, A. J., 1969. Cell volume per nucleus in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, 55:291-299.
- CLUTTERBUCK, A. J., 1970. Synchronous nuclear division and septation in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, 60:133-135.
- DANGEARD, P. A., 1907. Recherches sur le développement du périthèce chez les Ascomycètes. **Botaniste**, 10: 1-385.
- DOBY, J. M. & M. KOMBILA-FAVRY., 1978. Presence de formes sexuelles (cleistothèces et hülle-cells), dans un cas humain d'aspergillose du sinusmaxillaire chez *Aspergillus nidulans* associé à *Aspergillus fumigatus*. **Mycopathologia** 64(3): 157-163.
- DOONAN, J. H. & N. R. MORRIS., 1989. The bimG gene of *Aspergillus nidulans*, required for completion of anaphase, encodes a homolog of mammalian phosphoprotein phosphatase-1. **Cell**, 57:987-996.
- EIDAM, E. 1883. Zur Kenntnis der Entwicklung bei den Ascomyceten. III. *Sterigmatocystis nidulans* n. sp. **Beitr. Biol. Pflanzen** 3: 392-441.

- EL-ANI, S. A., 1990. In vivo and in vitro nuclear condition in the hypha of *Fusarium solani* and *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, 82(5)-566-568.
- ELLIOTT, C. G., 1960. The cytology of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, 1:462-476.
- ELLIS T. T; D. R. REYNOLDS e C. J. ALEXOPOULOS. 1973. Hulle development in *Emicerella nidulans*. **Mycologia**, 65: 1029-1035.
- ENOS, A. P. e N. R. MORRIS., 1990. Mutation of a gene that encodes a kinesin-like protein blocks nuclear division in *Aspergillus nidulans*. **Cell**, 60:1019-1027.
- FINNEY, D. J., 1947. Probit analysis. Cambridge University Press. 256p.
- FULLER, M. S., 1976. Mitosis in fungi. **International Review of Cytology**, 45:113-151.
- FUNGARO, M. H. P., 1984. Caracterização genética e dados citológicos em *Aspergillus niger* van Tieghem e *Aspergillus awamori* Nakazawa. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de mestre, 134 p, Piracicaba, S. P.

- FURTADO, J. S., 1968. Basidial cytology of *Exidia nucleata*. *Mycologia*, 1: 9-15.
- GABRIELLI, C. A., 1978. Estudos citogenéticos em uma linhagem deteriorada (V8) de *Aspergillus nidulans* e seus derivados. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de mestre, 101p., Piracicaba, S.P.
- GILES, K. W. e A. MYERS., 1965. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 206: 93.
- HERMAN, T. E.; M. B. KURTZ; e S. P. CHAMP., 1983. Laccase localized in hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 154: 955-961.
- HOUGHTON, J. A., 1970. A new class off slow-growing nonperithecial mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research* 16:285-292.
- ISHITANI, G.; K. UCHIDA e K. IKEDA., 1956. The relation of DNA content to cell size in *Aspergillus*. *Exporimental Cell Research*, 10:737-740.

KAFER. E., 1961. The process of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, **46**:1581-1609.

KRUSKAL, W. H. & WALLIS, W. A., 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **J. Amer. Statist.** **47**: 583-621.

KURTZ, M. B. e S. P. CHAMPE., 1981. Dominant spore color mutants of *Aspergillus nidulans*. Defective in germination and sexual development. **Journal of Bacteriology**, **148**:629-638.

MCCULLY, K. S. e E. FORBES., 1965. The use p-fluorhenylalanine with master strains of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. **Genetical Research**, **6**:352-359.

MCCCLINTOCK, B., 1945. Preliminary observations of the chromossomes of *Neurospora crassa*. **American Journal of Botany**, **32**:671-678.

MIMS, C. W., E. A. RICHARDSON e W. E. TIMBERLAKE., 1988. Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. **Protoplasma**, **44**:132-141.

MORRIS, N. R., 1976. Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res*, 26:237-254.

MUNTANJOLA-CVETKOVIC, M e V. V. VUVIC., 1968. *Aspergillus protuberus* from Yugoslavia and its responses a light. *Mikrobiologija*. 5(1):117-126.

MUNTANJOLA-CVETKOVIC, M. e V. V. VUKIC., 1972. Influence of light on hulle cell and aleuriospores formation in *Aspergillus*. *Trans. Br. Mycol. Soc*, 58(1): 67-72.

NGA, B. H. e J. A. ROPER., 1968. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 58:193-209.

OAKLEY, B. R. e N. R. MORRIS., 1983. A mutation in *Aspergilluns nidulans* that blocks the transition from interphase to prophase. *J. Cell Biol*, 96: 1155-1158.

OAKLEY, B. R. e J. E. RINEHART., 1985. Mitochondria and nuclei move by different mechanisms in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol*, 101: 2392-2397.

PAES DE BARROS, J., 1977. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans*(Eidam) Winter. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de mestre, 81p., Piracicaba, S.P.

- PIMENTEL GOMES, F., 1984. Curso de Estatística Experimental. Livraria Nobel. S.A., São Paulo. 430p.
- PIZZIRANI, A. A., 1977. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans*(Eidam) Winter. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de mestre, 111p., Piracicaba, S.P.
- PONTECORVO, G., J. A. ROPER, D. W. HEMMONS, K. D. K. D. McDONALD e A. W. BUFTON., 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.
- ROPER, J. A., 1958. Production of heterozigous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8:14-15.
- RAIKOV, D. I., 1985. Primitive never-dividing macronuclei of some lower Ciliates. *International Review of Cytology*. 95:267-327.
- ROBINOW, C. F. & C. E. CATEN., 1969. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science*, 5: 403-431.
- RAPER, K. B. e D. I. FENNEL., 1973. The genus *Aspergillus*. Huntington, New York. R. E. Krieger Publishing Company. 686p.

- ROSEMBERGER, R. F. e M. KESSEL., 1967. Synchrony of nuclear replication in individual hyphae of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, **94**: 1464-1469.
- ROSLIM, R. T.; O. GARCIA JR., e I. R. BARACHO., 1978. Tamanho de conídios e núcleos em linhagens haplóides e diplóides de *Aspergillus niger*. *Ciência e Cultura*, **30**(4): 487-492.
- SCHWARTZ, W., 1928. Entwicklungsphysiologische untersuchungen uber die gattungen *Aspergillus* and *Penicillium* I. *Aspergillus*-Arten. *Flora*, **23**:386-440.
- SCOSSIROLI, R.E., 1962. Manuale de statistica per ricercatori. Ing. C. Olivetti & S. P. A. 256p.
- STEEL, R. G. D. e J. H. TORRIE., 1960. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
- SOUZA, D. R. N., 1979. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 244p. (tese de mestrado).

TRINCI, A. P. J. e N. R. MORRIS., 1979. Morphology and growth of a temperature sensitive mutant of *Aspergillus nidulans* which forms asptate mycelia at non-permissive temperatures. *J. Gen. Microbiol.*, 114: 53-59.

VENABLE, J. H. & COGGESHALL, R., 1965. A simplified lead citrate stain for use in eletron microscopy. *J. Cell Biol.*, 25:407-408.

VAN TUYLL, J. M., 1977., Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. **Netherland Mededelingen Landbowwhogeshool Wageningen**, 136p.

YUILL, E., 1950. The numbers of nuclei in conidia of *Aspergilli*. *Transactions of the British Mycological Society*, 33: 324-331.

WAKAYAMA, K., 1931. Chromosome number in *Aspergilli*. *Citologia.*, 2: 291-301.

WATSON, B. C., 1958. Staining of tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4(4): 475-478.

WHELDEN, R. M., 1940. Mutations in *Aspergillus niger* bombarded by low voltage cathode rays. *Micologia*, 32: 630-643.

WEISER, J. e S. H. WEISBERG., 1966. Karyokinesis of the somatic nucleus of *Aspergillus nidulans*: I. The juvenile chromosome cycle (Feulgen staining). **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, 3:361-373.

ZONNEVELD, B. J. M., 1972. A new type of enzyme, an exosplitting  $\alpha$ -1,3 glucanase from non-induced cultures of *Aspergillus nidulans*. **Biochemical Biophysics Acta**, 258:541-547.

ZONNEVELD, B. J. M., 1973. Inhibitory effect of 2-deoxyglucose on cell wall  $\alpha$ -1,3 glucan synthesis and cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. **Developmental Biology**, 34: 1-8.

ZONNEVELD, B. J. M., 1988. Morphology of Initials and Number of Nuclei Initiating Cleistothecia in *Aspergillus nidulans*. **Trans, Br. Micol. Soc.**, 90 (3), 369-373.