

BC/10903
IB/80621

LUZIA AURELIA CASTANEDA



50621

Análise genética da Produção de lipídios de
Aspergillus nidulans

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pela candidata Luzia Aurelia Castaneda e aprovada pela comissão julgadora em 21/06/89

Orientador: Dr. IVANHOÉ RODRIGUES BARACHO

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

CAMPINAS

Estado de São Paulo

T/UNICAMP

1989

C275_a

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

CLASSIF. 1
AUTOR. C275 a.
V. EX.
TOMBO BC 10903
12/899

13/ 80621
14/ 10903



UNICAMP

Dedico,
ao meu avô Eugênio Castañeda Agundez
pela inquietude intelectual
e a minha avó Madalena Fábris Selega
pela espiritualidade.



ANTEPASSADO

Só te conheço de retrato
não te conheço de verdade,
mas teu sangue bole em meu sangue
e sem saber te vivo em mim
e sem saber vou copiando
tuas imprevistas maneiras,
mais do que isso: teu fremente
modo de ser, enclausurado
entre ferros de conveniência
ou aranhóis de burguesia,
vou descobrindo o que me deste
sem saber que o davas, na líquida
transmissão de taras e dons,
vou te compreendendo, somente
de esmirilar em teu retrato
o que a pacatez de um retrato
ou o seu vago negativo,
nele implícito e reticente,
filtra de um homem; sua face
oculta de si mesmo; impulso
primitivo; paixão insone
e mais trevosas intenções
que jamais assumiram ato
nem mesmo sombra de palavra,
mas ficaram dentro de ti
cozinhas em lenha surda.
Acabei descobrindo tudo
que teus papéis não confessaram
nem a memória de família
transmitiu como fato histórico
e agora te conheço mais
do que a mim próprio me conheço,
pois sou teu vaso e transcendência,
teu duende mal encarnado.
Refaço os gestos que o retrato
não pode ter, aqueles gestos
que ficaram em ti à espera
de tardia repetição,
e tão meus eles se tornaram,
tão aderentes ao meu ser
que suponho tu os copiaste
de mim antes que eu os fizesse,
e furtando-me a iniciativa,
meu ladrão, roubaste-me o espírito.



UNICAMP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas e instituições que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

Ao Professor Dr. Ivanhoé Rodrigues Baracho, pela orientação e dedicação.

Aos funcionários, colegas e professores do setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Biologia da Unicamp.

Ao professor Paulo Feijão Teixeira e à técnica Miriam Aparecida Bonatto do Instituto Agrônomo de Campinas pela valiosa ajuda na análise cromatográfica.

Ao encarregado administrativo do laboratório de Análise de sistemas da USF, Claudomir Bergamin, pela ajuda prestada na impressão deste trabalho.

À colega Dilaine, pela revisão e sugestões propostas.

À FAPESP e à CAPES, pelas bolsas de estudos concedidas.

Aos amigos Emílio, Adalberto e Agenor, pelo carinho e bom humor sempre presentes.

As amigas - irmãs Stella, Ligia e Ana Claudia, pela cumplicidade, atenção e grande amizade.

A irmã - amiga Cristiane Casteñeda.

Aos meus pais de Campinas, José e Afira, pelo carinho e ajuda prestada durante toda nossa convivência.

E um "muito obrigada", muito especial, aos meus queridos pais Eugênio e Luzia, por tudo.



... uma lembrança,
muita saudade ...

José Ellis Ripper Neto.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 Linhagens geneticamente alteradas e produção de lipídios em fungos.....	03
2.2. Meio de cultura e produção de lipídios em <i>Aspergillus nidulans</i>	07
2.3. Lipídios em fungos.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Linhagens utilizadas.....	21
3.2. Meios de cultura.....	24
3.2.1. Meio mínimo.....	24
3.2.2. Meio completo.....	24
3.2.3. Meio de galactose.....	25
3.2.4. Meio de acetato de Amônia.....	25
3.2.5. Meio mínimo líquido + 2% meio completo.....	25
3.2.6. Meio sólido.....	26
3.3. Soluções.....	26
3.3.1. Hidrolizado de ácido nucleico de levedura.....	26
3.3.2. Solução de cloroneb.....	26
3.3.3. Solução salina.....	27
3.3.4. Solução de "Tween".....	27
3.3.5. Solução de vitaminas.....	27
3.3.6. Substâncias adicionadas ao meio mínimo.....	28



3.4. Esterilização.....28

3.5. Análise de lipídio.....29

 3.5.1. Determinação da quantidade de lipídio
 por cromatografia gasosa.....29

3.6. Técnica geral.....30

 3.6.1. Obtenção de heterocários.....31

 3.6.2. Isolamento de diplóide.....31

 3.6.3. Análise mitótica.....32

3.7. Medidas dos diâmetros de conídios.....32

4. RESULTADOS.....33

 4.1. Diplóides obtidos.....33

 4.2. Setores obtidos.....33

 4.3. Análise de lipídios.....34

 4.3.1. Análise qualitativa de lipídios das
 linhagens mutantes.....34

 4.3.2. Análise qualitativa de lipídios dos diplóides..47

 4.3.3. Análise qualitativa de lipídios encontrados
 nos setores.....52

 4.4. Comparação entre a produção qualitativa dos diplóides
 e as linhagens que lhe deram origem em MC e MM
 suplementado.....63

 4.4.1. Comparação entre a produção do diplóide $pa^6 A ; y^1 A // bi^1 A ; metb^1 G$ em MM e as
 linhagens que lhe deram origem em MC
 e MM suplementado.....63



4.4.2. Comparação entre a produção do diplóide $g_1 A ; g_2 A$ // MSE em MM e as linhagens que lhe deram origem em MC e MM suplementado.....	66
4.4.3. Comparação entre a produção de diplóide $h_1 A ; h_2 G$ // MSE e as linhagens que lhe deram origem em MC e MM suplementado.....	69
4.5. Análise quantitativa de lipídios.....	72
4.5.1. Determinação da porcentagem de ácidos graxos...	72
5. DISCUSSÃO.....	74
5.1. Lipídios nas linhagens haplóides, diplóides e segregantes em diferentes meios de cultura.....	74
5.2. Genética da produção de lipídios.....	83
6. RESUMO.....	87
7. SUMMARY.....	88
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA.....	89



ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Diâmetro dos conídios diplóides de <i>A. nidulans</i>	33
TABELA 2. Ácidos graxos produzidos pela linhagem $\rho\alpha A ; \rho\alpha\beta A$ $A ; \gamma A$ em MC e MM suplementado.....	42
TABELA 3. Ácidos graxos produzidos pela linhagem MSE em MC e MM suplementado.....	43
TABELA 4. Ácidos graxos produzidos pela linhagem $bi A ; meth$ G em MC e MM suplementado.....	44
TABELA 5. Comparação entre a produção das linhagens haplóides estudadas em MM suplementado.....	45
TABELA 6. Comparação entre a produção das linhagens haplóides estudadas em MC.....	46
TABELA 7. Ácidos graxos produzidos pelos diplóides em MM.....	51
TABELA 8. Análise lipídica dos setores do diplóide $\rho\alpha A ;$ $\rho\alpha\beta A ; \gamma A$ // MSE em MM suplementado.....	62
TABELA 9. Comparação entre a produção do diplóide $\rho\alpha A ; \rho\alpha\beta A ; \gamma A$ // $bi A ; meth G$ em MM. e as linhagens que lhe deram origem em MC	64
TABELA 10. Comparação entre a produção do diplóide $\rho\alpha A ; \rho\alpha\beta A ; \gamma A$ // $bi A ; meth G$ em MM e as linhagens que lhe deram origem em MM suplementado	65



TABELA 11. Comparação entre a produção do diplóide μ A ;
 μ A // MSE em MM e as linhagens que
 6 1
 lhe deram origem em MC67

TABELA 12. Comparação entre a produção do diplóide μ A ;
 μ A // MSE em MM e as linhagens que
 6 1
 lhe deram origem em MM suplementado68

TABELA 13. Comparação entre a produção do diplóide MSE // bi
 A ; meth G em MM e as linhagens que lhe deram
 1 1
 origem em MC70

TABELA 14. Comparação entre a produção do diplóide MSE // bi
 A ; meth G em MM e as linhagens que lhe deram
 1 1
 origem em MM suplementado71

TABELA 15. Porcentagem de ácidos graxos nas linhagens
 estudadas em MM e MM suplementado.....73

TABELA 16. Número de setores com respectivos marcadores
 genéticos e ácidos graxos produzidos.....86

1. INTRODUÇÃO

A capacidade de fungos produzirem lipídios em grande quantidade é conhecida há bastante tempo. Segundo Woodbine (1959), uma das primeiras referências à produção de lipídios por fungos filamentosos foi a de Ficinia em 1873, em estudos realizados em *Claviceps purpurea* seguindo-se os trabalhos de Cramer, em 1894, que estudou lipídios em *Penicillium glaucum* e Laborde em 1897, que comparou *Aspergillus niger* e *P. glaucum* com *Eurotropsis gayoni*, em relação à temperatura de incubação, pH e consumo de açúcares, e verificou que adicionando álcool ao substrato obtinha 30 por cento de lipídios.

No final da Primeira Guerra (1914-1918), devido à acentuada necessidade de óleo, na Alemanha, foram implantados alguns projetos de utilização de fungos para a produção de lipídios, visando o seu uso não só como alimento, mas também como reserva de energia (Hesse, 1949).

Esses projetos foram abandonados depois da guerra pois apresentaram algumas dificuldades no cultivo, além de altos custos e alta demanda de mão-de-obra. Entretanto, a produção em escala comercial foi novamente tentada, antes e durante a Segunda Guerra Mundial, por dois grupos industriais alemães, usando desta vez, culturas submersas de *Torula* ou *Fusarium*. Excetuando o sucesso técnico, o projeto foi mais uma vez considerado não econômico depois da guerra (Woodbine, 1959).

No Brasil são poucos os estudos realizados nesse campo. Contudo, tendo em vista as nossas carências na produção de combustíveis líquidos, e as possibilidades de utilização de resíduos industriais, como o vinhoto, o uso de fungos para a produção de lipídios é uma possibilidade a ser explorada e faz-se necessário ampliar o conhecimento do material biológico e de técnicas adequadas à exploração desse material.

Dentro desse aspecto é extremamente importante a análise genética da produção de lipídios por fungos.

O presente trabalho utiliza *Aspergillus nidulans* para a análise genética da produção qualitativa de lipídios e estabelece comparações entre as produções quantitativas dos ácidos graxos encontrados nas linhagens estudadas.

Foi escolhido esse fungo por apresentar, além da potencialidade de acumulação lipídica, outras vantagens, a de ser um fungo bem conhecido geneticamente e, apresentar formação de diplóides e segregantes.

O trabalho tem como objetivos principais:

a) Análise qualitativa da produção de lipídios na linhagem MSE, na linhagem $\rho\alpha\alpha A$; $\rho\alpha\beta A$; γA e na linhagem $\beta I A$; $\alpha\eta\beta$ G em MC e MM suplementado.

b) Isolamento dos diplóides, formados a partir dessas linhagens, e de segregantes provenientes desses diplóides.

c) Análise genética da produção de lipídios nos diplóides e segregantes.

d) Análise quantitativa de lipídios nas linhagens haplóides e diplóides, determinando-se a porcentagem de ácidos graxos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Linhagens geneticamente alteradas e produção de lipídios em fungos

A utilização de microrganismos como fornecedores de produtos comercialmente importantes pode apresentar algumas vantagens (Monteiro, 1984), como por exemplo:

- a - Crescimento médio rápido.
- b - Certa facilidade no controle das condições de cultivo.
- c - Área requerida pequena.
- d - Possibilidade de se aumentar a produção através da seleção de linhagens por mutação, recombinação e otimização das condições de crescimento.

Entre outras vantagens destaca-se certamente, a facilidade de selecionar e melhorar linhagens para alta produção, o que sem dúvida implica na necessidade de se conhecer melhor os fenômenos genéticos envolvidos.

O uso da mutação induzida é um método convencional aplicado tanto em laboratórios como em indústrias de fermentação, que se utiliza de microrganismos para a produção de metabólitos de interesse comercial (Demain, 1973).

Das (1972) cita trabalho de Kresling e Stern, os quais, já em 1935, obtiveram mutantes de *Aspergillus niger* com produção de ácido cítrico aumentada após o uso de agentes mutagênicos, porém, o uso intensivo da técnica foi iniciado em 1945 com trabalhos feitos em *Penicillium chrysogenum*, usando raios-x como

mutagênico, que culminaram na obtenção da linhagem X-1612 com produção superando duas vezes a da linhagem parental (Bonatelli Jr., 1981).

As mutações que condicionam auxotrofia podem determinar ganho, perda ou não-alteração na produção dos metabólitos (revisões em Sermonti, 1969; Demain, 1973; Hopwood e Merrick, 1977).

Quanto à produção de lipídios em leveduras, analisando mutantes morfológicos podemos nos referir aqui a um estudo feito por Mahler et alii (1964) com mutantes citoplasmáticos "petite" de *Saccharomyces*. Sob condições fisiológicas controladas não foram consideradas significativas as diferenças existentes no conteúdo total de lipídios insaponificáveis entre as espécies selvagens e os mutantes "petite".

Uma análise em *Neurospora crassa* revelou que a quantidade de ácido α - linolênico de mutante Poky (20%) era bem maior do que a quantidade encontrada no tipo normal (9,0%), (Shaw, 1966).

Em mutantes morfológicos de *Candida lipolytica* podemos encontrar um estudo da produção de lipídios feitos por Thomazini (1981) onde foi observado que os mutantes estudados apresentavam diferenças quantitativas entre os ácidos graxos.

A composição e a produção lipídica de alguns mutantes auxotróficos de *Aspergillus nidulans* pode ser verificada em Monteiro (1984), onde foram encontradas diferenças quantitativas e qualitativas. Na linhagem MSE verificou-se o mais alto índice de lipídios totais (53,92 mg/100 ml) e a maior porcentagem do ácido linoleico (38,3 %); já no mutante y nic 5 ribo 5 encontrou-se o mais baixo índice de lipídios totais (31,88 mg/100 ml) e a

maior porcentagem do ácido palmítico (38,9 %).

Em relação aos diplóides há dois casos a considerar. Deve-se levar em conta se o diplóide é formado a partir de linhagens isogênicas, ou de linhagens não-isogênicas. No primeiro caso é de se esperar que a produção não difira da produção da linhagem que deu origem aos mutantes. Isso tem sido verificado em vários trabalhos. Há, contudo, algumas referências ao aumento de produção, mesmo neste caso (Sermonti, 1969; Das e Roy, 1978).

Quanto aos diplóides provenientes de linhagens não-isogênicas, há casos em que a produção aumenta, e outros em que o nível de produção ou se mantém intermediário ou desce a limites inferiores ao da linhagem de mais baixa produção (Sermonti, 1969).

Estudos referentes à produção lipídica de diplóides de *Aspergillus* podem ser encontrados em Monteiro (1984) que trabalhou com *A. nidulans* comparando a produção dos diplóides e dos haplóides em meio mínimo + 3% de glicose. Foi constatado nesse trabalho que o conteúdo total da produção lipídica do diplóide se apresentava em limites intermediários entre a produção mínima e máxima dos haplóides.

Com relação à produção de lipídios, Baracho (1985) procurou analisar mutantes auxotróficos e diplóides de *Aspergillus niger* e *A. flavus*, comparando-os com as linhagens originais. Os mutantes de *A. niger* foram obtidos por Bonatelli Jr. (1981), a partir da linhagem 10v10, linhagem de alta produção de ácido cítrico, em cultura de superfície. Já os mutantes de *A. flavus* foram obtidos por Messias (1979), a partir de dois isolados, o isolado A a e o isolado A e.



A produção de lipídios totais dos mutantes, dos diplóides e das linhagens originais, foram analisadas estatisticamente e constatou-se diferenças significativas entre tratamentos, tanto para *A. flavus* como para *A. niger*. No caso de *A. niger* constatou-se que os mutantes *pur* e *pur qly* (oliva) tiveram produção mais alta que o diplóide que deles se originou. Os diplóides não diferiram da linhagem 10v10, que deu origem aos mutantes. Algumas reversões espontâneas dos mutantes *pur* e *pur qly* também foram analisadas, e apresentaram produções semelhantes à da linhagem 10v10.

No caso de *A. flavus*, o diplóide $A \frac{a}{5} \frac{acg}{6} W // A \frac{e}{6}$, *pro paba* foi superior às linhagens originais e aos mutantes que lhe deram origem.

Portanto, as alterações genéticas podem ter efeito na qualidade e na quantidade de produção de lipídios e há uma indicação em *A. niger*, segundo Baracho (1985), de que a mutação para deficiência em purinas pode contribuir para aumentar a produção de lipídios.

Além da análise de linhagens mutantes e de diplóides, podemos recorrer à análise de segregantes, e através do ciclo sexual e parassexual efetuar a análise genética e o melhoramento de fungos. Com referência à produção de lipídios, isso resta como uma possibilidade a ser explorada.

2.2. Meio de cultura e produção de lipídios em *Aspergillus nidulans*

O conteúdo lipídico e a composição de ácidos graxos de vários microrganismos têm sido investigados por vários pesquisadores. Uma completa revisão foi feita por Woodbine (1959) até 1950 e revisões mais recentes podem ser encontradas em Weete (1980), Thomazini (1981), Ratledge (1982), Monteiro (1984) e Baracho (1985).

Leveduras e fungos são os microrganismos mais extensamente estudados por suas capacidades de produzirem lipídios em condições de laboratório. Os principais fungos capazes de produzirem uma alta quantidade de lipídio são as espécies de *Claviceps*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* e *Phycomyces* (Woodbine, 1959).

Segundo Ratledge (1978) a maioria dos fungos filamentosos crescem menos que as leveduras, mas, em compensação, podem produzir óleo com altas concentrações de ácidos graxos polinsaturados.

Além da escolha do microrganismo apropriado que possua potencial de acumulação lipídica, são necessários também certas condições de cultura para se conseguir uma alta produção lipídica. Essas condições, são entre outras, suplemento necessário de carboidrato, oxigênio, açúcar e nitrogênio, inóculos de cultura jovens, pH e temperatura adequados e tipo de superfície.

Garrido e Walker (1953 b) estudaram o comportamento de *A. nidulans*, quando crescidos em frascos, e verificaram que a



atividade bioquímica dos fungos crescidos em superfície é influenciada por fatores físicos em consequência do tipo de vidro para o cultivo, em particular, por uma média de área de superfície / volume.

Quanto a fonte de carbono, muitos investigadores observaram que carboidratos são tidos como os melhores substratos de carbono para fungos e que esses convertem de 15 a 18 % de açúcar em lipídios (Wassef, 1977). A glicose é o açúcar mais usado sendo facilmente convertido em lipídios pela maioria dos fungos. A capacidade para converter açúcares em gorduras é variável em cada espécie de fungo, porém os melhores carboidratos encontrados para a produção de lipídio pela maioria dos fungos são, em ordem decrescente: glicose, sacarose e frutose (Wassef, 1977).

Gad e Walker (1954) estudaram a formação de lipídios utilizando como fonte carbônica a sacarose nos fungos *Aspergillus nidulans*, *Penicillium javanicum* e *P. spinulosum*. Garrido e Walker (1956) utilizaram as seguintes diferentes fontes de carbono: glicose, arabinose, xilose, ribose, galactose, maltose, lactose, inulina e amido, e compararam a eficiência da produção lipídica, concluindo que a xilose era a melhor fonte de carbono depois da glicose. Nesse trabalho também foram estudadas seis fontes de nitrogênio, dentre essas, o nitrato de amônio e o nitrato de sódio mostraram-se com os melhores resultados depois de 6 a 8 dias de crescimento a 25 graus centígrados.

Outro efeito de cultura envolvendo fonte de carbono é a média da relação entre carbono e nitrogênio, no meio de cultura.

Prill et alii (1935) verificaram que reduzindo-se à metade a quantidade de glicose e mantendo-se as concentrações de nitrogênio, os lipídios de leveduras e de *A. nidulans* eram mais baixos. Mantendo-se a média de C:N, mas aumentando-se a concentração de glicose de 10 para 20% a conversão de açúcar em lipídio diminuía. Eles concluíram que uma relação média alta de C:N favoreceria a produção de proteínas e uma relação média baixa de C:N favoreceria a produção de lipídios.

Um estudo mais detalhado foi feito por Gregory e Woodbine (1953) em *A. nidulans*, *Penicillium spinulosum* e *P. javanicum* em que se inclui a variação de pH, temperatura, período de incubação e concentrações de nitrogênio e açúcar.

O efeito da concentração de sacarose (10 - 40 %) foi reportado por Singh e Datt (1957) onde a concentração ótima de açúcares para o máximo de rendimentos de massa micelial e formação lipídica foi de 20 % e a produção de lipídios nesta concentração exibiu o mais alto grau de saturação. A menor quantia de gordura é formada com 40% de açúcar. Nessas condições a gordura contém a menor proporção de ácidos saturados nos quais a quantidade de oleico e linoleico são mais altas que em concentrações mais baixas de açúcar.

Kolesnikova e Tolstikova (1984) estudando o efeito de diferentes fontes de carbono na composição lipídica de *Aspergillus* verificaram a predominância dos ácidos linoleico e linolênico.



Assim como o carbono, os diversos minerais suplementados no meio podem influenciar na composição lipídica. Garrido et alii (1953), trabalhando com *A. nidulans*, *P. spinulosum* e *P. javanicum* conseguiram observar que a formação de lipídios em fungos poderia ser aumentada por ajustes nas quantidades e proporções de sódio, potássio, magnésio, sulfato e ions de fosfatos. Em um meio contendo (por 100 ml) 500 mg de sulfato de magnésio para todos os 3 fungos, 155 mg de fósforo e 10 mg de potássio para *A. nidulans* 15 mg de fósforo e 195 mg de potássio para *P. javanicum* e 7 mg de fósforo e 195 mg de potássio para *P. spinulosum*; os conteúdos lipídicos foram respectivamente 50%, 24% e 25%.

A influência de nutrientes inorgânicos na produção lipídica de fungos foi revista por Woodbine (1959). Fosfatos e Cloreto de sódio influenciaram fortemente na acumulação lipídica de leveduras, porém o cálcio, sódio e ferro não apresentaram qualquer efeito (Wassef, 1977).

O *A. nidulans* também mostrou-se capaz de crescimento em meio com alta concentração salina (como resíduos agro-industriais), quando cultivado sem agitação, mas em culturas submersas foram obtidos melhores rendimentos com baixas concentrações de sal (Garrido e Walker, 1953 a).

Garrido et alii (1958) determinaram concentrações ótimas de fosfatos dihidrogenado de sódio, sulfato de magnésio e sulfato de potássio, em culturas agitadas. Sob essas condições, os mais altos índices de lipídio (g/l) das culturas foram: *A. nidulans*, 8,9; *P. javanicum*, 3,7 e *P. spinulosum*, 9,1.



Garrido e Walker (1958) comparando métodos de cultura em *A. nidulans*, *P. javanicum* e *P. spinulosum* atribuíram os valores mais baixos de acumulação lipídica ao fato de haver uma tendência dos micélios em crescimento aderirem à parede do fermentador, formando densa camada de agregados os quais recebem menos oxigênio, com conseqüente diminuição da produção.

Ribeiro dos Santos e Baracho (1984) estudando alguns fatores ambientais que poderiam influenciar na produção de lipídios em *Aspegillus oryzaes* verificaram que não houve diferença significativa na produção de lipídios a 28 graus centígrados e a 37 graus centígrados, em MM e MC. As concentrações de glicose utilizadas, embora interferissem no desenvolvimento do fungo, não aumentaram a porcentagem de lipídios. Porém, em relação ao crescimento de micélio, a análise revelou diferença significativa entre o peso seco obtido, à concentração de 1 % e demais concentrações no meio completo, enquanto no meio mínimo as concentrações de 1% diferiram das demais.

Outro trabalho utilizando-se diferentes meios de cultura e verificando-se seus efeitos foi feito por Monteiro e Marcus (1986). Eles utilizaram meio mínimo modificado (MMM, C:N 291) e meio mínimo N e S (C:N 69) para o crescimento de *A. nidulans*. Verificaram que para MMM houve uma produção de 22,5% de lipídios totais comparados com 6,8% no meio N e S porém, a composição do meio não teve efeito na composição lipídica a qual consistiu em 75% de lipídios neutros e 17% de fosfolipídios e 8% de glicolipídios.

Com poucas exceções, o mais pronunciado efeito da temperatura na composição lipídica de fungos é na relação saturado / insaturado. Observa-se que quanto mais baixa a temperatura mais aumenta a quantidade de ácidos graxos insaturados. Esse fenômeno tem sido interpretado como um efeito ecológico. O acréscimo de ácidos insaturados altera as propriedades físicas do lipídio, resultando em uma resposta fisiológica adaptativa que facilita a sobrevivência do organismo naquela temperatura (Wassef, 1977).

Porém Singh e Walker (1956 c) encontraram em *A. nidulans*, que a síntese lipídica a 17 graus centígrados continha mais insaturação que a 25 graus centígrados, mas insaturação maior foi observada a 30 graus centígrados do que a 25, de modo que uma simples relação entre temperatura de crescimento e graus de insaturação não pode ser constatada.

Normalmente os meios de cultura já possuem um valor de pH ótimo para o crescimento de fungos, portanto, alteração nesse pH pode ter alguma influência na composição lipídica. Um estudo mais detalhado sobre essa influência na composição lipídica de *A. nidulans* foi feito por Singh e Walker (1956 b). Eles verificaram que o valor iódico dos ácidos graxos aumentam com o pH do meio, devido ao aumento do ácido oleico com correspondente decréscimo na quantia de ácidos saturados.

Singh e Walker (1956 a) verificaram que poderiam ocorrer trocas na composição lipídica deste fungo de acordo com a idade da cultura. Eles também estimaram o valor da acidificação, equivalente de saponificação, valor da iodinação e substâncias insaponificáveis.

A maioria dos fungos requer vitaminas para o crescimento e reprodução. A relação entre produção de lipídios e adição de vitaminas não está ainda estabelecida, mas geralmente deficiências de vitaminas causam redução no conteúdo lipídico, por exemplo, a deficiência de biotina no meio causa acúmulo do ácido palmítico e redução do ácido esteárico (Wassef,1977).

2.3. Lipídios em fungos

Ácidos graxos são produzidos por todos os organismos vivos e potencialmente representam a mais abundante classe de lipídios na natureza. Entretanto, ácidos graxos livres não ocorrem naturalmente, mas são principalmente esterificados como constituintes do acilglicerídeo (tri, di- e monoglicerídeo), fosfolipídios, glicolipídios e ésteres de esteróis.

Os lipídios de microrganismos procariotos tem um grande número de variedade de ácidos graxos, muitos dos quais são incomuns ou desconhecidos nos fungos e em outros eucariotos (O'Leary, 1967). Sob este aspecto a maior diferença entre procariotos e fungos filamentosos e outros eucariotos, está no fato de que bactérias e outras células procariotas não sintetizam ácidos graxos polinsaturados (polinóicos), exceto algumas algas azuis e verdes, ao passo que esses ácidos se encontram em todas as células eucariotas (Shaw, 1966).

A maioria dos ácidos graxos dos organismos eucariotos contém até um certo número de átomos de carbono em cadeias contínuas com um grupo terminal carboxil e pode estar completamente saturado ou contendo uma ou mais (até seis) duplas ligações as quais geralmente têm cis-configurações.

Os ácidos graxos saturados mais encontrados em eucariotos são: mirístico (14 : 0), palmítico (16 : 0) e esteárico (18 : 0) e os insaturados, oleico (18 : 1) e linoleico (18 : 3).

A composição de ácidos graxos de fungos e leveduras em geral se apresenta como a seguir: palmítico é o ácido graxo saturado predominante e oleico e linoleico são os insaturados predominantes. A proporção de linoleico é mais alta em fungos do que em leveduras, as quais geralmente possuem oleico como sendo a maioria dos ácidos insaturados (Whitworth e Ratledge, 1974).

Estudos da formação de lipídios em *A. nidulans* foram iniciados com o trabalho de Woodbine *et alii* (1951), que estudaram o potencial gorduroso de 43 linhagens de fungos representado por 10 gêneros, todas as linhagens tiveram como fonte de carbono a glicose. Eles obtiveram 5 diferentes médias de acumulação lipídica.

Prill *et alii* (1935) encontraram bons resultados de acumulação em *A. nidulans* (25% p/p), *A. flavipes* (40% p/p) e *Fusarium lini* (35% p/p).

Em condições experimentais semelhantes, Murray *et alii* (1953) examinaram o comportamento de 43 linhagens, todas com sacarose como fonte de carbono, e obtiveram 4 diferentes médias de acumulação lipídica onde o mais alto conteúdo lipídico foi de 35% em *Penicillium seppi*, 28% em *F. lini* e 26% em *A. nidulans*.

Segundo Monteiro (1984) a formação média de gordura em cultura de superfície é lenta durante a primeira semana de incubação, mas transforma-se muito rapidamente no oitavo ou nono dia, quando o máximo desenvolvimento do fungo é alcançado. Depois do nono dia a reserva lipídica do fungo decresce em peso. Nos primeiros estágios da síntese, a gordura é mais ácida e contém grande porcentagem de substâncias insaponificáveis. Os componentes ácidos, saturados e insaturados, continuam aumentando



até atingirem a fase estacionária da cultura, mas na fase subsequente o peso de cada componente diminui.

A composição dos ácidos graxos dos lipídios de *A. nidulans* estudada por Singh et alii (1955) usando a técnica de baixa temperatura de cristalização para a análise, foi na seguinte porcentagem: mirístico = 0,7 ; palmítico = 20,9 ; palmitoleico = 1,3 ; esteárico = 15,9 ; oleico = 40,3 ; linoleico = 17,0 ; linolênico = 0,2 ; eicosapoliênico = 3,8.

Lipídios extraídos de organismos vivos, são normalmente, complexas misturas de esteres de alto peso molecular. Essas misturas podem ser separadas dentro de frações lipídicas neutras ou polares. Lipídios neutros comuns são os triglicerídios, esteróides e esteres de esteróides. Lipídios polares predominantes são os fosfolipídios e glicolipídios. A proporção de cada fração depende do organismo e das condições de cultura.

Usualmente a mais abundante classe de lipídios extraídos de fungos é a de triglicerídios. As propriedades dos triglicerídios são governadas principalmente pelos constituintes dos ácidos graxos, mas, também, em parte pelas três posições diferentes que ocupam os ácidos graxos na molécula de glicerol. Triglicerídios vegetais tendem a ter poucos ácidos graxos saturados na posição 2, o que não ocorre com triglicerídios animais (Ratledge, 1982).

Comercialmente os triglicerídios são usados em manufaturas de margarinas, óleos para saladas e cozimento, tendo suas qualidades muito dependentes da composição e distribuição dos ácidos graxos.

Mono e diglicerídeos raramente são encontrados em plantas e tecidos animais, onde 1,2-diglicerídeos tem importância particular como precursores de triglicerídeos e outros complexos lipídicos (Christie, 1982).

Esteróis estão presentes na maioria dos microrganismos eucariotos exceto em condições anaeróbicas quando, em princípio, os esteróis não podem ser biossintetizados, uma vez que a introdução do grupo 3 - hidroxil é uma reação que requer oxigênio (Nes, 1977).

O ergosterol compõe a maioria dos esteróis de fungos e leveduras, vindo frequentemente acompanhado de alguns outros esteróis em baixas proporções.

Os esteróis que ocorrem em fungos e suas funções foram objeto de estudo para Brennan et alii (1974), Elliot (1977) e Weete (1980).

Esteróis são importantes na arquitetura das membranas podendo também regular a permeabilidade através da viscosidade interna e movimentação molecular dos lipídios daquela membrana. Sensibilidade para antibióticos poliênicos tem sido relatada em membranas contendo esterol. Eles são também requeridos por alguns fungos para a reprodução sexual e podem estimular o crescimento em culturas aeradas. Alguns fungos requerem esteróis para uma atividade ótima de certas enzimas como as ATPases (Weete, 1980).

O conteúdo esterol de alguns microrganismos é altamente sensível a concentrações de açúcar e carbono usados. Em geral alto conteúdo de ergosterol está associado a condições admitidas de crescimento ou à condições de "stress", como temperaturas muito baixas ou muito altas, exposição a fungicidas



ou outras substâncias tóxicas.

A importância do potencial comercial dos esteróides é exemplificada pela utilização do ergosterol na indústria farmacêutica como precursor de outros esteróides economicamente importantes (Brennan et alii, 1974).

Outros esteres de esterol são amplamente distribuídos na natureza e também ocorrem em fungos, onde há pouco conhecimento sobre suas funções e localização na célula.

Parece possível que os esteres de esterol sirvam como reserva de esterol para a síntese de algumas membranas e são estocados em pequenas vesículas de baixa densidade (Elliot, 1977; Rose, 1981).

A composição de ácidos graxos e esteres de esterol de fungos apresentam cadeias de 14 a 18 carbonos, esterificados primariamente para ergosterol (Wassef, 1977).

Mais recentemente, o ergosterol, foi identificado como a maior parte de esterol livre de *A. nidulans* por Shapiro e Gealt (1982).

Outros componentes lipídicos, considerados abundantes em fungos, são os fosfolipídios e os glicolipídios e geralmente estão associados às membranas.

Em geral, a maioria dos fosfolipídios encontrados em fungos são: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) com fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG) e cardiolipina (CL).

As funções dos fosfolipídios estão principalmente associadas com a membrana, tendo uma forte influência nas atividades celulares através do controle de permeabilidade da membrana e das



atividades enzimáticas ligadas a esta membrana. Muitos desses sistemas têm sido estudados em mamíferos; entretanto, há alguns exemplos desse tipo de interação em fungos. Por exemplo, sabe-se que CL está associado especificamente com mitocôndrias em leveduras e em *A. niger*, como em outros eucariotos. PE está associado a absorção da lisina em *Neurospora crassa*. PI parece estar particularmente envolvido com o transporte de fosfato e arsenato, e transporte de prótons e outros cátions através de membranas de leveduras (revisão por Brennan e Liosel, 1978).

Craig e Peberdy (1983) estudaram efeitos de fungicidas em *A. nidulans* e verificaram que esses fungicidas influenciaram na qualidade dos esteróis e fosfolipídios, porém, não interferiram na quantidade de acumulação lipídica.

Glicolipídios são complexos lipídicos que não têm sido muito estudados em fungos, e é relativamente pequeno o conhecimento sobre sua ocorrência nesses organismos (Weete, 1980). Porém glicolipídios baseados em glicerol têm sido encontrados. Os principais componente de gliceroglicolipídios de plantas são o mono e digalactosildiacylglicerol. Um grande número de glicosildiacylglicerol tem sido isolado em algumas espécies de bactérias. A ocorrência desse complexo grupo de lipídio, em fungos foi revisado por Weete (1980).

É pouco o conhecimento sobre a função dos glicolipídios fúngicos. Alguns podem servir como reservas de ácidos graxos, outros aparecem como reservas endógenas nos esporos e seu metabolismo parece ser dependente da dormência reprodutiva dos esporos (Brennan et alii, 1974).

A acumulação lipídica pode, portanto, apresentar-se de uma forma variada, tanto qualitativamente como quantitativamente, em diferentes microrganismos. Essa variação pode estar na dependência de fatores ambientais (revisados no item 2.2.), como também pode estar na dependência de fatores genéticos, que segundo Ratledge (1982), observa-se quando a capacidade para acumulação lipídica, por determinada linhagem, é perdida, mesmo em condições estáveis ou quando há uma considerável variação lipídica, entre isolados diferentes de uma mesma espécie, sob condições idênticas.

3. MATERIAL e MÉTODOS

Foram utilizadas linhagens mutantes de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter que são referidas a seguir. A origem e descrição dos mutantes podem ser encontrados em Clutterbuck (1974). Os grupos de ligação e a localização dos marcadores genéticos estão representados na Figura 1.

3.1. Linhagens utilizadas

a. Linhagem MSE ("Master Strain E"): possui um marcador genético em cada um dos oito grupos de ligação (McCully & Forbes, 1965).

b. Linhagem $bi A$; $meth G$: possui o marcador genético $bi A$ no grupo de ligação I e $meth G$ no grupo de ligação IV.

c. Linhagem $prQ A$; $eaba A$; $y A$: possui os marcadores genéticos $prQ A$; $eaba A$; $y A$ no grupo de ligação I.

As linhagens foram obtidas da coleção existente no laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Biologia da UNICAMP. Foram mantidas em tubos de meio completo inclinado à cerca de 4 graus centígrados.

Os símbolos usados para indicarem as respectivas deficiências nutricionais das linhagens são:

Símbolos	Fenótipos (deficiência)
ad	adenina
bi	biotina
meth	metionina
nic	ácido nicotínico
paba	ácido p-aminobenzóico
pro	prolina
pur	purinas
pyro	piridoxina
ribo	riboflavina
s	tiosulfato

Símbolos utilizados para indicarem cor dos confídios.

Símbolo	Fenótipo
w	branco
y	amarelo

Os seguintes símbolos indicam:

fac - não crescimento em meio de acetato como fonte de carbono.

gal - não crescimento em meio de galactose como fonte de carbono.

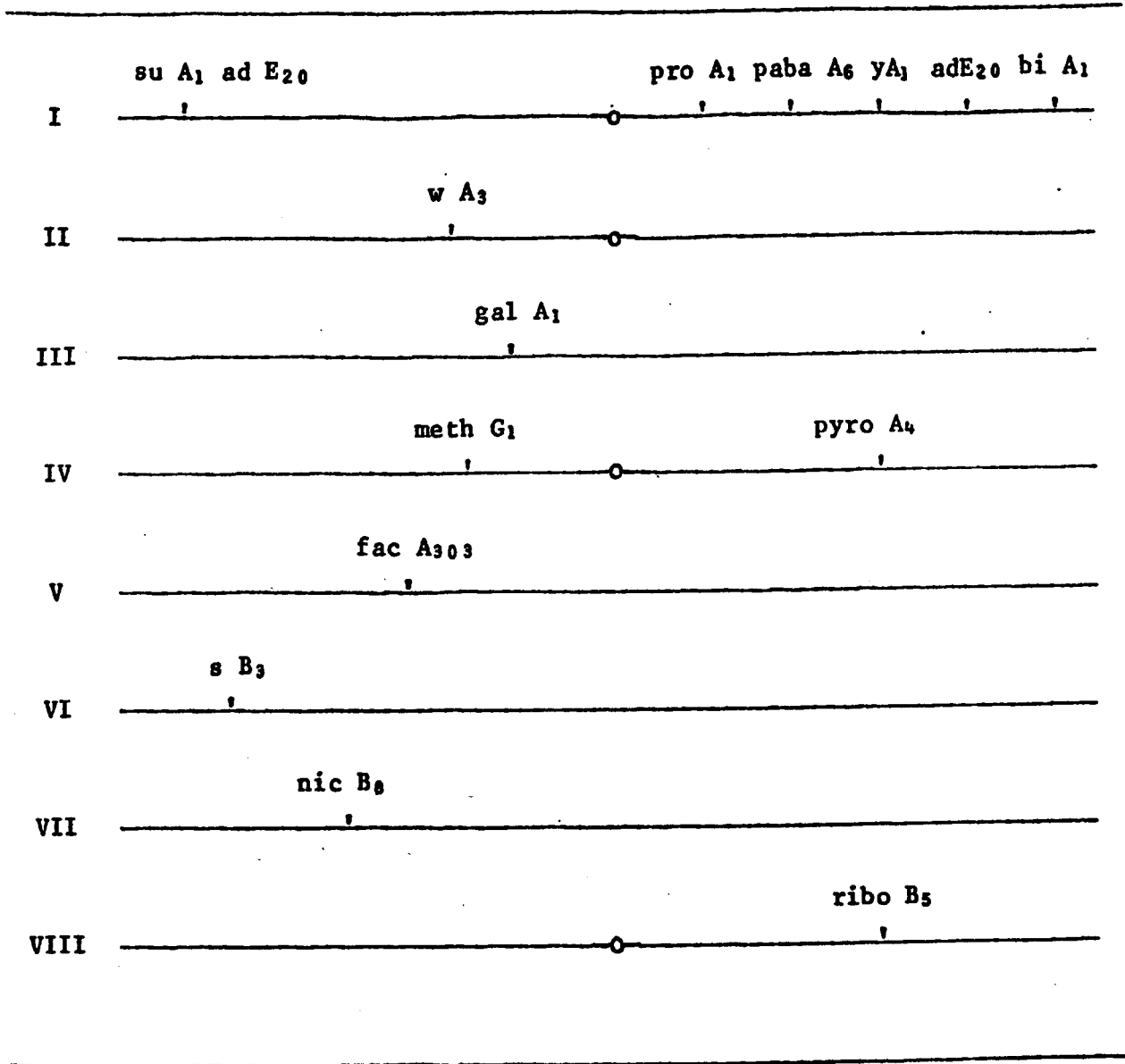


FIGURA 1. Grupos de ligação e localização dos marcadores genéticos, das linhagens de *A. nidulans* utilizadas. As distâncias dos marcadores não estão em escala no mapa. 0 = centrômero.

3.2. Meios de Cultura

3.2.1. Meio mínimo (Pontecorvo et alii., 1953) (MM)

Nitrato de sódio.....6,00 gramas
Sulfato de magnésio heptahidratado.....0,52 gramas
Cloreto de potássio.....0,52 gramas
Fosfato dihidrogenado de potássio.....1,52 gramas
Sulfato de ferro.....traços
Sulfato de zinco.....traços
Dextrose.....10,00 gramas
Água.....1000 ml

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

3.2.2. Meio Completo (Azevedo e Costa, 1973) (MC)

Foi adicionado ao meio mínimo:

Peptona.....2,00 gramas
Caseína hidrolisada.....1,50 gramas
Extrato de levedura.....0,50 gramas
Hidrolizado de ácido nucleico de
leveduras.....2,5 ml
Solução de vitaminas.....1,0 ml

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

3.2.3. Meio de Galactose

Galactose.....10,0 gramas
MM líquido sem dextrose.....1000 ml
Ágar.....20,0 gramas

3.2.4. Meio de Acetato de Amônia (Apirion, 1962)

Acetato de amônia.....12,0 gramas
Cloreto de sódio..... 2,0 gramas
Sulfato de magnésio heptahidratado.... 0,5 gramas
Fosfato dihidrogenado de potássio..... 3,0 gramas
Sulfato de ferro.....traços
Sulfato de zinco.....traços
Água.....1000 ml

O pH foi ajustado para 6,1 com NaOH 4% ou HCl 1N.

3.2.5. Meio mínimo líquido + 2% meio completo

Foi adicionado 2% de meio completo líquido ao meio mínimo líquido. A mistura foi distribuída em tubos (2,5 ml em cada tubo) sendo posteriormente autoclavados e mantidos no escuro.

3.2.6. Meio sólido

Foi adicionado ,ágar em pó, na concentração final de 1,5% para fazer o meio sólido.

3.3 Soluções

3.3.1. Hidrolizado de ácido nucleico de leveduras

Ácido nucleico de levedura.....2 gramas em
15 ml de solução normal de HCl.

Ácido nucleico de levedura.....2 gramas em
15 ml de solução normal de NaOH.

As soluções foram aquecidas por 20 minutos em banho-maria, misturadas e o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 4% ou HCl 1N. A solução foi filtrada, o volume completado para 40 ml e a seguir, guardada em vidro escuro, com clorofórmio como conservante , a 5 graus centígrados.

3.3.2. Solução de cloroneb

1,4 dicloro 2,5 dimetoxil benzeno.....1000 mg
Água destilada..... 50 ml

3.3.3. Solução salina

Foi preparada uma solução de NaCl 0,85% com água destilada. Amostras contendo 9 ml da solução foram distribuídos em frascos. A esterilização destes foi feita em autoclave, sendo posteriormente mantidos à temperatura ambiente.

3.3.4. Solução de "Tween"

Foi adicionado "tween" 80 à água destilada em uma concentração de 0,1% (v/v). Cerca de 2,5 ml da solução foram colocados em tubos e esses sendo em seguida, autoclavados e mantidos à temperatura ambiente.

3.3.5. Solução de vitaminas

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

A solução foi colocada em frasco escuro e esterilizada em banho-maria a 60 graus centígrados por 30 minutos, durante 3 dias consecutivos. A conservação foi feita em refrigerador sobre clorofórmio.



3.3.6. Substâncias adicionadas ao meio mínimo

Substância	Concentração final (micrograma/ml)
Ácido nicotínico.....	0,25
Ácido aminobenzóico.....	0,25
Biotina.....	0,10
Metionina.....	50,00
Piridoxina.....	0,25
Prolina.....	30,00
Riboflavina.....	0,50
Tiosulfato.....	100,00

3.4. Esterilização

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave à pressão de 1 atmosfera durante 15 minutos e mantidos à temperatura ambiente, no escuro.

3.5. Análise de lipídios.

3.5.1. Determinação da qualidade dos lipídios por cromatografia gasosa.

Para a obtenção do micélio, as linhagens de *A. nidulans* se desenvolveram em meio líquido (meio completo e meio mínimo suplementado, para os haplóides; meio mínimo, para os diplóides e meio suplementado, para os segregantes) durante 5 dias em estufa regulada para 37 graus centígrados. O micélio obtido foi filtrado em funil de Buchner e lavado em água esterilizada sendo posteriormente macerado em almofariz com N₂ (líquido) e colocado em um "Thimble". A extração foi feita em Extrator Soxhlet "overnight" com a mistura clorofórmio/metanol 2:1 (v/v); em seguida o clorofórmio/metanol foi evaporado com N₂ (gasoso) e o resíduo considerado como os lipídios totais.

Os lipídios obtidos foram saponificados com solução de KOH/metanol 0,5N em refluxo durante 5 minutos. Em seguida foi acidificado com solução de HCl 6N e esterificado em refluxo com mistura de esterificação (600 ml metanol, 20 g de NH₄Cl e 30 ml de H₂SO₄; colocar em refluxo até dissolução do sal).

Os ácidos graxos esterificados obtidos de micélio foram transferidos para um funil de separação onde foi adicionado Hexano, sendo então, o funil, agitado vigorosamente. Houve a formação de 2 fases, a mais densa foi transferida para um segundo funil de separação onde se adicionou o Hexano e agitou-se fortemente; a fase do Hexano obtida foi transferida para o funil de separação, utilizado inicialmente, onde lavou-se a mistura em



água destilada.

Os ácidos graxos metil ésteres obtidos em solução de Hexano foram filtrados em funil contendo Na₂SO₄ anidro.

Para a identificação dos ácidos graxos foi utilizado um cromatógrafo CG modelo 37-D de ionização de chama, com coluna de vidro medindo 153,4 cm x 3,2 mm de diâmetro interno com suporte de Cromossorb WHP 100/120 mesh, revestido com 12% de Dietileno Glicol Succinato (DEGS). As condições de operação foram: temperatura de vaporizador: 182 graus centígrados, gás de arraste mantido a 25 ml por minuto, temperatura da coluna 182 graus centígrados e temperatura do detector 285 graus centígrados. As identificações foram baseadas nos tempos de retenção, e a relativa porcentagem dos ácidos graxos foram determinadas pelas áreas dos picos dos cromatogramas.

3.6. Técnica Geral

As linhagens foram analisadas quanto à produção de lipídios pela técnica já descrita. A seguir essas linhagens foram cruzadas e a partir desses cruzamentos foram obtidos heterocários; e desses, os diplóides que também foram analisados quanto à produção qualitativa e quantitativa de lipídios.

3.6.1. Obtenção de Heterocário

Para obtenção de heterocários procedeu-se de acordo com a técnica descrita por Pontecorvo et alii (1953).

Os conídios de duas linhagens com marcadores genéticos diferentes foram colocados em 2,5 ml de meio mínimo líquido + 2% meio completo (Ítem 3.2.5.).

Este meio completo favorece um pequeno crescimento para que possa ocorrer anastomose das hifas. A suspensão foi incubada durante 4-6 dias após a qual a massa micelial formada na superfície do meio de cultura foi removida, cortada e transferida para placas com meio mínimo.

3.6.2. Isolamento de Diplóides

Os diplóides heterozigotos foram obtidos usando-se a técnica de ROPER (1952). Cerca de 10⁶ conídios de um heterocário balanceado foram semeados em meio mínimo. Os conídios haplóides não se desenvolvem neste meio, entretanto, com a fusão de núcleos haplóides há a formação de núcleos diplóides heterozigotos que originam os conídios capazes de crescer em meio mínimo. As colônias diplóides isoladas foram purificadas e mantidas em meio mínimo inclinado.

Por convenção os componentes de um núcleo diplóide foram separados pelo sinal //.

3.6.3. Análise Mitótica

Procedeu-se a haploidização dos diplóides usando-se cloroneb (SANT`ANA, 1974), na concentração de 15 microgramas/ml.

Os conídios diplóides foram inoculados em quatro pontos equidistantes em placas com meio completo mais a droga. Após sete dias de incubação os setores haplóides produzidos foram isolados por estrias em meio completo.

A segregação somática induzida envolve segregação de cromossomos inteiros de forma que todos os marcadores genéticos de um grupo de ligação segregam como uma unidade. Conseqüentemente, genes mutantes podem ser relacionados com um grupo de ligação em particular.

Os segregantes haplóides isolados foram classificados quanto aos fatores de crescimento e morfologia (cor dos conídios).

3.7. Medida dos diâmetros de conídios

Conídios em suspensão foram colocados em uma lâmina com uma gota de lisol 10% e observados ao microscópio óptico, sendo então medido o diâmetro de cadeias de 5 conídios, utilizando-se para isso uma ocular micrométrica.

4. RESULTADOS

4.1. Diplóides obtidos

Três diplóides heterozigotos foram isolados de acordo com o item 2.6.2. da combinação de três mutantes auxotróficos de *Aspergillus nidulans* (item 3.1). Os diâmetros dos conídios diplóides são mostrados na Tabela 1. Os resultados representam a média de 50 conídios de cada linhagem.

TABELA 1. Diâmetro dos conídios diplóides (média de 50 conídios) de *Aspergillus nidulans*.

Linhagens	Diâmetro (μm)
erg A ; eaba A ; u A // MSE 1 6 1	4,06
erg A ; eaba A ; u A // bi A ; meth G 1 6 1 1 1	3,924
MSE // bi A ; meth G 1 1	3,924

4.2. Setores obtidos.

De acordo com o item 2.6.3. foram isolados 9 setores do diplóide erg A ; eaba A ; u A // MSE. Os nove setores
1 6 1
apresentaram conídios de cor branca.



4.3. Análise de lipídios.

4.3.1. Análise qualitativa de lipídios das linhagens mutantes.

Os dados referentes a análise lipídica das linhagens $pro A$; $pa6A$; $y A$, MSE e $bi A$; $meth G$ em MC, obtidos de acordo com o item 2.5.1., estão expressos nos gráficos I, II e III respectivamente. No gráfico I relativo a linhagem $pro A$; $pa6A$; $y A$ em MC foram constatados oito picos de ácidos graxos, o mesmo ocorrendo nos gráficos II e III relativos as linhagens MSE em MC e $bi A$; $meth G$ em MC.

Os gráficos IV, V e VI referem-se a essas mesmas linhagens porém crescidas em MM suplementado. No gráfico IV referente a linhagem $pro A$; $pa6A$; $y A$ encontram-se 10 picos de ácidos graxos. No gráfico V referente a linhagem MSE encontram-se 8 picos de ácidos graxos e no cromatograma da linhagem $bi A$; $meth G$ encontram-se 9 picos de ácidos graxos.

Os dados referentes a diversidade dos ácidos graxos encontrados nas linhagens mutantes estão distribuídos da seguinte maneira: Na Tabela 2, ácidos graxos da linhagem $pro A$; $pa6A$; $y A$ em MC e MM suplementado; na Tabela 3, ácidos graxos da linhagem MSE em MC e MM suplementado; na Tabela 4, ácidos graxos da linhagem $bi A$; $meth G$ em MC e MM suplementado.

As principais diferenças das linhagens desenvolvidas em MC e MM suplementado são as seguintes:



a) Na Tabela 2 as diferenças encontradas são as seguintes:
 Os ácidos margárico, insaturação do margárico e eicosapoliénico só aparecem quando a linhagem é desenvolvida em MC. Já o ácido miristoleico só aparece em MM suplementado.

b) Na Tabela 3 verifica-se que os ácidos mirísticos e insaturação do margárico só ocorrem em MC enquanto que os ácidos miristoleico e palmitoleico só ocorrem nas linhagens desenvolvidas em MM suplementado.

c) Na Tabela 4 verifica-se que o ácido mirístico, insaturação do margárico e eicosapoliénico só aparecem quando a linhagem é desenvolvida em MC; já os ácidos miristoleico e palmitoleico só aparecem quando a linhagem é desenvolvida em MM suplementado.

A Tabela 5 refere-se a comparação da produção das linhagens haplóides estudadas em MM suplementado tendo como principais diferenças:

- a) O ácido mirístico encontra-se apenas na linhagem $\rho\alpha A_1$; $\rho\alpha\beta A_6$; γA_1 .
- b) O ácido margárico não é encontrado na linhagem $\rho\alpha A_1$; $\rho\alpha\beta A_6$; γA_1 .

A Tabela 6 refere-se a comparação da produção das linhagens estudadas em MC tendo como principais diferenças:

- a) O ácido palmitoleico só aparece na linhagem $\rho\alpha A_1$; $\rho\alpha\beta A_6$; γA_1 .
- b) O ácido eicosapoliénico não se verifica na linhagem MSE.



GRÁFICO I: ANÁLISE LIPÍDICA DA LINHAGEM
 pelo A ; para A ; y A em MC
 1 6 1



GRÁFICO II: ANÁLISE LIPÍDICA DA LINHAGEM MSE em MC

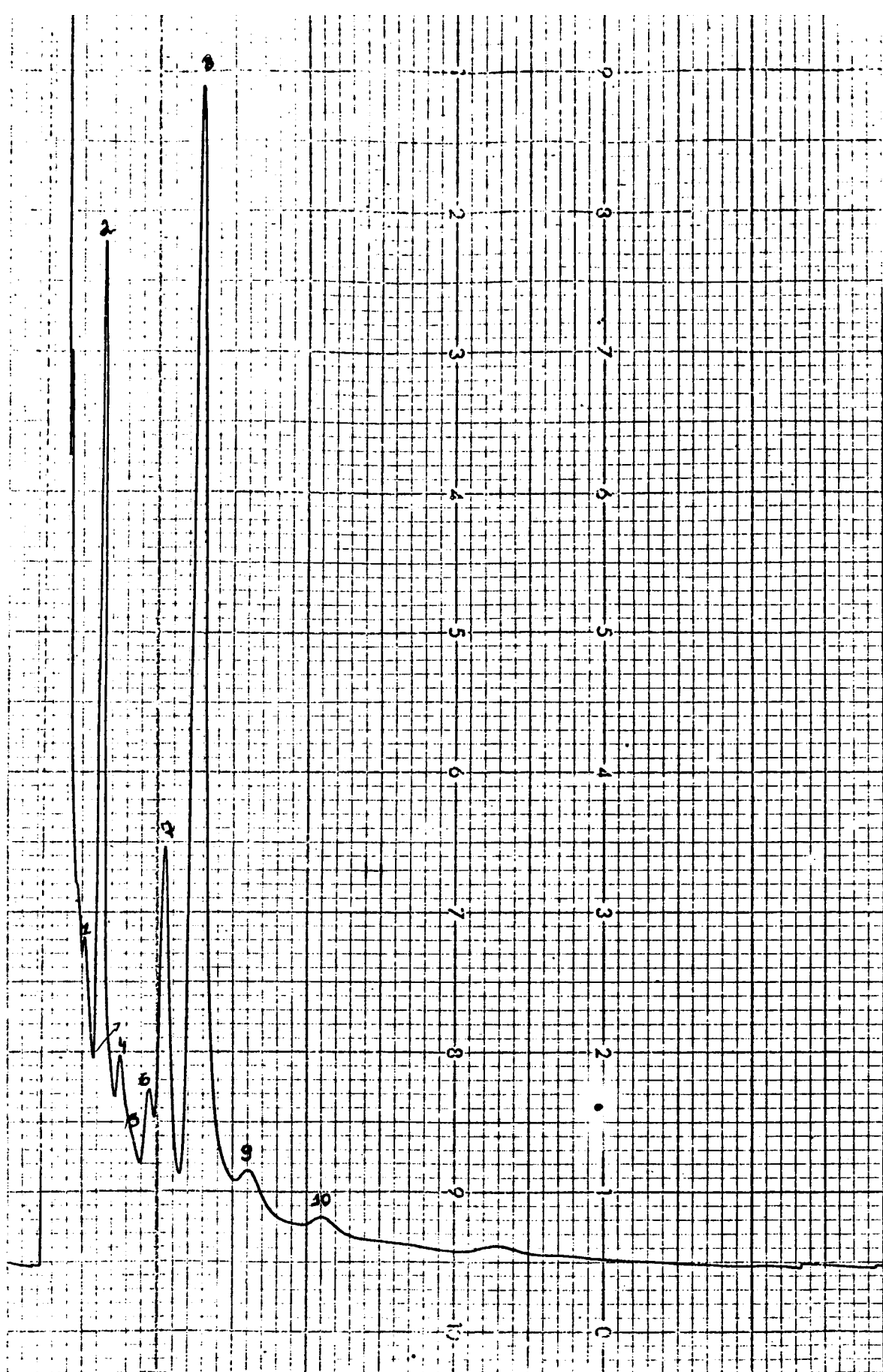


GRÁFICO III: ANÁLISE LIPÍDICA DA LINHAGEM BI A ; meth G em MC
 1 1

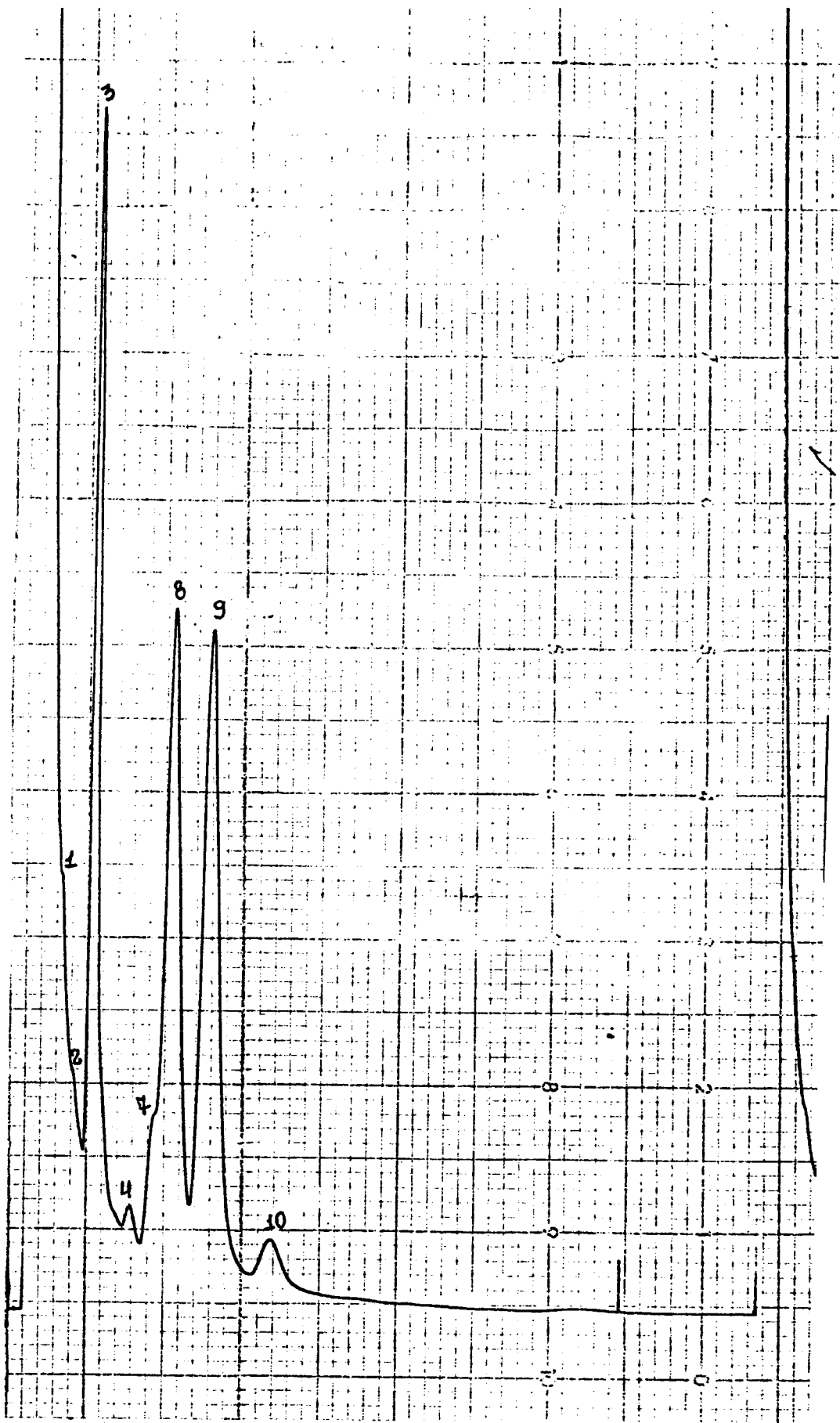


GRAFICO IV: ANÁLISE LIPÍDICA DA LINHAGEM
 BCO A ; paba A ; y A em MM suplementado
 1 6 1

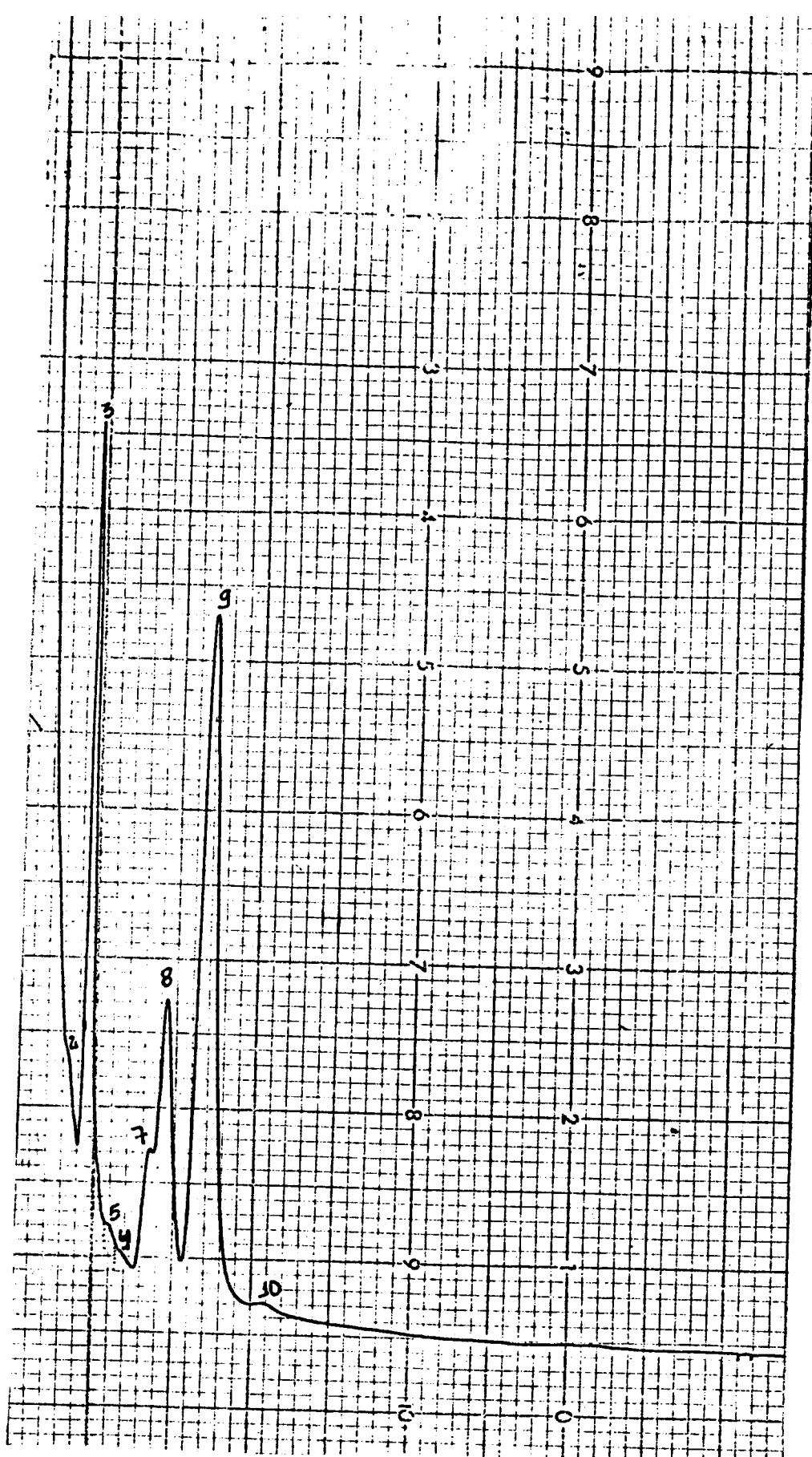


GRÁFICO V: ANÁLISE LIPÍDICA DA LINHAGEM MSE em MM SUPLEMENTADO

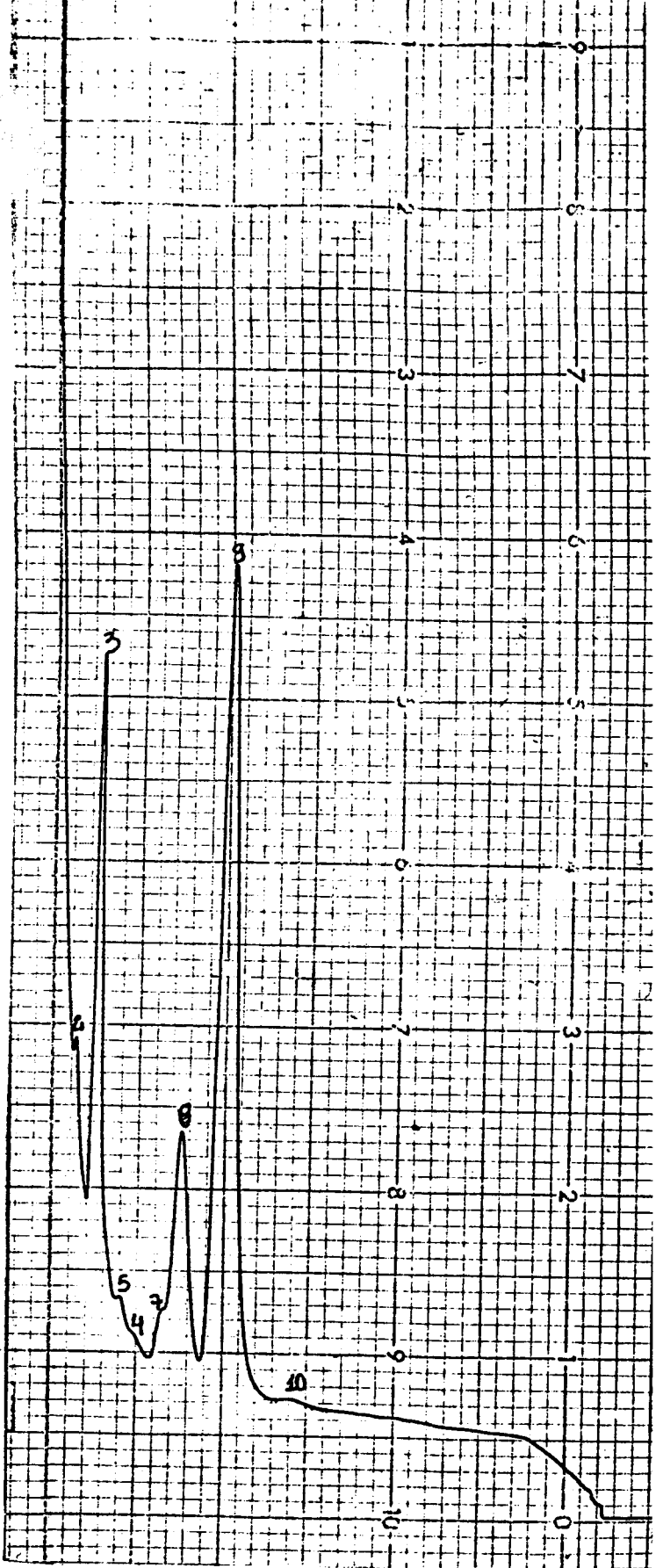


GRAFICO VI: ANÁLISE LIPÍDICA DA LINHAGEM
 bi A ; meth G em MM suplementado
 1 1

TABELA 2: ÁCIDO GRAXO PRODUZIDO PELA LINHAGEM prq A₁ ; paba A₆ ; γ A₁ em NC e MH SUPLEMENTADO.

PICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	<u>prq A₁</u> ; <u>paba A₆</u> ; <u>γ A₁</u> em NC	<u>prq A₁</u> ; <u>paba A₆</u> ; <u>γ A₁</u> em MH SUPLEMENTADO
PICO 1 C14:0	MIRÍSTICO	MIRÍSTICO
PICO 2 C14:1	-----	MIRISTOLEICO
PICO 3 C16:0	PALMÍTICO	PALMÍTICO
PICO 4 C16:4	PALMITOLEICO	PALMITOLEICO
PICO 5 C17:0	MARGÁRICO	-----
PICO 6 C17:1	INSATURACAO DO MARGÁRICO	-----
PICO 7 C18:0	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO
PICO 8 C18:1	OLEICO	OLEICO
PICO 9 C18:2	LINOLEICO	LINOLEICO
PICO 10 C18:3	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO
PICO 11 C20:2	EICOSAPOLIENÓICO	-----
PICO 12 C20:4	-----	-----

TABELA 3: ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS PELA LINHAGEM MSE EM MC E MH SUPLEMENTADO

PICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	MSE em MC	MSE em MH SUPLEMENTADO
PICO 1 C14:0	MIRÍSTICO	-----
PICO 2 C14:1	-----	MIRISTOLEICO
PICO 3 C16:0	PALMÍTICO	PALMÍTICO
PICO 4 C16:4	-----	PALMITOLEICO
PICO 5 C17:0	MARGÁRICO	MARGÁRICO
PICO 6 C17:1	INSATURACAO DO MARGÁRICO	-----
PICO 7 C18:0	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO
PICO 8 C18:1	OLEICO	OLEICO
PICO 9 C18:2	LINOLEICO	LINOLEICO
PICO 10 C18:3	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO
PICO 11 C20:2	-----	-----
PICO 12 C20:4	-----	-----

TABELA 4 : ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS PELA LINHAGEM bi A₁; meth G₁ em MC e MM SUPLEMENTADO.

PICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	<u>bi A₁</u> ; <u>meth G₁</u> em MC	<u>bi A₁</u> ; <u>meth G₁</u> em MM SUPLEMENTADO
PICO 1 C14:0	MIRÍSTICO	-----
PICO 2 C14:1	-----	MIRISTOLEICO
PICO 3 C16:0	PALMÍTICO	PALMÍTICO
PICO 4 C16:4	-----	PALMITOLEICO
PICO 5 C17:0	MARGÁRICO	MARGÁRICO
PICO 6 C17:1	INSATURACAO DO MARGÁRICO	-----
PICO 7 C18:0	ESTEARÍCO	ESTEARÍCO
PICO 8 C18:1	OLEICO	OLEICO
PICO 9 C18:2	LINOLEICO	LINOLEICO
PICO 10 C18:3	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO
PICO 11 C20:2	EICOSAPOLIENÓICO	-----
PICO 12 C20:4	-----	-----

TABELA 5: COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DAS LINHAGENS HAPLÓIDES ESTUDADAS EM MM SUPLEMENTADO.

PICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	$prp A_1; paba A_6; \underline{u} A_1$	MSE	$bi A_1; meth G_1$
PICO 1 C14:0	MIRÍSTICO	-----	-----
PICO 2 C14:1	MIRISTOLEICO	MIRISTOLEICO	MIRISTOLEICO
PICO 3 C16:0	PALMÍTICO	PALMÍTICO	PALMÍTICO
PICO 4 C16:4	PALMITOLEICO	PALMITOLEICO	PALMITOLEICO
PICO 5 C17:0	-----	MARGÁRICO	MARGÁRICO
PICO 6 C17:1	-----	-----	-----
PICO 7 C18:0	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO
PICO 8 C18:1	OLEICO	OLEICO	OLEICO
PICO 9 C18:2	LINOLEICO	LINOLEICO	LINOLEICO
PICO 10 C18:3	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO
PICO 11 C20:0	-----	-----	-----
PICO 12 C20:4	-----	-----	-----

TABELA 6: COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DAS 3 LINHAGENS HAPLÓIDES ESTUDADAS EM MC.

PICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	pro A ₁ ; paba A ₆ ; y A ₁	MSE	bj A ₁ ; meth G ₁
PICO 1 C14:0	MIRÍSTICO	MIRÍSTICO	MIRÍSTICO
PICO 2 C14:1	-----	-----	-----
PICO 3 C16:0	PALMÍTICO	PALMÍTICO	PALMÍTICO
PICO 4 C16:4	PALMITOLEICO	-----	-----
PICO 5 C17:0	MARGÁRICO	MARGÁRICO	MARGÁRICO
PICO 6 C17:1	INSATURACAO DO MARGÁRICO	INSATURACAO DO MARGÁRICO	INSATURACAO DO MARGÁRICO
PICO 7 C18:0	ESTEARÍCO	ESTARÍCO	ESTEARÍCO
PICO 8 C18:1	OLEICO	OLEICO	OLEICO
PICO 9 C18:2	LINOLEICO	LINOLEICO	LINOLEICO
PICO 10 C18:3	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO
PICO 11 C20:0	EICOSAPOLIENÓICO	-----	-----
PICO 12 C20:4	-----	-----	-----

4.3.2. Análise qualitativa de lipídios dos diplóides.

Os dados referentes a análise lipídica dos diplóides $pro A ;$
 $gaba A ; y A // bi A ; meth G$ estão expressos no gráfico VII¹
onde verificam-se 8 picos de ácidos graxos.

O gráfico VIII refere-se a análise lipídica do diplóide pro
 $A ; gaba A ; y A // MSE$, onde foram detectados 7 picos de ácidos¹
graxos.

No cromatograma do diplóide $bi A ; meth G // MSE$,¹
representado no gráfico IX, foram constatados 10 picos de ácidos¹
graxos.

Os dados referentes a diversidade dos ácidos graxos
encontrados nos diplóides se apresentam da seguinte maneira: A
Tabela 7 refere-se à produção dos diplóides estudados em MM e
apresentam as seguintes diferenças:

a) O ácido palmitoleico não se verifica no diplóide $pro A ;$ ¹
 $gaba A ; y A // MSE$.

b) O diplóide $MSE // bi A ; meth G$ é o único a apresentar¹
os ácidos eicosapoliênico; e aracdônico.¹

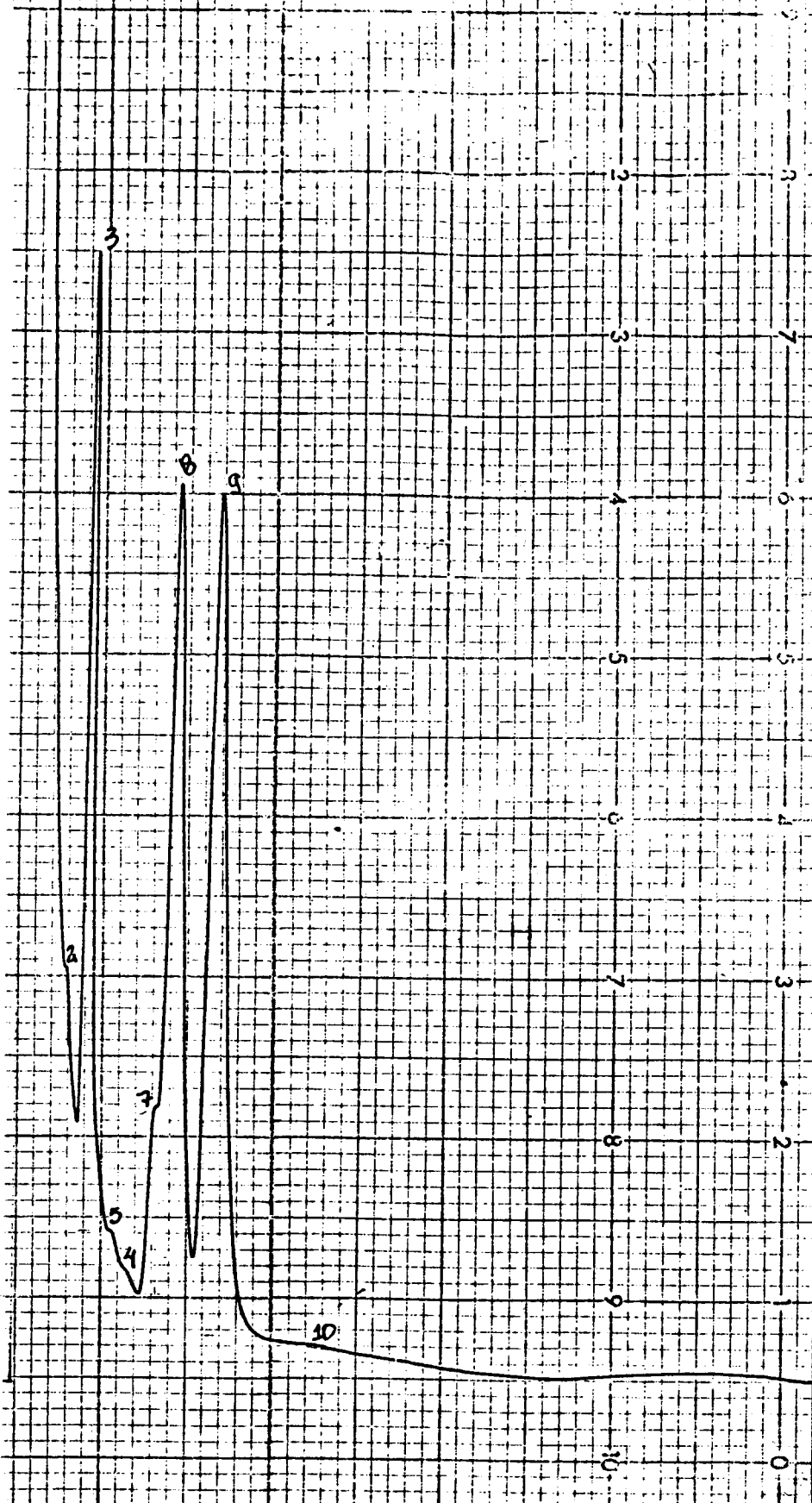


GRAFICO VII: ANÁLISE LIPÍDICA DO DIPLÓIDE
 PCO A ; PABA A ; γ A // bi A ; meth G
 1 6 1 1 1

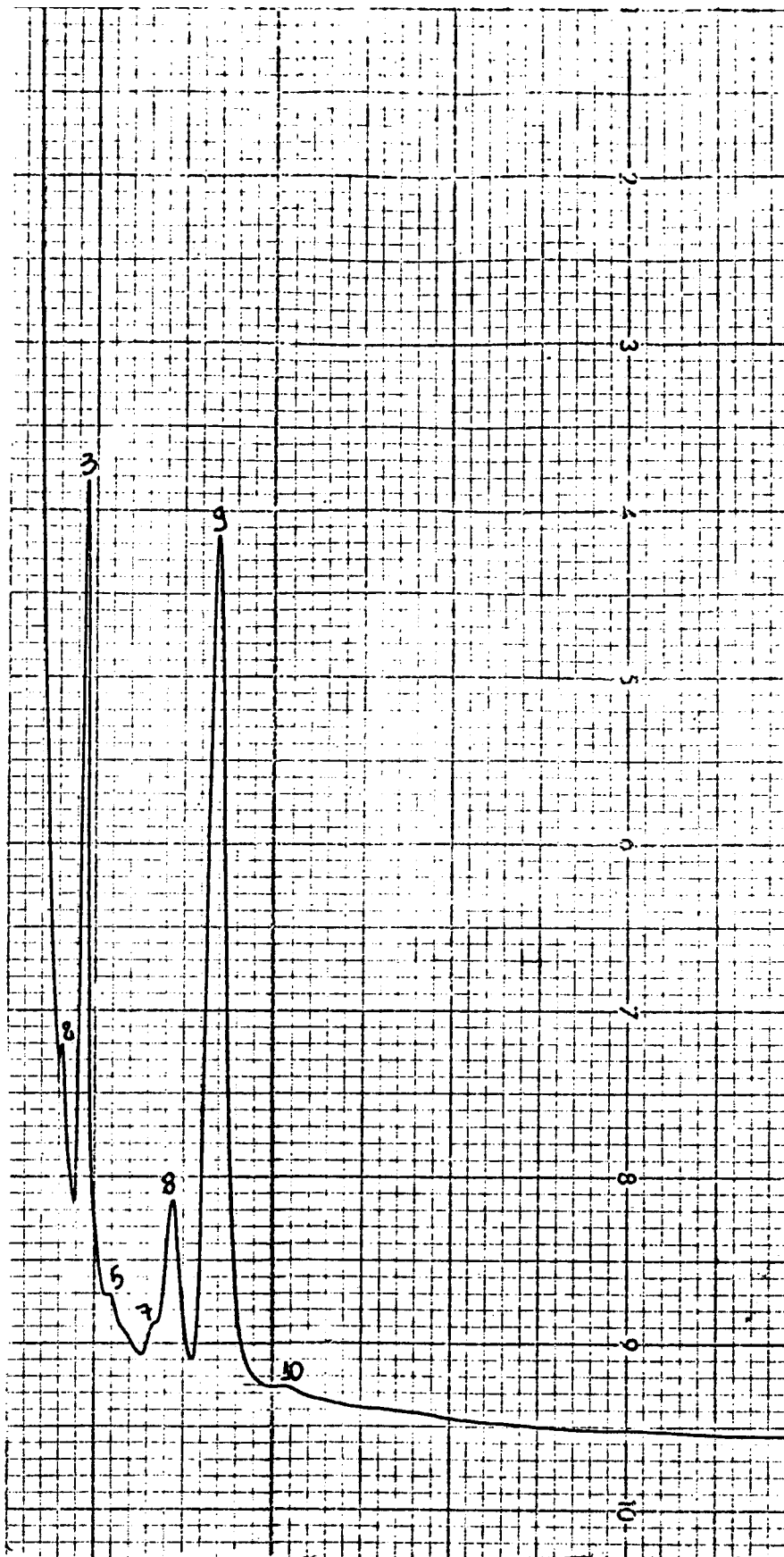


GRÁFICO VIII: ANÁLISE LIPÍDICA DO DIPLÓIDE
 BCO A ; eaba A ; y A // MSE
 1 6 1

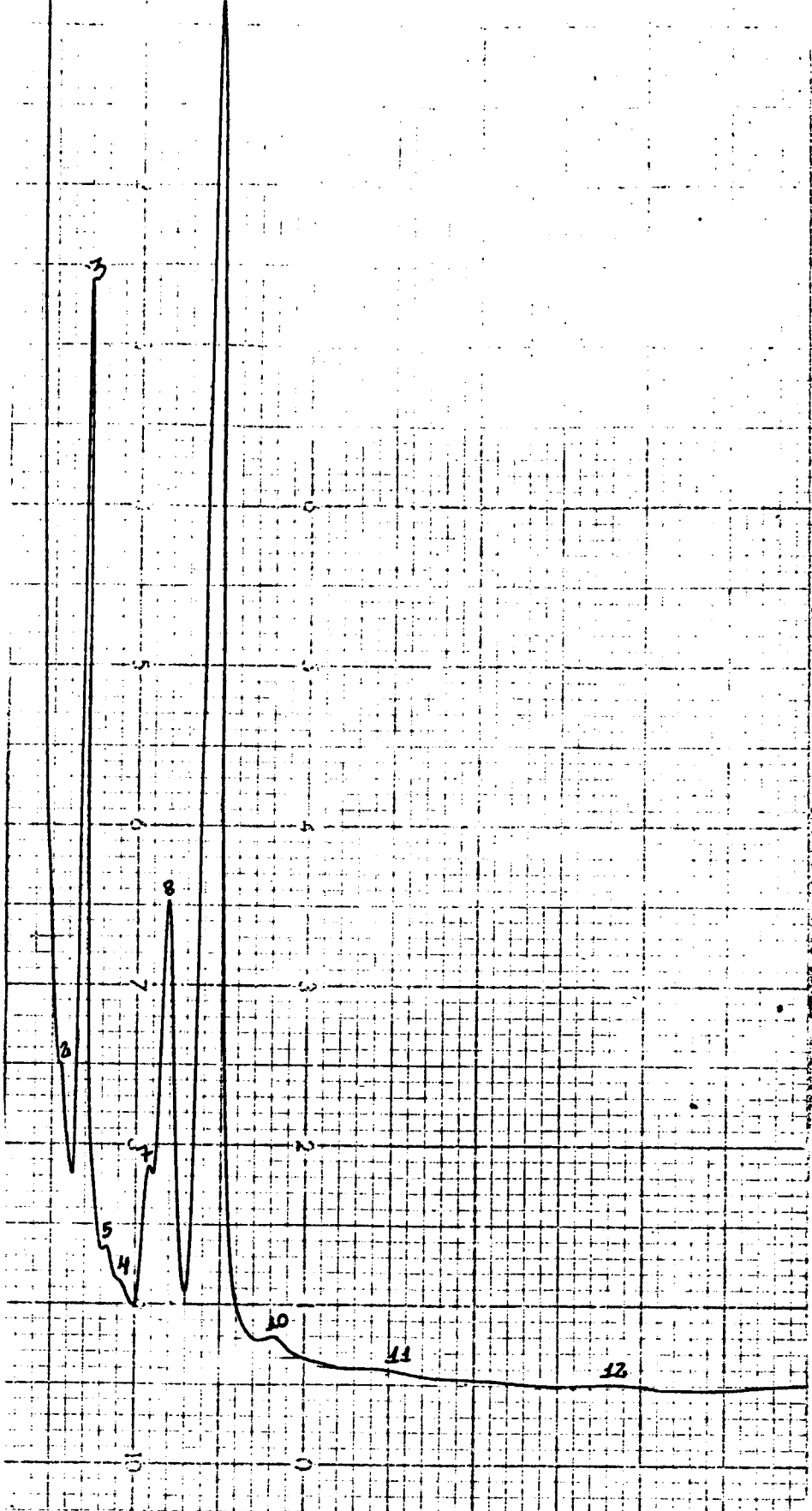


GRÁFICO IX: ANÁLISE LIPÍDICA DO DIPLÓIDE bi A ; meth G // MSE
 1 1

TABELA 7: ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS PELOS DIPLÓIDES EM MM.

PICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	pro A ₁ ; para A ₆ ; y A ₁ // bi A ₁ ; meth G ₁	MSE // bi A ₁ ; meth G ₁	pro A ₁ ; para A ₆ ; y A ₁ // MSE
PICO 1 C14:0	-----	-----	-----
PICO 2 C14:1	MIRISTOLEICO	MIRISTOLEICO	MIRISTOLEICO
PICO 3 C16:0	PALMÍTICO	PALMÍTICO	PALMÍTICO
PICO 4 C16:1	PALMITOLEICO	PALMITOLEICO	PALMITOLEICO
PICO 5 C17:0	MARGÁRICO	MARGÁRICO	MARGÁRICO
PICO 6 C17:1	-----	-----	-----
PICO 7 C18:0	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO
PICO 8 C18:1	OLEICO	OLEICO	OLEICO
PICO 9 C18:2	LINOLEICO	LINOLEICO	LINOLEICO
PICO 10 C18:3	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO
PICO 11 C20:2	-----	EICOSAPOLIENÚICO	-----
PICO 12 C20:4	-----	ARACÚNICO	-----

4.3.3. Análise qualitativa de lipídios encontrados nos setores.

A análise lipídica, obtida de acordo com o item 2.5.1., dos nove setores do diplóide $\mu\mu A$; $\mu\alpha\alpha A$; μA // MSE, encontra-se nos gráficos X a XVIII que se referem respectivamente aos setores 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

No gráfico X verificam-se 9 picos de ácidos graxos; nos gráficos XI, XII, XIV, XV e XVI, referente aos setores 2, 3, 5, 6 e 7, encontram-se 6 picos de ácidos graxos e os setores 4, 8 e 9 apresentam 7 picos de ácidos graxos, os quais estão representados nos gráficos XIII, XVII e XVIII respectivamente.

Os dados referentes à diversidade de ácidos graxos apresentados pelos 9 setores em MM suplementado encontram-se na tabela 8, onde verificam-se as seguintes diferenças:

- a) O ácido mirístico encontra-se apenas nos setores 1, 4 e 9
- b) O ácido miristoleico e linolênico apenas se encontra no setor 1.
- c) O setor 8 é o único a apresentar o ácido pentadecênico.
- d) Os ácidos insaturação do margárico, esteárico, eicosapoliênico e aracdônico não ocorrem em nenhum setor.

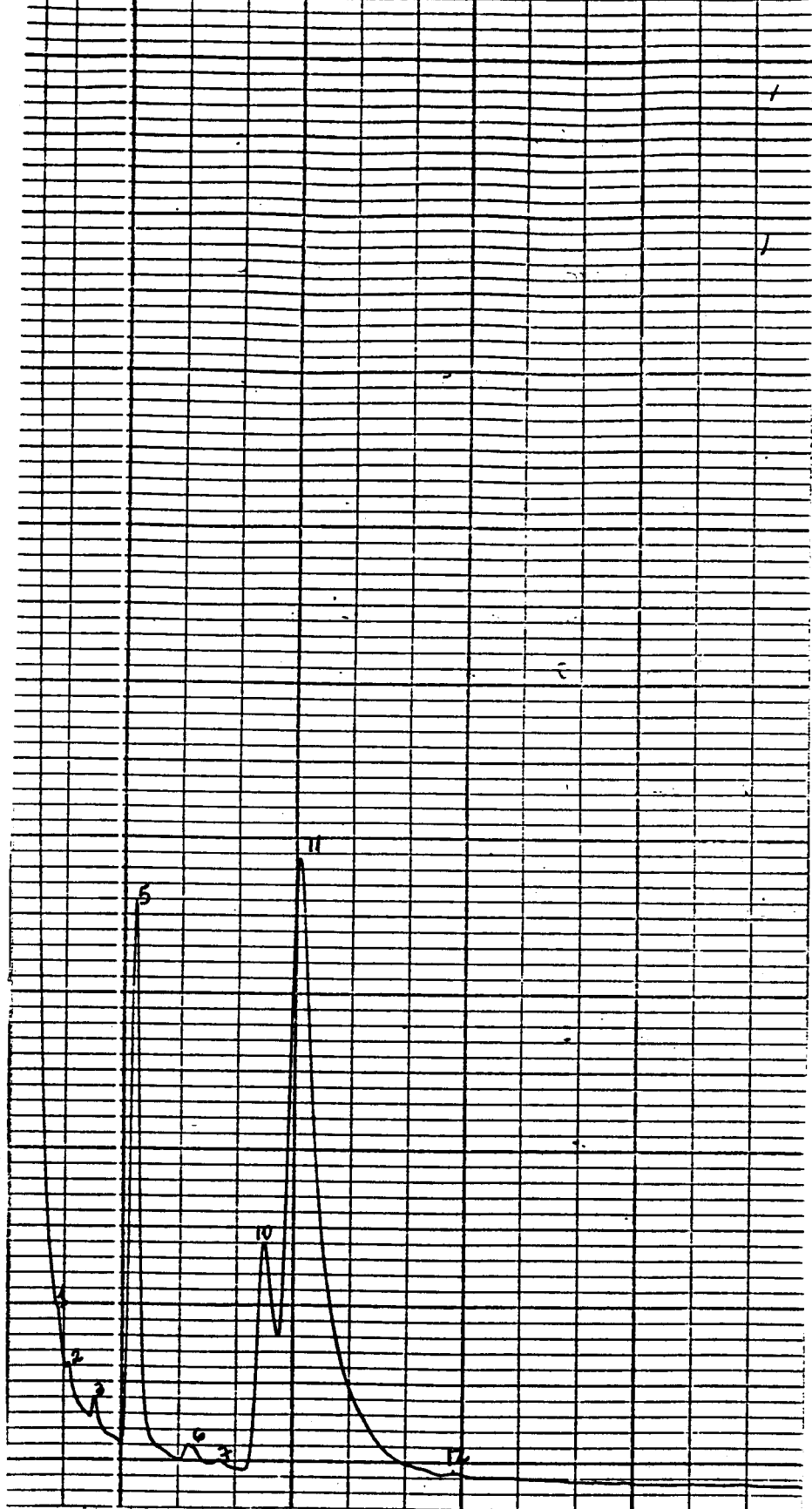


GRÁFICO X: ANÁLISE LIPÍDICA DO SETOR 1 DO DIPLOIDE
 PCQ A ; paba A ; y A // MSE
 1 6 1

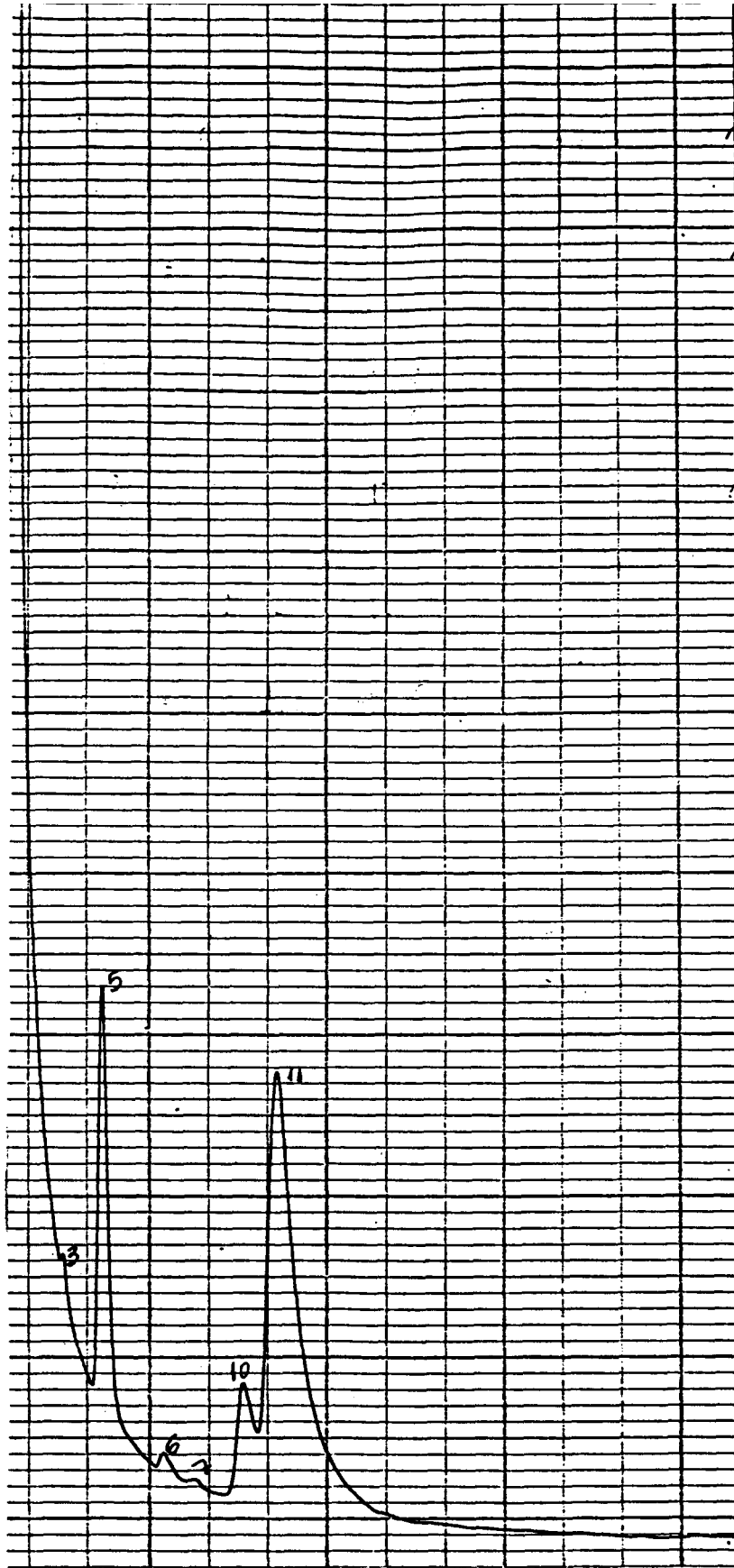


GRÁFICO XI: ANÁLISE LIPÍDICA DO SETOR 2 DO DIPLÓIDE
 BCO A ; papa A ; y A // MSE
 1 6 1

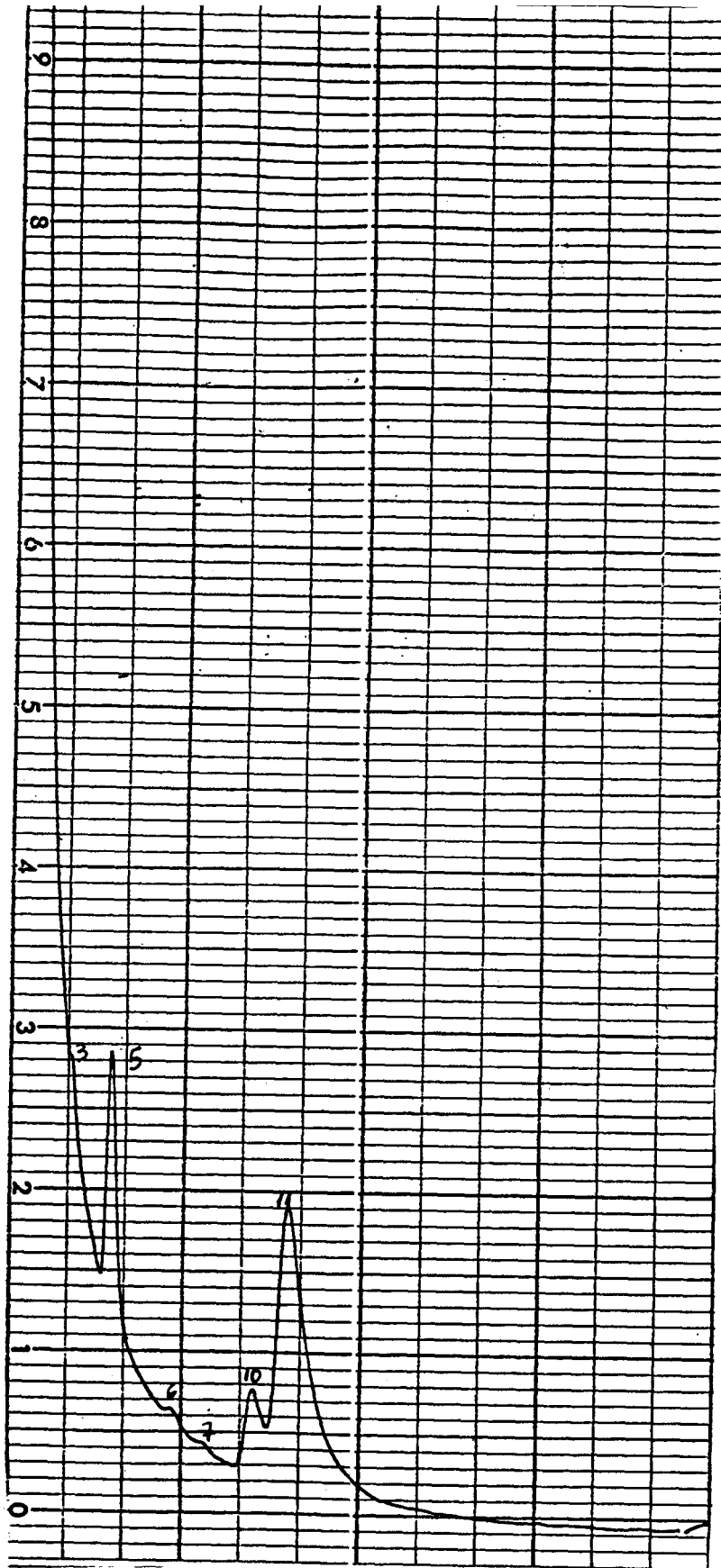


GRÁFICO XII: ANÁLISE LIPÍDICA DO SETOR 3 DO DIPLÓIDE
 PCO A ; PABA A ; y A // MSE
 1 6 1

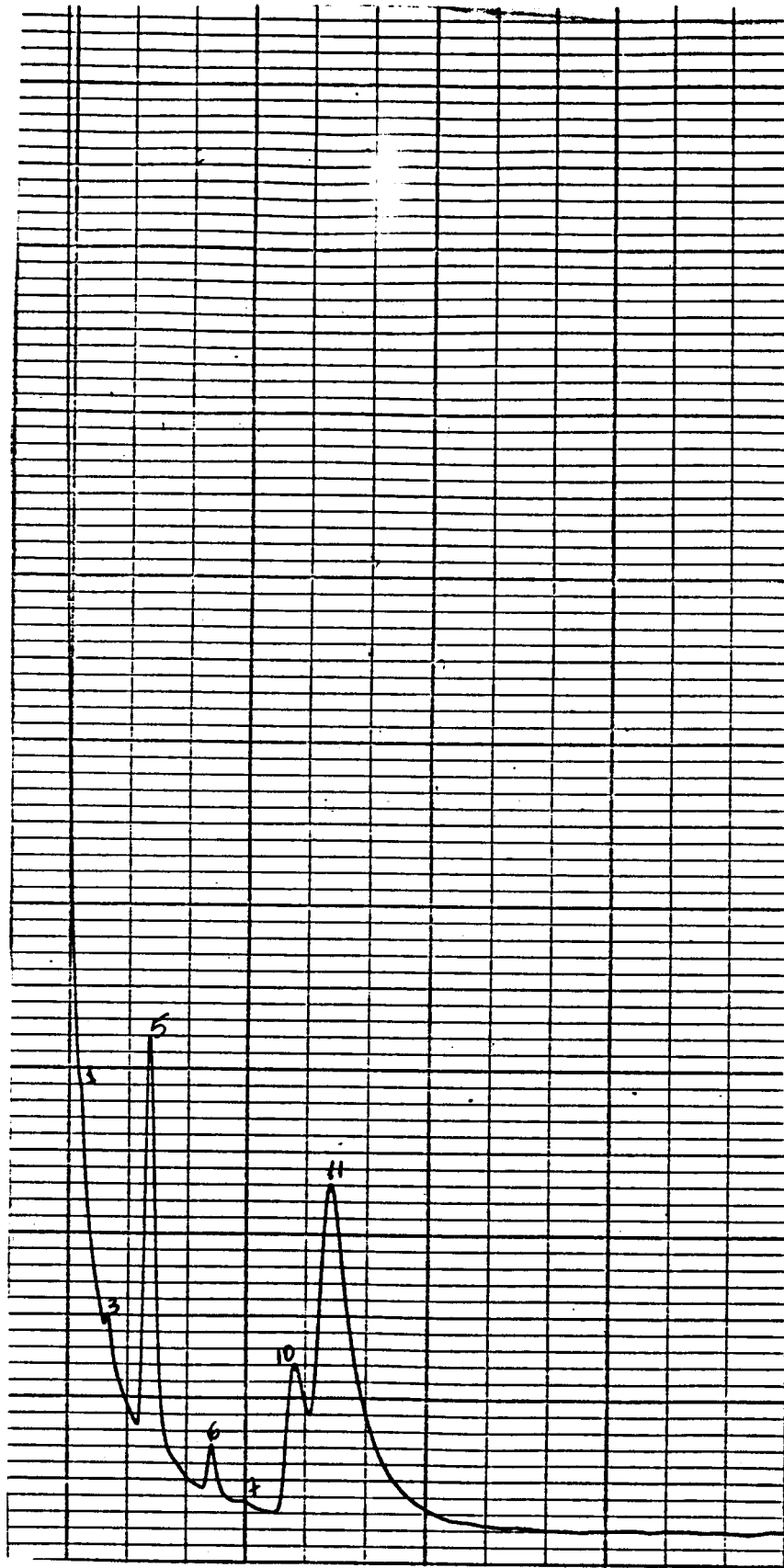


GRÁFICO XIII: ANÁLISE LIPÍDICA DO SETOR 4 DO DIPLÓIDE
 BCO A ; paba A ; y A // MSE
 1 6 1

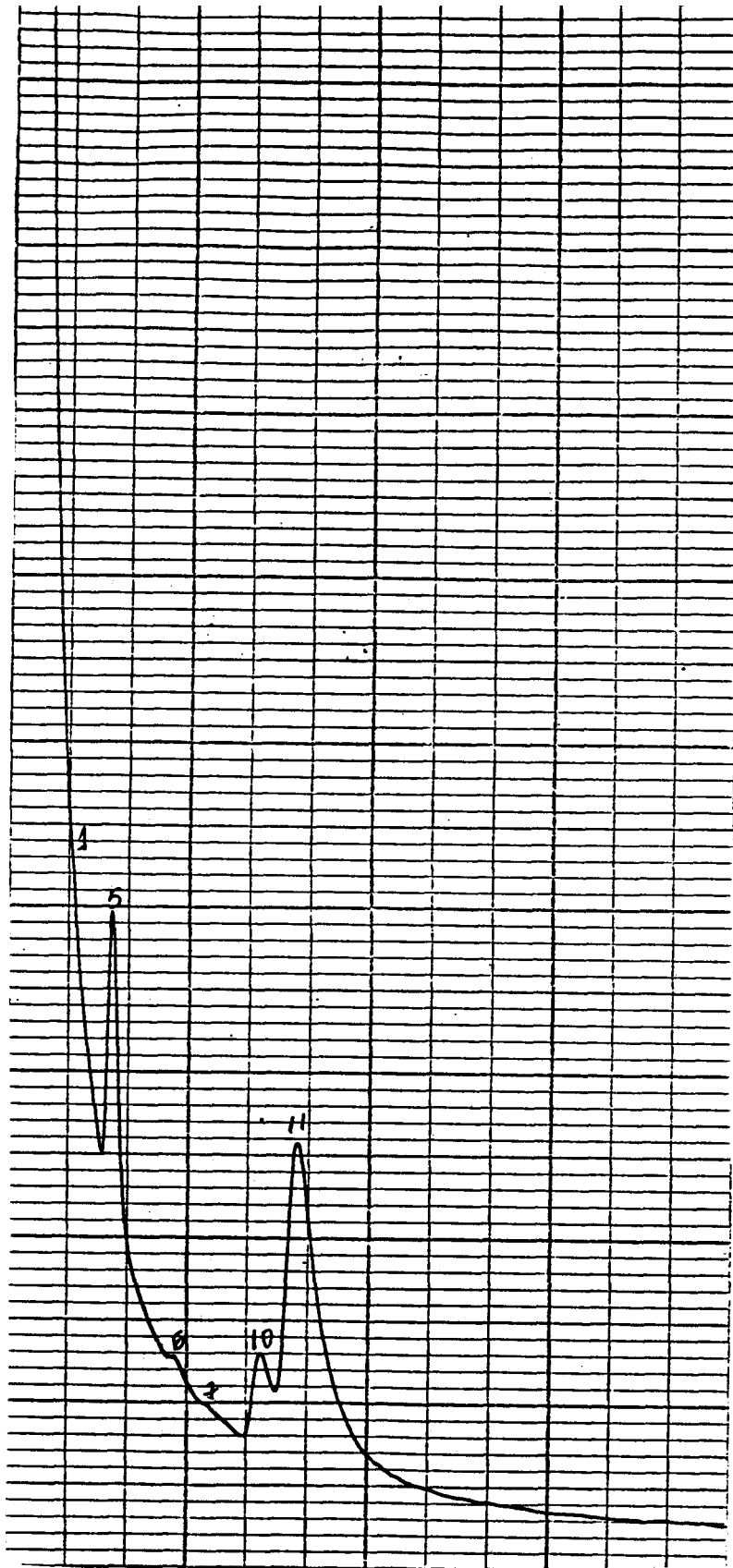


GRÁFICO XIV: ANÁLISE LIPÍDICA DO SETOR 5 DO DIPLÓIDE
 BCD A ; eaba A ; y A // MSE
 1 6 1

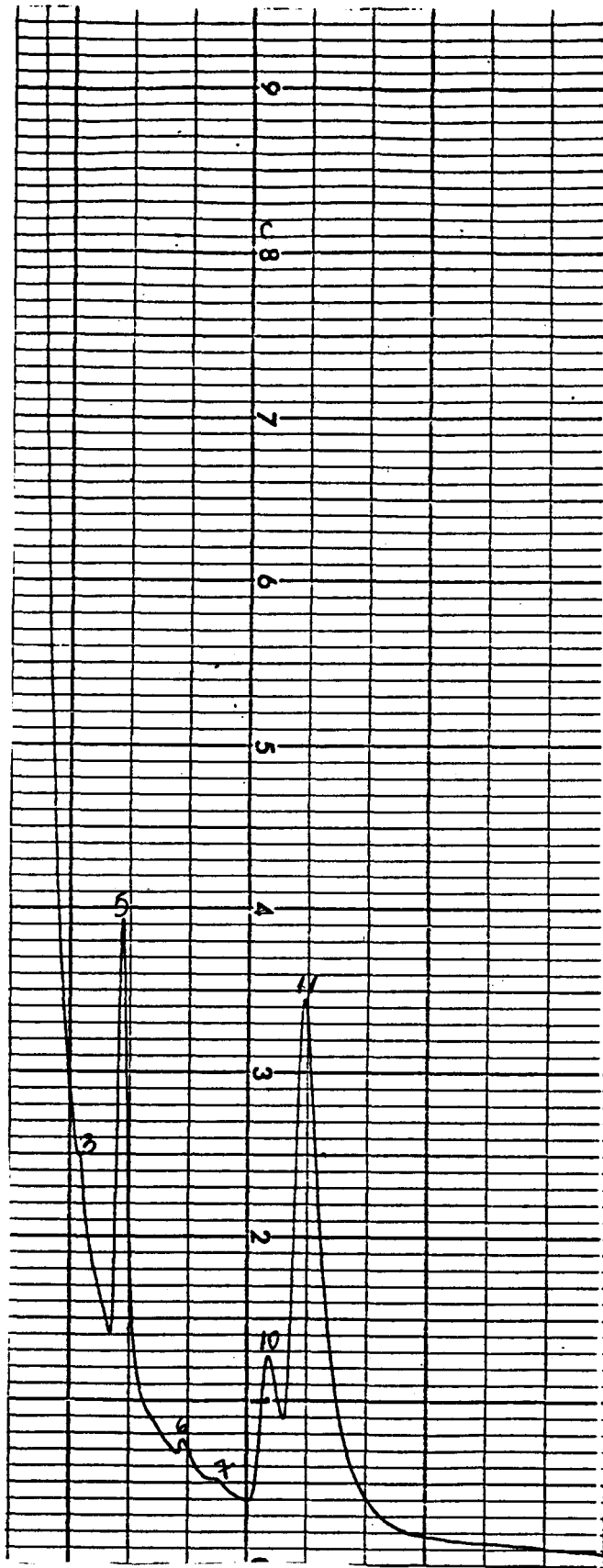


GRÁFICO XV: ANÁLISE LIPÍDICA DO SETOR 6 DO DIPLÓIDE
 PCO A ; PABA A ; 4 A // MSE
 1 6 1

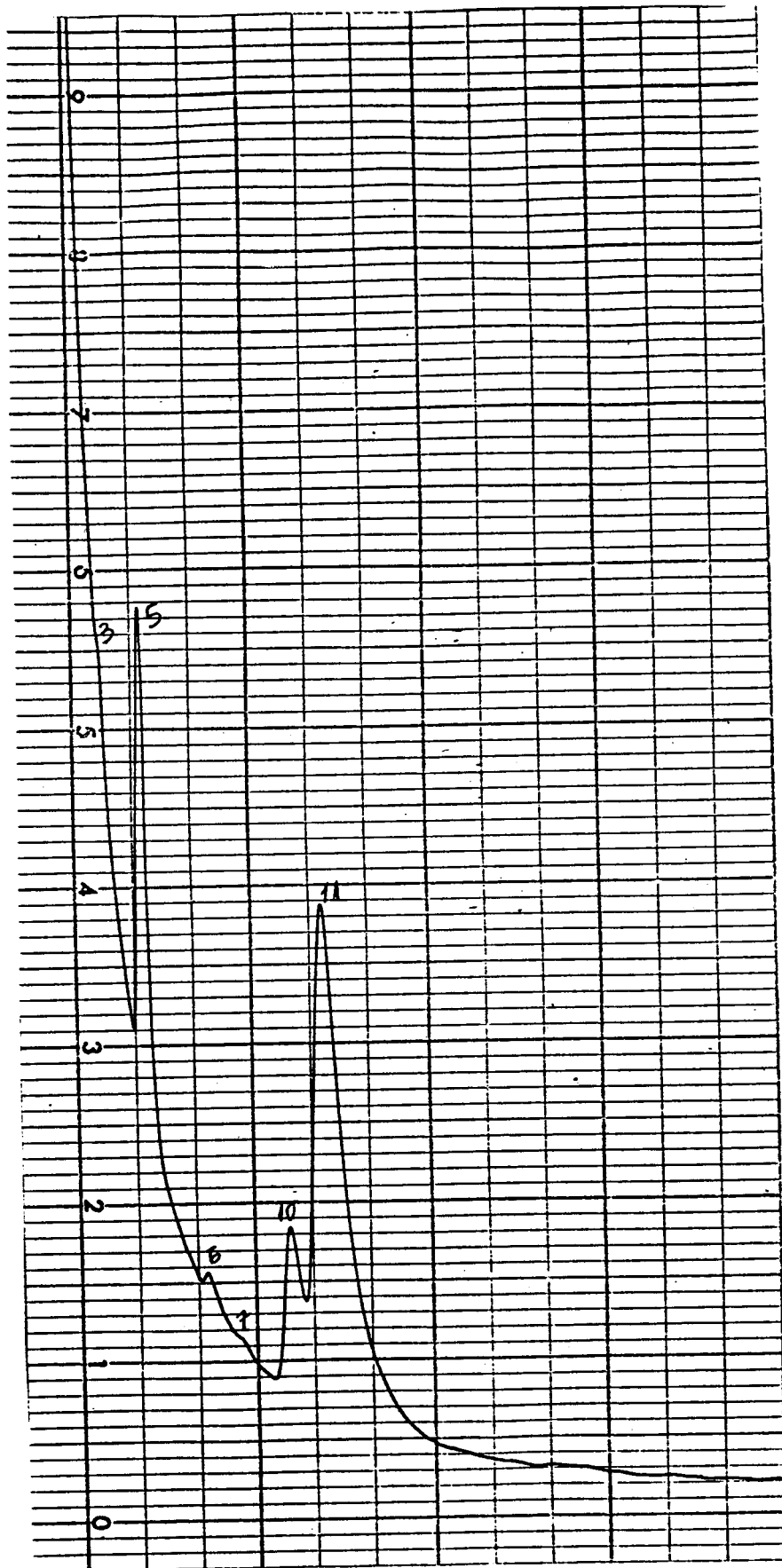


GRÁFICO XVI: ANÁLISE LIPÍDICA DO SETOR 7 DO DIPLÓIDE
 BCO A ; PABA A ; y A // MSE
 1 6 1

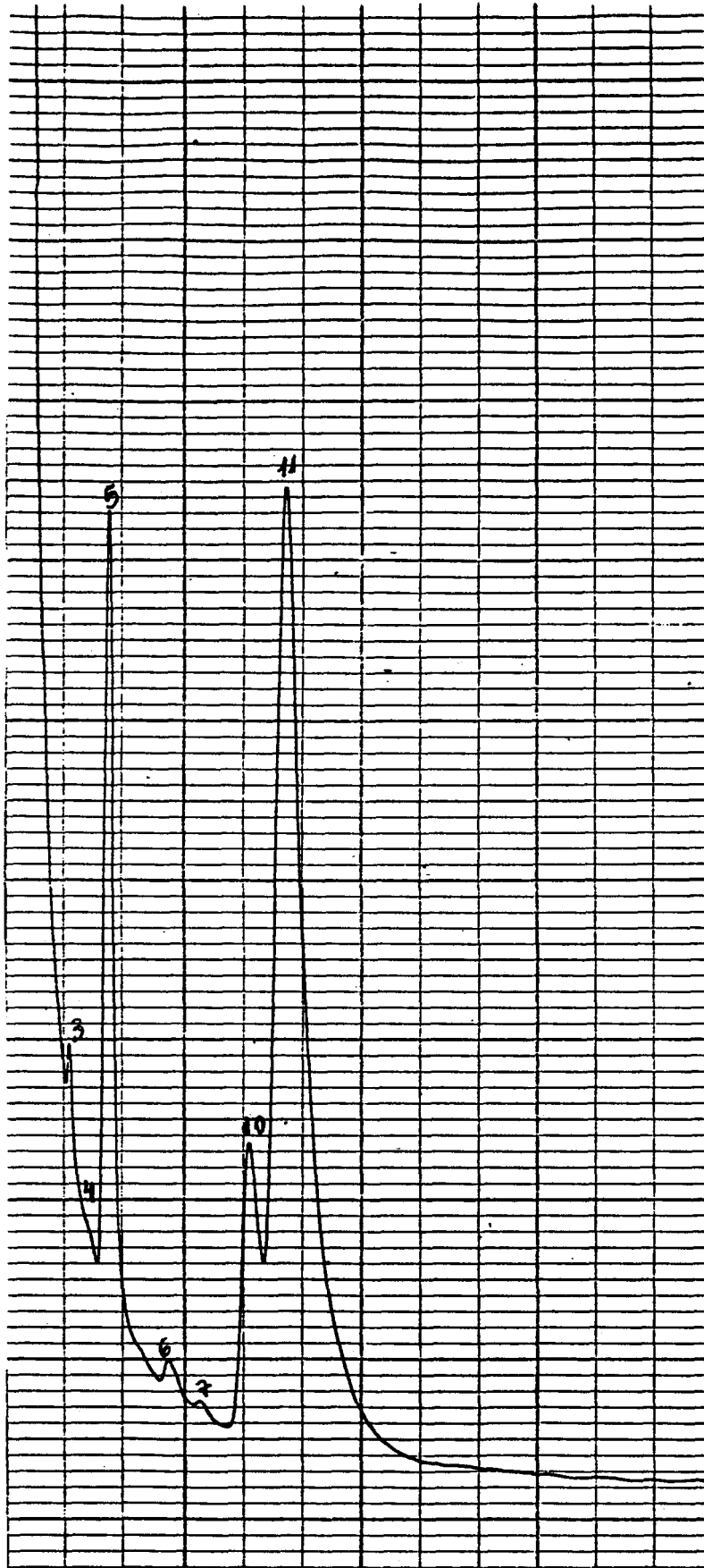


GRÁFICO XVII: ANÁLISE LIPÍDICA DO SETOR 8 DO DIPLOIDE
 pelo A ; pelo A ; y A // MSE

1 6 1

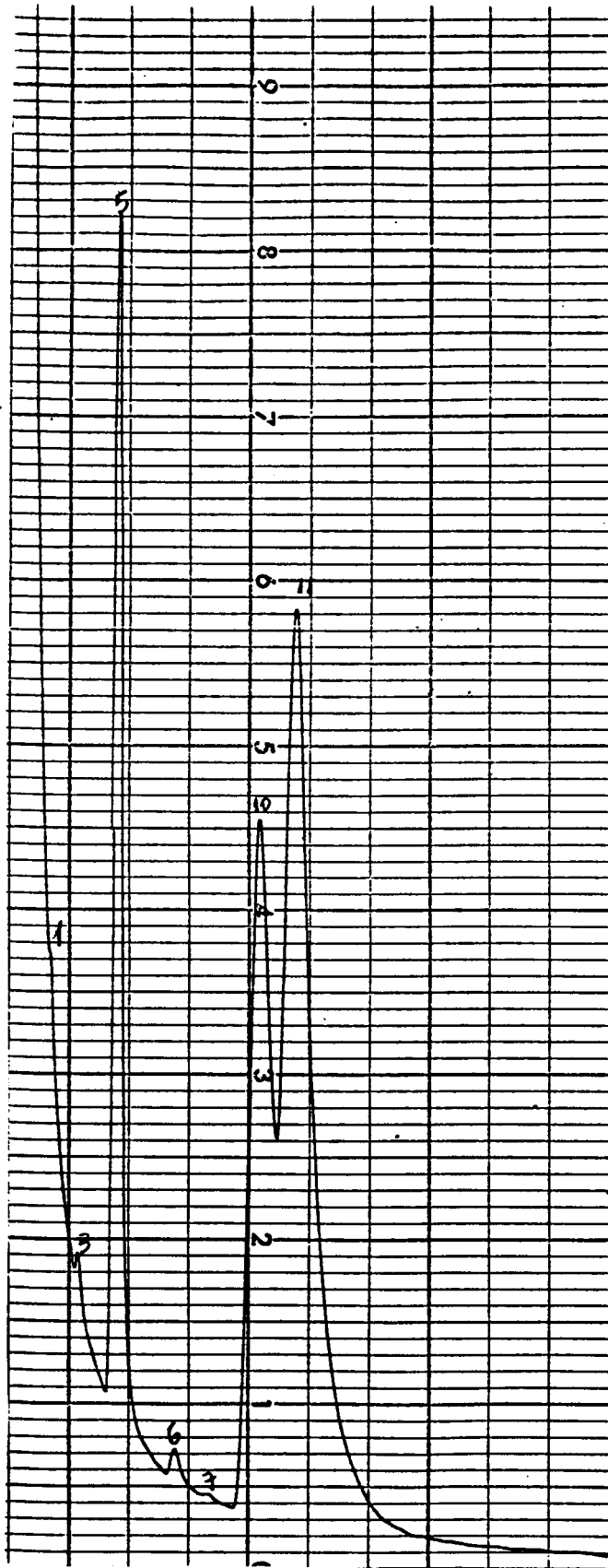


GRAFICO XVIII: ANALISE LIPIDICA DO SETOR 9 DO DIPLOIDE
 para A ; para A ; y A // MSE
 1 6 1

TABELA 8: ANÁLISE LIPÍDICA DOS SETORES DO DIPLÓIDE $pro A_1$; $paba A_6$ e A_1 // MSE em MH SUPLEMENTADO.

PICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	SETORES								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PICO 1 C14:0 MIRÍSTICO				MIRÍSTICO					MIRÍSTICO
PICO 2 C14:1 MIRISTOLEICO									
PICO 3 C15:0 PENTADECANÓICO									
PICO 4 C15:1									PENTADECENÓICO
PICO 5 C16:0 PALMÍTICO				PALMÍTICO	PALMÍTICO	PALMÍTICO	PALMÍTICO	PALMÍTICO	PALMÍTICO
PICO 6 C16:4 PALMITOLEICO				PALMITOLEICO	PALMITOLEICO	PALMITOLEICO	PALMITOLEICO	PALMITOLEICO	PALMITOLEICO
PICO 7 C17:0 MARGÁRICO				MARGÁRICO	MARGÁRICO	MARGÁRICO	MARGÁRICO	MARGÁRICO	MARGÁRICO
PICO 8 C17:1									
PICO 9 C18:0									
PICO 10 C18:1 OLEICO				OLEICO	OLEICO	OLEICO	OLEICO	OLEICO	OLEICO
PICO 11 C18:2 LINOLEICO				LINOLEICO	LINOLEICO	LINOLEICO	LINOLEICO	LINOLEICO	LINOLEICO
PICO 12 C18:3 LINOLÉNICO									
PICO 13 C20:2									
PICO 14 C20:4									

4.4. Comparação entre a produção qualitativa dos diplóides e as linhagens que lhe deram origem em MC e MM suplementado.

4.4.1. Comparação entre a produção do diplóide $pro A ; paba A ; \gamma A // bi A ; meth G$ em MM e as linhagens que lhe deram origem em MC e MM suplementado.

Na Tabela 9 referente ao diplóide $pro A ; paba A ; \gamma A // bi A ; meth G$ e as linhagens que lhe deram origem em MC encontramos os seguintes resultados: Os ácidos mirísticos, insaturação do margárico e eicosepolienólico encontram-se na linhagem $pro A ; paba A ; \gamma A$ e $bi A ; meth G$ porém não se encontram no diplóide; já o ácido miristoleico só se encontra no diplóide. O ácido palmitoleico ocorre na linhagem $pro A ; paba A ; \gamma A$ e no diplóide porém não ocorre na linhagem $bi A ; meth G$.

Na Tabela 10 encontramos os resultados do diplóide $pro A ; paba A ; \gamma A // bi A ; meth G$ e as linhagens que lhe deram origem em MM suplementado, verificando-se as seguintes diferenças: O ácido mirístico encontra-se somente na linhagem $pro A ; paba A ; \gamma A$. Já o ácido margárico ocorre na linhagem $bi A ; meth G$.

TABELA 9: COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DO DIPLÓIDE $pro A_1; paba A_6; \gamma A_1 // bi A_1; meth G_1$ em MM

E AS LINHAGENS QUE LHE DERAM ORIGEM em MC .

PICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	$pro A_1; paba A_6; \gamma A_1$	$bi A_1; meth G_1$	$pro A_1; paba A_6; \gamma A_1 // bi A_1; meth G_1$
PICO 1 C14:0	MIRÍSTICO	MIRÍSTICO	-----
PICO 2 C14:1	-----	-----	MIRISTOLEICO
PICO 3 C16:0	PALMÍTICO	PALMÍTICO	PALMÍTICO
PICO 4 C16:4	PALMITOLEICO	-----	PALMITOLEICO
PICO 5 C17:0	MARGÁRICO	MARGÁRICO	MARGÁRICO
PICO 6 C17:1	INSATURACAO DO MARGÁRICO	INSATURACAO DO MARGÁRICO	-----
PICO 7 C18:0	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO
PICO 8 C18:1	OLEICO	OLEICO	OLEICO
PICO 9 C18:2	LINOLEICO	LINOLEICO	LINOLEICO
PICO 10 C18:3	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO
PICO 11 C20:2	EICOSAPOLIENÓICO	EICOSAPOLIENÓICO	-----
PICO 12 C20:4	-----	-----	-----

TABELA 10: COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DO DIPLÓIDE $pro A_1 ; paba A_6 ; \gamma A_1 // bi A_1 ; meth G_1$ em MM .

E AS LINHAGENS QUE LHE DERAM ORIGEM em MM SUPLEMENTADO .

PICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	$pro A_1 ; paba A_6 ; \gamma A_1$	$bi A_1 ; meth G_1$	$pro A_1 ; paba A_6 ; \gamma A_1 // bi A_1 ; meth G_1$
PICO 1 C14:0	MIRÍSTICO	-----	-----
PICO 2 C14:1	MIRISTOLEICO	MIRISTOLEICO	MIRISTOLEICO
PICO 3 C16:0	PALMÍTICO	PALMÍTICO	PALMÍTICO
PICO 4 C16:4	PALMITOLEICO	PALMITOLEICO	PALMITOLEICO
PICO 5 C17:0	-----	MARGÁRICO	MARGÁRICO
PICO 6 C17:1	-----	-----	-----
PICO 7 C18:0	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO
PICO 8 C18:1	OLEICO	OLEICO	OLEICO
PICO 9 C18:2	LINOLEICO	LINOLEICO	LINOLEICO
PICO 10 C18:3	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO
PICO 11 C20:2	-----	-----	-----
PICO 12 C20:4	-----	-----	-----

4.4.2. Comparação entre a produção do diplóide $pro A ; paba A ; y A$ // MSE em MM e as linhagens que lhe deram origem em MC e MM suplementado.

Os dados referentes ao diplóide $pro A ; paba A ; y A$ // MSE e as linhagens que lhe deram origem em MC encontram-se na Tabela 11 onde verificam-se as seguintes diferenças: Os ácidos mirísticos e insaturação do margárico ocorrem nas linhagens haplóides, porém não ocorre no diplóide, enquanto que o ácido miristoleico só ocorre no diplóide e o palmitoleico e eicosapoliendico só encontram-se na linhagem $pro A ; paba A ; y A$.

A Tabela 12 refere-se ao diplóide $pro A ; paba A ; y A$ // MSE e as linhagens que lhe deram origem em MM suplementado, verificam-se os seguintes resultados: O ácido palmitoleico encontra-se nas linhagens $pro A ; paba A ; y A$ e MSE, porém não ocorre no diplóide enquanto que o ácido margárico ocorre na linhagem MSE e no diplóide e o ácido mirístico só ocorre em $pro A ; paba A ; y A$.

TABELA 11: COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DO DIPLÓIDE $\underline{pro A_1}$; $\underline{paba A_6}$; $\underline{y A_1}$ // MSE em MM
E AS LINHAGENS QUE LHE DERAM ORIGEM em MC .

PICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	$\underline{pro A_1}$; $\underline{paba A_6}$; $\underline{y A_1}$	MSE	$\underline{pro A_1}$; $\underline{paba A_6}$; $\underline{y A_1}$ // MSE
PICO 1 C14:0	MIRÍSTICO	MIRÍSTICO	-----
PICO 2 C14:1	-----	-----	MIRISTOLEICO
PICO 3 C16:0	PALMÍTICO	PALMÍTICO	PALMÍTICO
PICO 4 C16:1	PALMITOLEICO	-----	-----
PICO 5 C17:0	MARGÁRICO	MARGÁRICO	MARGÁRICO
PICO 6 C17:1	INSATURACAO DO MARGÁRICO	INSATURACAO DO MARGÁRICO	-----
PICO 7 C18:0	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO
PICO 8 C18:1	OLEICO	OLEICO	OLEICO
PICO 9 C18:2	LINOLEICO	LINOLEICO	LINOLEICO
PICO 10 C18:3	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO
PICO 11 C20:2	EICOSAPOLIENÓICO	-----	-----
PICO 12 C20:4	-----	-----	-----

TABELA 12 COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DO DIPLÓIDE $pro A_1$; $para A_6$; γA_1 // MSE em MM

E AS LINHAGENS QUE LHE DERAM ORIGEM em MM SUPLEMENTADO .

PICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	$pro A_1$; $para A_6$; γA_1	MSE	$pro A_1$; $para A_6$; γA_1 // MSE
PICO 1 C14:0	MIRÍSTICO	-----	-----
PICO 2 C14:1	MIRISTOLEICO	MIRISTOLEICO	MIRISTOLEICO
PICO 3 C16:0	PALMÍTICO	PALMÍTICO	PALMÍTICO
PICO 4 C16:4	PALMITOLEICO	PALMITOLEICO	-----
PICO 5 C17:0	-----	MARGÁRICO	MARGÁRICO
PICO 6 C17:1	-----	-----	-----
PICO 7 C18:0	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO
PICO 8 C18:1	OLEICO	OLEICO	OLEICO
PICO 9 C18:2	LINOLEICO	LINOLEICO	LINOLEICO
PICO 10 C18:3	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO
PICO 11 C20:0	-----	-----	-----
PICO 12 C20:4	-----	-----	-----

4.4.3. Comparação entre a produção do diplóide $bi A ; meth G // MSE$ e as linhagens que lhe deram origem em MC e MM suplementado.

Os dados da Tabela 13 referente ao diplóide $bi A ; meth G // MSE$ e as linhagens que lhe deram origem em MC são os seguintes: Os ácidos mirísticos e insaturação do margárico encontram-se nas linhagens $bi A ; meth G$ e MSE porém não se encontram no diplóide, enquanto que os ácidos miristoleico e aracdônico ocorrem somente nos diplóides. O ácido eicosapoliênico ocorre na linhagem $bi A ; meth G$ e no diplóide, porém, não ocorre na linhagem $bi A ; meth G$.

Na Tabela 14 referente ao diplóide $bi A ; meth G // MSE$ e as linhagens que lhe deram origem em MM suplementado, encontramos o seguinte resultado: Os ácidos eicosapoliênico e aracdônico ocorrem somente nos diplóides.

TABELA 13: COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DO DIPLÓIDE MSE // bi A₁; meth G₁ em MH

E AS LINHAGENS QUE LHE DERAM ORIGEM em MC.

PICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	MSE	<u>bi A₁</u> ; <u>meth G₁</u>	MSE // <u>bi A₁</u> ; <u>meth G₁</u>
PICO 1 C14:0	MIRÍSTICO	MIRÍSTICO	-----
PICO 2 C14:1	-----	-----	MIRISTOLEICO
PICO 3 C16:0	PALMÍTICO	PALMÍTICO	PALMÍTICO
PICO 4 C16:4	-----	-----	PALMITOLEICO
PICO 5 C17:0	MARGÁRICO	MARGÁRICO	MARGÁRICO
PICO 6 C17:1	INSATURACAO DO MARGÁRICO	INSATURACAO DO MARGÁRICO	-----
PICO 7 C18:0	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO
PICO 8 C18:1	OLEICO	OLEICO	OLEICO
PICO 9 C18:2	LINOLEICO	LINOLEICO	LINOLEICO
PICO 10 C18:3	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO
PICO 11 C20:2	-----	EICOSAPOLIENÓICO	EICOSAPOLIENÓICO
PICO 12 C20:4	-----	-----	ARACÔNICO

TABELA 14. COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DO DIPLÓIDE bi A₁ ; meth G₁ // MSE em MM
 E AS LINHAGENS QUE LHE DERAM ORIGEM em MM SUPLEMENTADO .

PICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	<u>bi A₁ ; meth G₁</u>	MSE	<u>bi A₁ ; meth G₁</u> // MSE
PICO 1 C14:0	-----	-----	-----
PICO 2 C14:1	MIRISTOLEICO	MIRISTOLEICO	MIRISTOLEICO
PICO 3 C16:0	PALMÍTICO	PALMÍTICO	PALMÍTICO
PICO 4 C16:4	PALMITOLEICO	PALMITOLEICO	PALMITOLEICO
PICO 5 C17:0	MARGÁRICO	MARGÁRICO	MARGÁRICO
PICO 6 C17:1	-----	-----	-----
PICO 7 C18:0	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO	ESTEÁRICO
PICO 8 C18:1	OLEICO	OLEICO	OLEICO
PICO 9 C18:2	LINOLEICO	LINOLEICO	LINOLEICO
PICO 10 C18:3	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO	LINOLÊNICO
PICO 11 C20:2	-----	-----	EICOSAPOLIENÓICO
PICO 12 C20:4	-----	-----	ARACDÔNICO

4.5. Análise quantitativa de lipídios.

4.5.1. Determinação da porcentagem de ácidos graxos.

De acordo com o item 2.5.1. foram obtidos os resultados expressos na Tabela 15, referente a porcentagem de ácidos graxos nas linhagens mutantes estudadas em MM suplementado e nos diplóides estudados em MM.

TABELA 15: PORCENTAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS NAS LINHAGENS ESTUDADAS EM MEIO MÍNIMO e MM SUPLEMENTADO.

% de ácidos graxos	$\frac{\sum \text{p.c.o. } A_1; \text{ p.c.a.b.a. } A_6;}{\sum A_1}$	MSE	$\frac{\sum \text{b.i. } A_1; \text{ meth. } G_1}{\sum A_1}$	$\frac{\sum \text{p.c.o. } A_1; \text{ p.c.a.b.a. } A_6;}{\sum A_1}$	$\frac{\sum \text{p.c.o. } A_1; \text{ p.c.a.b.a. } A_6;}{\sum A_1}$	MSE // $\frac{\sum \text{b.i. } A_1; \text{ meth. } G_1}{\sum A_1}$
MIRÍSTICO	TRACOS	-----	-----	-----	-----	-----
MIRISTOLEICO	TRACOS	TRACOS	3,745	TRACOS	3,505	TRACOS
PALMÍTICO	33,306	24,604	22,555	27,827	26,864	21,100
PALMITOLEICO	1,678	TRACOS	TRACOS	TRACOS	-----	TRACOS
MARGÁRICO	-----	TRACOS	0,361	TRACOS	TRACOS	0,290
INSATURACAO DO MARGÁRICO	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ESTEÁRICO	1,546	2,849	0,743	2,497	0,640	1,695
OLEICO	21,640	11,961	10,821	24,724	5,842	10,457
LINOLEICO	39,011	59,370	61,479	44,952	62,233	64,755
LINOLÉNICO	2,819	1,216	2,819	TRACOS	0,914	1,175
EICOSAPOLIENÓICO	-----	-----	-----	-----	-----	0,354
ARACÓNICÓ	-----	-----	-----	-----	-----	0,180



5.1. Lipídios nas linhagens haplóides, diplóides e segregantes em diferentes meios de cultura.

A composição de ácidos graxos extraídos das linhagens MSE; pro A ; paba A ; y A e bi A ; meth G analisados em MC e MM suplementado encontra-se nas Tabelas 5 e 6.

Quanto a composição lipídica verificou-se o seguinte:

a - Em MC o ácido mirístico aparece nas 3 linhagens e em MM suplementado só aparece na linhagem pro A ; paba A ; y A .

b - Em MC o ácido palmitoleico aparece somente no mutante pro A ; paba A ; y A porém em MM suplementado todas as linhagens apresentam esse ácido.

c - O ácido margárico se apresenta em todas as linhagens crescidas em MC porém em MM suplementado não se apresenta na linhagem pro A ; paba A ; y A .

Parece ficar claro aqui a influência do meio na composição lipídica.

A predominância de alguns ácidos graxos em meios diferentes também foi observada por Singh e Datt (1957) que verificaram que o ácido oleico e linoleico apareceriam com mais frequência em meios cujas concentrações de açúcar eram altas. Kolesnikova e Tolstikova (1984) também observaram que o ácido linoleico juntamente com o linolênico eram predominantes quando estudaram o efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento de *Aspergillus*.

A composição lipídica apresentada pela linhagem MSE em MC e MM suplementado encontra-se na Tabela 3, onde verifica-se:

a - O ácido mirístico e insaturação do margárico só se encontram em MC.

b - O ácido miristoleico e ácido palmitoleico só se encontram em MM suplementado.

c - Os ácidos palmítico, margárico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico aparecem tanto em MC como em MM suplementado sendo o ácido linoleico o mais abundante com 59,37 % seguido do palmítico com 24,60 %, como podemos verificar na Tabela 15.

Monteiro (1984) estudando a composição lipídica total da linhagem MSE encontrou resultados onde o conteúdo lipídico da linhagem consiste nos seguintes ácidos: palmítico, margárico, esteárico, oleico, linoleico e possível isômero do linoleico, sendo o ácido linoleico mais abundante com 38,3 % seguido do margárico com 22,8 % e do palmítico com 17,9 %.

A presença do ácido linolênico foi evidenciada no presente trabalho, na linhagem referida, mas não consta no trabalho acima citado, enquanto que o possível isômero referido por Monteiro (1984) não foi encontrado. Isso possivelmente se deve a diferenças de métodos de extração ou diferenças no meio de cultura utilizados.

Os ácidos graxos produzidos pela linhagem bi A₁; meth G₁, em MC e MM suplementado encontra-se na Tabela 4 constatando-se que: Os ácidos mirístico, insaturação do margárico e eicosapoliênico só aparecem quando a linhagem cresce em MC. Já os ácidos miristoleico e palmitoleico só aparecem em MM suplementado. Os

ácidos palmitíco, margárico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico aparecem tanto em MC como em MM suplementado, sendo predominante o ácido linoleico com 64,47 % seguido do palmítico com 22,55% como podemos observar na Tabela 15.

Entre as linhagens MSE e $h_1 A$; $m_1 b_1 G$ podemos constatar uma constância qualitativa de ácidos graxos independentes do meio.

Esta constância já não é verificada na linhagem $g_1 Q A$; $p_1 a_1 b_1 A$; $y_1 A$ que apresenta a seguinte composição lipídica: O ácido margárico, insaturação do margárico e eicosapoliênico só aparecem em MC enquanto que o miristoleico só se apresenta em MM suplementado. Já os ácidos mirístico, palmitoleico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico se apresentam tanto em MC como em MM suplementado.

Verificando-se a Tabela 15 constata-se que o ácido linoleico é o ácido mais abundante com 39,01 % seguido do ácido palmitoleico com 33,3 %.

Essa variação de ácidos graxos apresentada por uma mesma linhagem sob condições diferentes de cultivo, pode estar na dependência de fatores ambientais como parece indicar os dados apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4.

A constância de determinados ácidos graxos independentes do meio de cultura e a variação lipídica entre linhagens diferentes crescidas sob condições idênticas, observado nas Tabelas 5 e 6, segundo Ratledge (1982) pode indicar uma dependência de fatores genéticos.

Os ácidos graxos apresentados nos diplóides estudados em MM encontram-se na Tabela 7 onde podemos observar que:

a - Os ácidos mirístico e insaturação de margárico não se apresentam em nenhum diplóide.

b - Os ácidos eicosapolienóico e aracdônico aparecem somente no diplóide MSE // β_1 A ; α_1 G .

c - Os ácidos miristoleico, β_1 palmítico, α_1 palmitoleico, margárico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico aparecem nos três diplóides estudados.

Monteiro (1984) trabalhando com diplóides de *Aspergillus nidulans* constatou que os únicos ácidos que aparecem em todos os diplóides são os ácidos mirístico, oleico e linoleico e também constatou que o ácido eicosapolienóico é observado apenas em um dos diplóides.

A porcentagem de ácidos graxos encontrados tanto nos diplóides como nos haplóides estudados em MM suplementado encontram-se na Tabela 15, onde podemos verificar que em média os ácidos graxos mais abundantes são: linoleico com 55,3 %, palmitico com 26,04 % e oleico com 14,25%.

O diplóide β_1 A ; α_1 A ; γ_1 A // MSE pareceu menos produtivo quanto ao ácido oleico do que as linhagens que lhe deram origem . Nos demais casos não se verificam diferenças grandes entre diplóides e linhagens envolvidas.

Diferenças na composição lipídica também são encontradas entre os nove setores estudados em MM suplementado. Verificandose a Tabela 8 podemos constatar que o ácido mirístico só apareceu nos setores 1, 4 e 9, enquanto que o setor 8 foi o único a

apresentar o ácido pentadecenóico e o setor 1 foi o único em que se constatou ácidos miristoleico e linoleico. Já os ácidos pentadecanóico, palmitico, palmitoleico, margárico, oleico e linoleico se encontram em todos os setores enquanto os ácidos insaturação do margárico e esteárico não se apresentam em nenhum setor.

Na literatura revista podemos constatar que os ácidos graxos mais encontrados em *A. nidulans* são: oleico com 40,3 %; palmitico com 20,9 %; linoleico com 17,0 % e esteárico com 15,9% (Singh et alii, 1955).

Monteiro (1984) trabalhando com *Aspergillus nidulans* encontrou resultados onde a porcentagem de ácido graxo em linhagens desse organismo se apresentou da seguinte maneira: O ácido graxo mais abundante foi o linoleico com 35 % seguido do palmitico com 21 %, oleico com 20 % e esteárico com 18 %.

Dentre as diferenças constatadas na produção lipídica dos haplóides MSE e pro A ; paba A ; y A , do diplóide respectivo e dos nove setores obtidos desse diplóide, é interessante observar aqui o seguinte:

a - O ácido pentadecanóico que se apresenta em todos os setores não aparece nem no diplóide que originou os setores tampouco nas linhagens haplóides que deram origem ao diplóide como constatado nas Tabelas 11 e 12. O mesmo ocorre com o ácido pentadecenóico que apenas se verifica no setor 8.



UNICAMP

b - Como constatado na Tabela 8 o ácido insaturação do margárico não se apresenta em nenhum setor estudado em MM suplementado e observando-se a Tabela 12 verifica-se que tal ácido não se apresenta nem no diplóide nem nas linhagens haplóides que originaram o diplóide, quando crescidas em MM suplementado. Porém segundo a Tabela 11 constata-se a ocorrência do ácido insaturação do margárico nas linhagens haplóides crescidas em MC.

c - O ácido esteárico não se apresenta nos nove setores estudados em MM suplementado, o que pode ser verificado na Tabela 8. Porém, segundo observado nas Tabelas 11 e 12 podemos constatar a ocorrência do ácido esteárico tanto no diplóide como nos haplóides, que lhe deram origem, crescidos em MM suplementado (Tabela 12) ou em MC (Tabela 11).

d - Comparando-se a produção lipídica dos setores estudados em MM suplementado, que se encontra na Tabela 8, e dos diplóides e haplóides em MM suplementados observado na Tabela 12, podemos constatar que os ácidos que se mantêm constantes em todas as linhagens estudadas em MM suplementado são: o ácido palmitico, oleico e linoleico.

Monteiro (1984) verificou que os únicos ácidos graxos que se mantinham constantes nas linhagens selvagens, nos haplóides e nos diplóides de *A. nidulans* eram os ácidos palmitoleico, oleico e linoleico.

e - Comparando-se a produção lipídica dos nove setores crescidos em MM suplementado que é encontrado na Tabela 8, dos diplóides e haplóides crescidos em MC observado na Tabela 11, podemos constatar que os ácidos que se mantêm constantes em todas as linhagens estudadas são: palmitoleico, margárico, oleico e linoleico.

Portanto, segundo as Tabelas 8, 11 e 12 constata-se que os ácidos palmítico, oleico e linoleico se apresentam em todas as linhagens independentes do meio de cultura. Já o ácido margárico não se apresenta na linhagem $pro A_1$; $paba A_6$; $y A_1$ quando crescida em MM suplementado.

As diferenças constatadas entre a produção lipídica dos haplóides $pro A_1$; $paba A_6$; $y A_1$ e $bi A_1$; $meth G_1$ em MC e MM suplementado e o diplóide respectivo encontram-se nas Tabelas 9 e 10.

Quanto a composição lipídica do diplóide $pro A_1$; $paba A_6$; $y A_1$ // $bi A_1$; $meth G_1$ crescido em MM e as linhagens que lhe deram origem em MC, que se encontram na Tabela 9, podemos verificar o seguinte:

- a - O diplóide é o único a não apresentar os ácidos mirístico, insaturação do margárico e eicosapolienóico.
- b - O ácido palmitoleico não se apresenta apenas no haplóide $bi A_1$; $meth G_1$.
- c - O ácido miristoleico só aparece no diplóide.
- d - Os seguintes ácidos aparecem tanto nos haplóides como no diplóide: palmítico, margárico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico e o ácido aracdônico não aparece nestas linhagens.



Na tabela 10 encontramos a composição lipídica do diplóide $\rho\sigma A_1$; $\rho\alpha\beta A_6$; γA_1 // $bi A_1$; $meth G_1$ crescidos em MM e as linhagens que lhe deram origem em MM suplementado onde podemos observar:

- a - O ácido mirístico só ocorre no haplóide $\rho\sigma A_1$; $\rho\alpha\beta A_6$; γA_1 .
- b - O ácido margárico só não se apresenta na linhagem $\rho\sigma A_1$; $\rho\alpha\beta A_6$; γA_1 .
- c - Os ácidos insaturação do margárico, eicosapoliênóico e aracdônico não aparecem nem nos haplóides nem nos diplóides.
- d - Os ácidos mirísticos, miristoleico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico ocorrem tanto nos haplóides como no diplóide.

Portanto, segundo as Tabelas 9 e 10 podemos constatar que os ácidos que se apresentam nas linhagens haplóides $\rho\sigma A_1$; $\rho\alpha\beta A_6$; γA_1 e $bi A_1$; $meth G_1$ e no diplóide independentes do meio de crescimento são: palmitico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico.

As diferenças constatadas entre a produção lipídica da linhagem MSE e da linhagem $bi A_1$; $meth G_1$ em MC e MM suplementado, e o diplóide respectivo encontram-se nas Tabelas 13 e 14.

Quanto a composição lipídica do diplóide MSE // $bi A_1$; $meth G_1$ crescido em MM e as linhagens que lhe deram origem crescidas em MC, que se encontram na Tabela 13, podemos verificar o seguinte:

- a - O diplóide é o único a apresentar os ácidos miristoleico, palmitoleico e aracdônico.

- b - Os haplóides são os únicos que apresentam os ácidos insaturação do margárico e mirfístico.
- c - O ácido eicosapolienóico não ocorre na linhagem MSE.
- d - Os seguintes ácidos se apresentam tanto nos haplóides como no diplóide: palmitoleico, margárico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico.

Na Tabela 14 encontramos a composição lipídica do diplóide MSE // bi A ; meth G ¹ ¹ crescido em MM onde podemos observar:

- a - O diplóide ¹ ¹ é o único a apresentar os ácidos eicosapolienóico e aracdônico.
- b - Os ácidos mirfísticos e insaturação do margárico não ocorrem nem nos haplóides nem nos diplóides.
- c - Os ácidos miristoleico, palmítico, palmitoleico, margárico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico aparecem tanto nos haplóides como no diplóide.

Portanto, pela observação das Tabelas 13 e 14 notamos que o ácido aracdônico não se apresenta nem na linhagem MSE nem na linhagem bi A ; meth G ¹ ¹ sejam elas crescidas em MC ou MM suplementado, porém se apresenta no diplóide. Já os ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico apresentam-se tanto nos haplóides crescidos em MC como nos haplóides crescidos em MM suplementado e também no diplóide MSE // bi A ; meth G ¹ ¹.

Revisões feitas por Whitworth e Ratledge (1974) confirmam os dados anteriores, onde constatou-se que a composição lipídica predominante em fungos era a do ácido saturado palmítico e do ácido insaturado oleico.



5.2. Genética da produção de lipídios

Como mencionado anteriormente, as condições ambientais podem influenciar nas características de acumulação lipídica, tanto quantitativamente como na qualidade dos ácidos graxos. Porém também existe um componente genético a ser considerado (Ratledge, 1982).

Buscando uma interpretação genética para os resultados obtidos, nesse trabalho, tentaremos a seguir, discutir alguns esquemas, propostos para a produção lipídica de alguns ácidos graxos apresentados pelas linhagens estudadas.

Tendo em vista a ocorrência do ácido mirístico nos haplóides, diplóides e segregantes podemos propor o seguinte:

A produção do ácido mirístico estaria na dependência de um gene regulador (R) e de um gene estrutural (E), que, possivelmente, produziria uma enzima, que atuaria na síntese do ácido mirístico. O gene regulador (R) seria responsável pela produção de uma substância repressora que agiria sobre o gene estrutural (E). O meio completo deve conter uma substância que inibe a ação do repressor (R) (Figura 2).

A linhagem $\pi\pi A$; $\rho a b a A$; γA provavelmente tem o gene R mutante (R^-).

Essa hipótese pode ser justificada pela presença do ácido mirístico nas 3 linhagens haplóides estudadas em MC (Tabela 6) e na linhagem $\pi\pi A$; $\rho a b a A$; γA em MM suplementado (Tabela 5) e pela ausência de tal ácido nos 3 diplóides estudados em MM (Tabela 7).

Através da análise mitótica (Tabela 16) não foi possível indicar o grupo de ligação desse gene regulador pois os dados são insuficientes para uma conclusão segura.

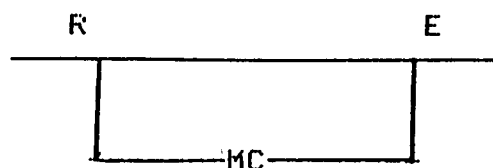


FIGURA 2. Esquema proposto para a análise genética da síntese do ácido Mirístico

Tendo em vista os resultados obtidos de que o ácido margárico se apresenta nas 3 linhagens haplóides estudadas em MC (Tabela 6), nos 3 diplóides estudados em MM (Tabela 7) e nos 9 setores estudados em MM suplementado (Tabela 8), não ocorrendo apenas na linhagem $pro A$; $paA A$; $y A$ quando crescida em MM suplementado, podemos propor o seguinte esquema:

A produção do ácido margárico estaria dependente de um sistema indutivo constituído de um gene estrutural (E), que produziria uma enzima capaz de atuar na síntese do ácido margárico e de um gene regulador (R).

Como constatado nas Tabelas 5 e 6, o ácido margárico apenas não se apresenta na linhagem $pro A$; $paA A$; $y A$ crescida em MM suplementado, sendo coerente, portanto, propor a existência de um gene regulador mutante R^- que não funcione nem em MM suplementado nem em MC e um gene regulador R^+ que funcione em MM suplementado



UNICAMP

mas não funcione em MC. A linhagem $\text{pro } A_1$; $\text{paba } A_6$; γA_1 , poderia então, possuir esse gene R^+ (Figura 3).

Através da análise mitótica (Tabela 16) não foi possível localizar o grupo de ligação desse gene regulador (R). Entretanto a análise dos segregantes (Tabela 8) não mostra incoerência com a hipótese apresentada.

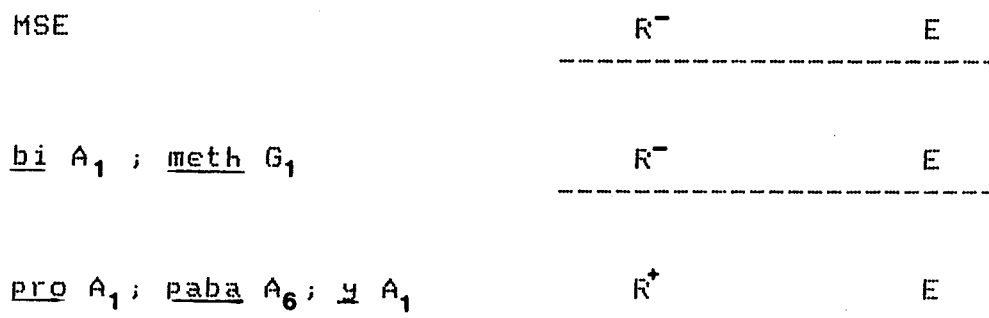


FIGURA 3. Esquema proposto para a análise genética da síntese do ácido Margárico.

TABELA 16: NÚMERO DE SETORES COM RESPECTIVOS MARCADORES GENÉTICOS E ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS.

MARCADORES \ ÁCIDOS	C 14:0	C 14:1	C 15:0	C 15:1	C 16:0	C 16:4	C 17:0	C 17:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:2	C 20:4
	paba ⁺	2	1	5	0	5	5	5	0	0	5	5	1	0
paba ⁻	1	0	4	1	4	4	4	0	0	4	4	0	0	0
w ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
w ⁻	3	1	9	1	9	9	9	0	0	9	9	1	0	0
gal ⁺	2	0	5	0	5	5	5	0	0	5	5	0	0	0
gal ⁻	1	1	4	1	4	4	4	0	0	4	4	1	0	0
pyro ⁺	3	1	7	0	7	7	7	0	0	7	7	1	0	0
pyro ⁻	0	0	2	1	2	2	2	0	0	2	2	0	0	0
fac ⁺	2	1	5	0	5	5	5	0	0	5	5	1	0	0
fac ⁻	1	0	4	1	4	4	4	0	0	4	4	0	0	0
s ⁺	2	1	5	0	5	5	5	0	0	5	5	1	0	0
s ⁻	1	0	4	1	4	4	4	0	0	4	4	0	0	0
nic ⁺	2	1	5	0	5	5	5	0	0	5	5	1	0	0
nic ⁻	1	0	4	1	4	4	4	0	0	4	4	0	0	0
ribo ⁺	2	1	5	0	5	5	5	0	0	5	5	1	0	0
ribo ⁻	1	0	4	1	4	4	4	0	0	4	4	0	0	0

6 RESUMO

Três mutantes auxotróficos de *A. nidulans* foram cruzados entre si obtendo-se três diplóides. Do diplóide MSE // $\underline{p} \underline{p} \underline{p}$ A ; $\underline{p} \underline{p} \underline{p}$ A ; \underline{y} A foram obtidos, por haploidização, nove setores.

As linhagens haplóides foram crescidas em MC e MM suplementado. Os diplóides foram cultivados em MM e os segregantes cresceram em MM suplementado.

A composição lipídica dos organismos estudados foi determinada por cromatografia gasosa, utilizando-se para isso um cromatógrafo CG modelo 37 - D de ionização de chama. As identificações foram baseadas no tempo de retenção e a relativa porcentagem dos ácidos graxos foram determinadas pelas áreas dos picos dos cromatogramas.

As principais diferenças encontradas relacionadas com as influências do meio podem ser observadas em relação ao ácido mirístico que nas linhagens $\underline{p} \underline{p} \underline{p}$ A ; meth G e MSE apenas aparece em MC. Já o palmitoleico só ocorre em MM suplementado nas linhagens MSE e $\underline{p} \underline{p} \underline{p}$ A ; meth G enquanto que o ácido insaturado do margárico só aparece nos haplóides crescidos em MC. O ácido eicosapoliênico também só se encontra nos haplóides $\underline{p} \underline{p} \underline{p}$ A ; $\underline{p} \underline{p} \underline{p}$ A ; \underline{y} A e $\underline{p} \underline{p} \underline{p}$ A ; meth G em MC e no diplóide MSE // $\underline{p} \underline{p} \underline{p}$ A ; meth G .

Alguns ácidos se mantiveram constantes em todas as linhagens estudadas independentes do meio de cultura, são eles: Palmítico, oleico e linoleico o que pode ser uma indicação de uma influência genética na composição lipídica de *A. nidulans*. Uma interpretação genética da produção dos ácidos mirístico e margárico é sugerida.

7. SUMMARY

Three auxotrophic mutants of *A. nidulans* were crossed among themselves, as result we obtained three diploids. From the diploid MSE // pro A₁ ; paba A₆ ; y A₁ were obtained nine sectors by haploidization.

The haploids strains were cultivated in a complete medium and in a minimum supplemented medium. The diploids were grown in a minimum and the segregates grew in a minimum supplemented medium.

The lipid composition of the studied organisms was determined by gaseous chromatography. The instrument used was a CG mod 37-D chromatographer with ionization flame. The identifications were based on the retention time and relative percentage of grease acids was determined by the peak areas on the chromatograms.

The differences found related to the medium can be observed in relation to miristic acid in the hi A₁ ; meth G₁ and MSE strains in complete medium. The palmitoleic occurs in the minimum supplemented medium in the MSE and hi A₁ ; meth G₁. The insaturated acid of margaric only occurs in the haploids grown in complete medium. The C 20:2 acid occurs only in the pro A₁ ; paba A₆ ; y A₁ and hi A₁ ; meth G₁ haploids in complet medium and in diploid MSE // hi A₁ ; meth G₁ .

Some acids remained constant in all strains studied independently from the medium. They are: palmitoleic, linoleic and linolenic which may indicate a genetic influence on the lipids composition of *A. nidulans*. A genetic interpretation of production of acids miristic and margaric is suggested.

8 Referência Bibliográfica

- AZEVEDO, J. L. e COSTA, S. O. P., Exercícios Práticos de Genética. São Paulo, Editora nacional, Ed da Universidade de São Paulo, 1973.
- APIRION, D. 1962. A general system for automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice-versa in microorganism. London, Nature, 192: 959-61.
- BARACHO, I. R. Genética e melhoramento de fungos para a produção de óleos carburantes. In: AZEVEDO, J. L. Genética de microrganismos: em Biotecnologia e Engenharia Genética. Piracicaba, FEALQ, 1985. pt. 2, cap. 19, p. 147 - 154.
- BONATELLI, JR. R. Parassexualidade e Produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, ESALQ / USP, 1981. 92 p. Tese (doutoramento).
- BRENNAN, P. J., GRIFFIN, P. F. S., LIOSEL, D. M. and TYRREL, D. 1974. The lipids of fungi. Progress in Chemistry of Fats and other Lipids 14: 51 - 89.
- BRENNAN, P. J. and LIOSEL, D. M. 1978. Physiology of fungal lipids: selected topics. Advances in Microbiology Physiology 17: 47 -179.

CHRISTIE, W. W. 1982. *Lipid Analysis*. Pergamon Press, Oxford.

CLUTTERBUCK, A. J. 1974. *Aspergillus nidulans*. In *Handbook of Genetics* vol. 1: 477-510. Editado por King, R. C. Plenum Press, London.

CRAIG, G. D. and PEBERDY, J. F. 1983. The effect of S-benzyl- θ , θ -diisopropyl phosphorothioate (IBP) and dicloran on the total lipid, sterol and phospholipids in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology letters* 18 : 11 - 14.

DAS, A., 1972. Strain selection in citric acid fermentation a review. *Current Science*, 41: 593 - 96.

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

DEMAIN, A. L. 1973. The marriage of Genetics and industrial Microbiology - after a long engagement, a bright future.

IN: VANEK, Z; HOSTALEK, Z. and CUDLIN, J. *Genetics of industrial microorganisms*. Amsterdam, Elsevier Publishing Co., p. 19 - 32.

- ELLIOTT, C. G. 1977. Sterols in fungi: their functions in growth and reproduction. *Advances in Microbiology Physiology* 15: 121-173.
- GAD, A. M. and WALKER, T. K. 1954. Mycological formation of fat. I - Mediaconductive to formation of fat from sucrose by *Aspergillus nidulans*, *Penicillium javanicum* and *Penicillium spinulosum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 5: 339 - 43.
- GARRIDO, J. M., GAD, A. M. and WALKER, T. K. 1958. Mycological formation of fat. VI - Synthesis of fat by *Aspergillus nidulans*, *Penicillium javanicum* and *P. spinulosum* in shaken cultures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 9: 728 - 32.
- GARRIDO, J. M. and WALKER, T. K. 1953a. Produccion de grasas por microorganismos. Determinacion de las concentraciones óptimas del sulfato magnesio fosfato sodico y sulfato potásico para la máxima conversion de glucosa en grasa por *A. nidulans*, *P. javanicum*, *P. spinulosum*. *Anales de la Real Sociedad Española de Física y Química* 49b: 839 - 46.
- GARRIDO, M. and WALKER, T. K. 1953b. Produccion de grasas por microorganismos. Estudios de algunos de los factores que afectan la produccion de grasas por *Aspergillus nidulans* en cultivo de superficie. *Anales de la Real Sociedad Española de Física y Química* 49b: 81-90.

- GARRIDO, J. M. and WALKER, T. K. 1956. Mycological formation of fat II - Synthesis of fat from various carbohydrates in surface cultures of *Aspergillus nidulans*, *Penicillium javanicum* and *Penicillium spinulosum* and the influence of the nitrogen source on the synthesis of fat from glucose. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 7: 233 - 37.
- GARRIDO, J. M. and WALKER, T. K. 1958. The mycological formation of fat in cultures grown with agitation and aeration. *Journal of Applied Bacteriology* 21: 291 - 98.
- GARRIDO, J. M., WOODBINE, M. and WALKER, T. K. 1953. Produccion de grasas por microorganismos. Estudio de la acción de diversas concentraciones de magnésio, fósforo y potásio, sobre la formación de grasa por *Aspergillus nidulans*, *Penicillium javanicum* y *Penicillium spinulosum*. *Anales de la Real Sociedad Española de Física y Química* 49b: 829 - 38.
- GREGORY, M. E. and WOODBINE, M. 1953. Microbiological synthesis of fat. The effects of varying pH, temperature, nitrogen, incubation period and sugar concentration on fat producing moulds. *Journal of Experimental Botany* 4: 314 - 18.
- HESSE, A. 1949. Industrial biosynthesis. I - Fats. *Advance in Enzymology* 9: 653-704.

- HOPWOOD, D. A. and MERRICK, M. J., 1977. Genetics of antibiotic production. *Bacteriological Review*, 41 : 595 - 635.
- KRESLING, E. K. and STERN, E. A. 1935. *Proceedings Institute Reserch Food Industry*, 3: 5. apud DAS, A., 1972. Strain selection in citric acid fermentation - a review. *Current Science* 41: 593 - 96.
- KOLESNISKOVA, I. G. and TOLSTIKOVA, G. V. 1984. Fatty acid composition of lipids from *Aspergillus* fungi grown on media with different nitrogen sources. *Mikrobiologiya*, 53 (5): 826 - 29.
- MAHLER, H. R.; NEISS, G. ; SLONIMSKY, P.P. and MACKLER, B. 1964. Biochemical correlates of respiratory deficiency. The level of some unsaponifiable lipids in different strains of baker's yeast. *Biochemistry* 3 (7): 893 - 95.
- McCULLY, K. S. e FORBES, E. 1965. The use of p - fluorophenylalanine with "master strains" of *A. nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research, Cambridge* 6: 352 - 59.
- MESSIAS, C. L. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch). Piracicaba , 1979; 73 p. Tese (doutoramento) , ESALQ / USP.

MONTEIRO, R. T. R. Lipid production and composition in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. Inglaterra, 1984. 142 p. Tese (doutoramento). University of St. Andrews.

MONTEIRO, R. T. R. and MARCUS, I. S. H. 1986. Lipid class composition of *Aspergillus nidulans*. Review Microbiology 17 (2): 99 - 101.

MURRAY, S., WOODBINE, M. and WALKER, T. K. 1953. Microbiological synthesis of fat. The formation of fat from sucrose. Journal of Experimental Botany 4: 251 - 56.

NES, W. R. 1977. The biochemistry of plant sterols. Advances in Lipid Research 15: 233 - 324.

O'LEARY, W. M. 1967. The Chemistry and Metabolism of Microbial lipids. The World Publishing Company New York.

PONTECORVO, G., ROPER, J. A., HEMMONS, L. M., MacDONALD, K. D. and BUFTON, A. W. J. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics 5: 141 - 38.

PRILL, E. A., WENCK, P. R. and PETERSON, W. H. 1935. III - The chimestry of mould tissue. VI - Factors influencing the amount and nature of the fat produced by *Aspergillus fischeri*. Biochemical Journal 29: 21 - 33.

- RATLEDGE, C. 1978. Lipids and fatty acids. In *Economic microbiology - Primary Products of Metabolism*. Vol. 2: 263 - 302. Edited by Rose, A. H. Academic Press, London.
- RATLEDGE, C. 1982. Microbial oils and fats: An assessment of their commercial potential. *Progress in Industrial Microbiology* 16: 119 - 206.
- RIBEIRO DOS SANTOS, M. G. e BARACHO, I. R. 1984. Fatores ambientais e produção de lipídios em *Aspergillus oryzae*. *Ciencia e Cultura* 36 (8): 1411 - 14.
- ROSE, A. H. 1981. Control of lipid metabolism in yeast and fungal growth. *Bulletin of British Mycological Society* 15(supplement): 16 - 17.
- ROPER, J. A. 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8: 14 - 15.
- SANT'ANA, E. P. Alteração na frequência de recombinação mitótica e mutantes resistentes a fungicidas em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, SP. 1984. 63 p. Tese (mestrado). ESALQ - USP.
- SERMOTI, G., 1969. Genetics of antibiotic producing microorganisms. John Wiley e Sons Ltd., London, 398 p.
- SHAPIRO, B. E. and GEALT, M. A. 1982. Ergosterol and lanosterol from *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 128: 1053 - 56.

- SHAW, R. 1966. The polyunsaturated fatty acids of microorganisms. *Advances in Lipid Research* 4: 107-174.
- SINGH, J. and DATT, I. 1957. Synthesis of fat by *Aspergillus nidulans*. I - Changes in the composition of *A. nidulans* fat with sugar concentration in the medium. *Journal of Scientific and Industrial research* 16C: 164-65.
- SINGH, J. and WALKER, T. K. 1956a. Changes in the composition of the fat of *Aspergillus nidulans* with age of the culture. *Biochemical Journal* 62: 286 - 89.
- SINGH, J. and WALKER, T. K. 1956b. Influence of pH of the medium on the characteristics and composition of *Aspergillus nidulans* fat. *Journal of Scientific and Industrial Research* 15C: 222 - 24.
- SINGH, J. and WALKER, T. K. 1956c. Effect of temperature of incubation on the chemical composition of *Aspergillus nidulans* fat. *Research Bulletin of Panjab University* 92: 135 - 38.
- SINGH, J., WALKER, T. K. and MEARA, M. L. 1955. The component fatty acids of the fat of *Aspergillus nidulans*. *Biochemical Journal* 61: 85 - 88.
- THOMAZINI, E. M. Produção de lipídios por mutantes morfológicos da linhagem atípica *Candida lipolytica* 71. Rio Claro, 1981. 144p. Tese (mestrado). Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho".



WASSEF, M. K. 1977. Fungal lipids. *Advances in Lipid Research* 15: 159 - 232.

WEETE, J. D. 1980. *Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms*. Plenum Press, New York.

WHITWORTH, D. A. and RATLEDGE, C. 1974. Microorganisms as a potential source of oils and fats. *Process Biochemistry* 9: 14 - 22.

WOODBINE, M. 1959. Microbial fat: microorganisms as potential fat producers. *Progress in Industrial Microbiology* 1: 181 - 245.

WOODBINE, M.; GREGORY, M. E. and WALKER, T. K. 1951. Microbial synthesis of fat. Preliminary survey of fat-producing moulds. *Journal of Experimental Botany* 2: 204 - 11.