

EVALDO PACHECO SANT'ANA  
ENGENHEIRO-AGRÔNOMO

Instituto de Pesquisa Agropecuária do Oeste

ALTERAÇÃO NA FREQUÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO  
MITÓTICA E MUTANTES RESISTENTES A FUNGICIDAS  
EM *Aspergillus nidulans* [Eidam] Winter

Orientador : Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Dissertação apresentada à Escola Superior  
de Agricultura "Luiz de Quiroz" da Univer-  
sidade de São Paulo, para obtenção do  
título de Mestre

PIRACICABA  
Est. de São Paulo - Brasil  
1974

## AGRADECIMENTOS

Desejamos expressar os nossos agradecimentos à todos aqueles que de uma maneira ou de outra contribuíram na execução deste trabalho e, em particular, aos senhores:

Professor Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO, pela perfeita orientação e incentivo dados durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Professor Dr. ALMIRO BLUMENSCHIN, diretor do Instituto de Genética, pela oportunidade nos dada de realizar o curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

Agradecemos também a Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

## ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1. Ciclos biológicos de <i>Aspergillus nidulans</i> .....	2
2.1.1. Ciclo sexual .....	2
2.1.2. Ciclo parassexual .....	3
2.2. Indução de recombinação mitótica .....	4
2.3. Mutantes resistentes .....	6
2.4. Modo de ação dos fungicidas .....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	8
3.1. Símbolos e fenótipos dos mutantes usados no presente trabalho.....	8
3.2. Linhagens usadas .....	8
3.3. Fungicidas usados .....	9
3.4. Meios de cultura e soluções usadas .....	9
3.4.1. Meio mínimo sólido .....	9
3.4.2. Meio completo sólido .....	10
3.4.3. Meio líquido mínimo com 2% de meio completo .....	10
3.4.4. Meio mínimo-Galactose .....	11
3.4.5. Meio de acetato de amônio .....	11
3.4.6. Solução de vitaminas .....	11
3.4.7. Ácido nucléico de leveduras hidrolizado .....	12
3.4.8. Solução de salina 0,15 M .....	12
3.4.9. Solução de Tween .....	12
3.4.10. Solução de fungicidas .....	12
3.5. Técnicas gerais empregadas .....	13
3.5.1. Preparo de suspensão de conídios .....	13
3.5.2. Semeadura e incubação .....	13
3.5.3. Determinação das curvas de sobrevivência .....	13
3.5.4. Determinação da frequência de recombinação mitótica .....	14

	<u>Página</u>
3.5.5. Determinação da ploidia dos setores segregantes .....	14
3.5.6. Isolamento de mutantes resistentes .....	15
3.6. Análise genética .....	15
3.6.1. Heterocários .....	15
3.6.2. Análise através do ciclo parassexual .....	15
3.6.2.1. Obtenção de diplóides .....	16
3.6.2.2. Uso da p-fluorofenilalanina (pFA) na indução de segregação somática .....	16
3.6.2.3. Mapeamento dos genes que conferem resistência aos fungicidas .....	16
3.6.3. Análise meiótica .....	17
3.6.4. Teste de heterocário .....	18
3.7. Cálculos e análises estatísticas .....	18
4. RESULTADOS .....	20
4.1. Curva de sobrevivência .....	20
4.1.1. Fungicida CLORONEB .....	20
4.1.2. Fungicida DODINE .....	20
4.1.3. Fungicida VITAVAX .....	20
4.2. Recombinação mitótica .....	28
4.2.1. Fungicida CLORONEB .....	28
4.2.2. Fungicida DODINE .....	28
4.2.3. Fungicida VITAVAX .....	31
4.3. Mutantes resistentes: Características e análise genética ..	39
4.3.1. Fungicida CLORONEB .....	39
4.3.2. Fungicida DODINE .....	42
4.3.3. Fungicida VITAVAX .....	44
4.3.4. Frequência de mutantes resistentes .....	44
5. DISCUSSÃO .....	50
5.1. Recombinação mitótica .....	50
5.1.1. Fungicida CLORONEB .....	50
5.1.2. Fungicida DODINE .....	51

	<u>Página</u>
5.1.3. Fungicida VITAVAX .....	52
5.2. Mutantes resistentes .....	53
5.2.1. Frequência de mutantes resistentes .....	55
6. RESUMO E CONCLUSÕES .....	56
7. SUMMARY .....	58
8. BIBLIOGRAFIA CITADA .....	59

## 1 - INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

É sabido que o processo de recombinação mitótica denominado de CICLO PARASSEXUAL, descoberto por PONTECORVO e ROPER (1952) no fungo Aspergillus nidulans (Eidam) Winter, também ocorre em numerosas espécies de fungos fitopatogênicos. TINLINE e MACNEILL (1969) apresentam uma revisão sobre a ocorrência do ciclo parassexual em fungos fitopatogênicos, onde podemos encontrar mais de duas dezenas de espécies que apresentam este processo de recombinação mitótica.

Trabalhos experimentais usando agentes físicos como a luz ultra-violeta (WOOD e KAUFER, 1969; HOLLIDAY, 1961), ou agentes químicos como aldeído fórmico, nitrogênio mostarda (FRATELLO, MORPURGO e SERMONTI, 1960; MORPURGO e SERMONTI, 1959), agentes alquilantes (MORPURGO, 1963), tem demonstrado que este processo de recombinação mitótica pode ter sua frequência aumentada, quando esporos diplóides do fungo são tratados com estes agentes e, em consequência, novas raças fisiológicas podem surgir como verificou BUXTON (1956) em Fusarium. Assim, torna-se importante verificar se fungicidas normalmente utilizados para o controle de fungos, são capazes de aumentar a frequência de recombinação mitótica, o que poderia facilitar a emergência de novas raças fisiológicas.

Outro aspecto que será considerado é o que diz respeito a frequência de mutantes resistentes a esses fungicidas, devido a sua importância para futuros estudos genéticos, bioquímicos e aplicados.

Apesar de não ser fitopatogênico, o fungo filamentosso Aspergillus nidulans foi escolhido pela facilidade que nos oferece para estudos do ponto de vista genético, tais como, facilidade de obtenção de mutantes e existência de diplóides onde a recombinação mitótica é facilmente visualizada. Além disso os dados obtidos com o A. nidulans servirão não só para o enriquecimento da genética deste fungo, como também, eventualmente, poderão ser extrapolados para outras espécies.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura será dividida em quatro itens a saber:

- a) Ciclos biológicos do Aspergillus nidulans
- b) Indução de recombinação mitótica
- c) Mutantes resistentes
- d) Modo de ação dos fungicidas

### 2.1. Ciclos biológicos do Aspergillus nidulans

#### 2.1.1. Ciclo sexual

Sobre o ciclo sexual será feito um resumo baseado nos trabalhos de PONTECORVO, ROOPER, HEMMONS, MACDONALD e BUFTON (1953).

O micélio do A. nidulans é formado por células multinucleadas. Algumas dessas células podem se diferenciar (células podais), dando origem a conidióforos, que terminam por uma vesícula globosa também multinucleada. Da superfície desta vesícula globosa saem os esterígmas primários, cada um produzindo dois ou mais esterígmas secundários. Cada esterígma secundário dá origem a uma cadeia de conídios uninucleados, sendo que, os conídios mais jovens estão sempre na base dessas cadeias. Tanto o esterígma primário como o secundário são também uninucleados. Sendo originados do único núcleo do esterígma, todos os conídios de uma cadeia possuem o mesmo tipo de núcleo.

É comum a ocorrência de fusão de hifas de um mesmo micélio, mas em geral os heterocários são resultantes da fusão de hifas de linhagens diferentes. O A. nidulans apresenta corpos de frutificação (Cleistotécios), que depois de 8 a 10 dias de incubação da cultura a 37°C apresentam-se maduros.

Eles são redondos, de coloração escura e contendo cerca de  $10^5$  ascos no seu interior. No interior de cada asco encontram-se 8 células

provenientes de um processo cariogâmico, que dá origem ao zigoto. Este sofreu divisão meiótica, produzindo 4 células haplóides que por sua vez se dividiram mitoticamente, resultando as 8 células. Essas células são chamadas de ascósporos, são binucleadas e possuem coloração castanho avermelhada.

### 2.1.2. Ciclo parassexual

ROPER (1952) observou que, além do ciclo sexual, um outro ciclo ocorria concomitantemente ao ciclo sexual em *A. nidulans*. Este outro ciclo foi denominado de parassexual por PONTECORVO (1954), e sua ocorrência envolve três etapas: aparecimento de diplóides em linhagens normalmente haplóides, recombinação mitótica e haploidização.

O ciclo parassexual inicia-se com a formação de heterocário, seguindo-se a fusão, rara mas regular, de núcleos haplóides dentro das hifas. Formam-se desta maneira núcleos diplóides que darão origem a conídios diplóides. Apenas 1 em cada  $10^7$  conídios de um heterocário são diplóides (ROPER, 1952). Esses diplóides quando isolados, são relativamente estáveis, porém podem dar origem a recombinantes através de eventos que ocorrem durante a mitose.

São três os processos conhecidos que podem dar recombinantes a partir de diplóides:

#### a) Permuta mitótica

De modo esporádico, ocorrem permutas mitóticas no estágio de 4 fios em diplóides (ROPER e PRITCHARD, 1955). Essa permuta mitótica fica geralmente confinada à apenas um braço de um cromossomo, e faz com que fiquem homozigotos todos os genes em associação e distais em relação ao ponto de permuta. Genes proximais ao ponto de permuta, no outro braço do mesmo cromossomo, ou ainda em outros cromossomos, permanecem heterozigotos (PONTECORVO e KAFER, 1958).

#### b) Não-disjunção mitótica

A ocorrência de não-disjunção mitótica, dá como resultado um núcleo homozigoto para um ou mais pares de cromossomos homólogos, porém

heterozigotos para outros pares (PONTECORVO e KAPER, 1958).

### c) Haploidização

Haplóides podem se originar a partir de diplóides, através de aneuploidia, com perdas sucessivas de cromossomos até que o estado haplóide estável seja atingido (KAFFER, 1960).

## 2.2. Indução de recombinação mitótica

O estudo da indução de recombinação mitótica em diplóides, através do uso de agentes físicos ou químicos, já foi realizado em algumas espécies de fungos. Foi observado por IKEDA, ISHITANI e NAKAMURA (1957) um aumento na segregação mitótica, quando diplóides de Aspergillus oryzae eram tratados com a luz ultra violeta. Em Ustilago maydis alta proporção de segregantes foi obtida quando se tratou diplóides heterozigotos com luz ultra-violeta. As evidências observadas, indicam que a luz ultra-violeta age iniciando o pareamento de regiões homólogas dos cromossomos, e que a proporção de células nas quais isso ocorre, e possivelmente o comprimento da região pareada, aumenta com o aumento da dose (HOLLIDAY, 1961).

HOLLIDAY (1964) concluiu que a capacidade de certos agentes em aumentar a frequência de recombinação mitótica, está relacionada com a capacidade destes agentes em inibir a síntese de DNA, como ocorre com o antibiótico Mitomicina C em Ustilago maydis e Saccharomyces sp.

ESPOSITO e HOLLIDAY (1964) tratando células diplóides de Ustilago maydis, de populações sincronizadas e não sincronizadas, com 5-fluorodeoxiuridina verificaram que, na primeira, a resposta com relação ao grupo de inibição de síntese de DNA era mais pronunciada e que esta inibição temporária, induzia a recombinação mitótica. Sugeriram que a inibição da síntese de DNA produz um estado de desenvolvimento não balanceado nas células, o qual favoreceria o pareamento de cromossomos homólogos e subsequente recombinação.

MORPURGO e SERMONTI (1959) obtiveram acentuado aumento na proporção de segregantes, quando conídios diplóides de Penicillium chrysogenum foram tratados com metil-bis (-cloroetil) amina (HN-2).

No caso específico do fungo Aspergillus nidulans, podemos nos referir aos dados de FRATELLO, MORPURGO e SERMONTI (1960), que estudaram a ação de três agentes mutagênicos: formaldeído, nitrogênio mostarda e luz ultra-violeta, em diplóides de A. nidulans. Verificaram que os agentes químicos formaldeído e nitrogênio mostarda, produziam acentuado aumento na segregação somática, enquanto que a luz ultra-violeta teve menor efeito. O formaldeído aumentou notavelmente a frequência de recombinantes, devido a permuta mitótica, e com o aumento da dose, ocorria um aumento de segregantes resultantes da não disjunção e segregantes haplóides.

WOOD e KAFER (1969) verificaram um aumento de segregantes mitóticos, quando diplóides de A. nidulans foram tratados com a luz ultra violeta. Um ligeiro aumento ocorria, quando os conídios tratados eram dormentes, enquanto que um aumento drástico ocorria, quando os conídios tratados estavam germinando.

Estudos visando comparar a capacidade de induzir mutações e induzir permuta mitótica, foi feito por MORPURGO (1963) usando agentes alquilantes em A. nidulans, e os resultados obtidos demonstraram que a capacidade mutagênica de um composto, nada tem a ver com sua capacidade de induzir a recombinação mitótica.

Um estudo com o fungicida benlate foi feito por HASTIE (1970), que verificou ser este capaz de alterar radicalmente a estabilidade de diplóides de A. nidulans. Observou que os setores recombinantes eram mais numerosos nos tratamentos com benlate e, além disso, esses setores ocupavam maior área dentro da colônia, indicando que a segregação ocorria nos estágios iniciais do desenvolvimento da colônia. Poucos setores segregantes espontâneos eram haplóides, e grande proporção de setores formados em 0,5% de benlate eram haplóides. Aparentemente, o benlate não só induziu a formação de segregantes, como também aumentou significativamente a proporção de setores haplóides.

### 2.3. Mutantes resistentes

Referências com relação a mutantes resistentes, de fungos fitopatogênicos, aos fungicidas usados no presente trabalho podem ser encontradas nos trabalhos desenvolvidos por MACNEILL e SABANAYAGAM (1968), KAPPAS e GEORGOPOULOS (1970) e TILLMAN e SISLER (1971).

No caso específico de *A. nidulans*, mutantes resistentes a vários agentes inibidores (actidiona, p-fluorfenilalanina, teoquil, iodoacetato e verde malaquita), foram isolados por WARR e ROOPER (1965).

THRELFALL (1968) isolou mutantes de *A. nidulans* resistentes aos fungicidas PCNB e TCNB. Esta resistência era dada por dois genes recessivos, localizados no grupo de ligação III. A resistência desses mutantes aos fungicidas TCNB e PCNB, foi considerado como sendo devido a um decréscimo na capacidade dos mutantes em acumular a substância tóxica, e não na capacidade dos mesmos em metabolizar essas substâncias em produtos inofensivos.

Noves mutantes de *A. nidulans* resistentes ao fungicida benlate, foram isolados por HASTIE e GEORGOPOULOS (1971). Cinco mostraram serem mais resistentes, estando o gene para essa resistência localizado no grupo de ligação VIII. Os demais menos resistentes, tinham o gene para a resistência localizado no grupo de ligação II.

TUYL, DAVIDSE e DEKKER (1973) também isolaram mutantes de *A. nidulans* resistentes ao benomil (benlate) e tiabendazol, através tratamento prévio de conídios com luz ultra-violeta. Em ambos os casos, o gene para resistência estava localizado no grupo de ligação VIII. Os autores propõem que esses fungicidas interferem na formação do fuso, através de complexos formados entre os fungicidas e proteínas do fuso, o que resulta na inibição da mitose.

### 2.4. Modo de ação dos fungicidas

Referências com relação aos mecanismos envolvidos na ação fungitóxica dos fungicidas usados neste trabalho, foram encontrados nos

trabalhos de BROWN e SISLER (1960). Esses autores, estudando o modo de ação do fungicida DODINE, concluíram que alterações na permeabilidade da parede celular que resulta na perda de constituintes celulares vitais, e também, a inativação de certas enzimas responsáveis pelo metabolismo de carboidratos, parecem ser os mecanismos através dos quais este fungicida exerce seu efeito tóxico em Saccharomyces pastorianus.

BARTZ e MITCHELL (1970) sugerem que a desintoxicação metabólica pode ser o mecanismo pelo qual o fungo Fusarium solani f. sp. phaseoli é resistente ao fungicida DODINE.

HOCK e SISLER (1969) utilizando o fungo Rhizoctonia solani, observaram que o fungicida CLORONEB, entre outras maneiras, age inibindo direta ou indiretamente a síntese de DNA, devido a sua ação em impedir a incorporação de timidina. Esta ação é tão pronunciada que se pode esperar a cessação de desenvolvimento do organismo.

Os compostos derivados de 1-4 oxathiin (VITAVAX e F 461) mostraram ser particularmente efetivos no controle de fungos fitopatogênicos, tais como, Puccinia rubigovera tritice (Eriks) Carleton, Uromyces phaseole typica Arth., Ustilago nuda (Fens) Rostr. e Rhizoctonia solani Kilm., sem causarem injúrias nas plantas (SCHMELING e KULKA, 1966).

Alta toxicidade do fungicida VITAVAX à algumas espécies de Aspergillus, foi observado por EDGINGTON e BARRON (1967). Entre essas espécies incluíram-se os A. niger e A. fumigatus, que são causadores de aspergilose em homem e animais.

MATHRE (1968) usando o fungicida derivados de oxatiin, observou que as espécies sensíveis (Rhizoctonia solani e Ustilago maydis) absorveram mais rapidamente os fungicidas, enquanto que as espécies resistentes (Fusarium oxysporum f. sp. lycopersice e Saccharomyces cerevisiae) absorveram muito pouco de ambos fungicidas. É sugerido pelo autor que a especificidade aos fungicidas, pode ser relacionada com a absorção e acúmulo nas organelas celulares, nas espécies sensíveis.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Símbolos e fenótipos dos mutantes usados no presente trabalho

<u>Símbolos Nutricionais</u>	<u>Fenótipos</u>
<u>ad 20</u>	requerimento para adenina
<u>bi 1</u>	requerimento para biotina
<u>meth 1</u>	requerimento para metionina
<u>nic 8</u>	requerimento para ácido nicotínico
<u>piro 4</u>	requerimento para piridoxina
<u>ribo 2</u>	requerimento para riboflavina
<u>s 3</u>	requerimento para tiosulfato de sódio
<u>Morfológicos</u>	
<u>w</u>	conídios brancos
<u>y</u>	conídios amarelos
<u>Outros</u>	
<u>su 1 ad 20</u>	supressor de adenina
<u>gal 1</u>	incapaz de crescer em meio com galactose como fonte de carbono
<u>fac 303</u>	incapaz de crescer em meio com acetato como fonte de carbono

#### 3.2. Linhagens usadas

No presente trabalho foram utilizadas tres linhagens fornecidas pelo Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em Piracicaba:

a) Linhagem bi 1 ; meth 1

Esta linhagem apresenta conídios verdes e deficiência para a síntese de biotina (bi 1) e metionina (meth 1)

b) Linhagem MSE (Master Strain E)

Esta linhagem descrita por McCULLY e FORBES (1965), possui genes marcadores nos oito cromossomos, apresentando a seguinte constituição:

<u>Grupo de ligação</u>	<u>Gene</u>
I	<u>su 1 ad 20, y, ad 20</u>
II	<u>w</u>
III	<u>gal 1</u>
IV	<u>pyro 4</u>
V	<u>fac 303</u>
VI	<u>s 3</u>
VII	<u>nic 8</u>
VIII	<u>ribo 2</u>

c) Diplóide heterozigoto bi 1//MSE

Resultante do cruzamento entre a linhagem bi 1 (deficiente para a síntese de biotina) e a linhagem MSE.

3.3. Fungicidas usados

Os fungicidas que serão usados neste trabalho são o 1,4-dicloro-2,5 dimetoxil benzeno (CLORONEB), acetato de n-dedecilguanidina (DODINE) e 2,3-dihidro-5-carboxanilido-6-metil-1,4, oxatiin (VITAVAX). Os fungicidas CLORONEB e VITAVAX são sistêmicos e eficientes no controle de diversas espécies de fungos fitopatogênicos (VON SCHMELING e KULKA, 1966; EDGINGTON, WALTON e MILLER, 1966; EDGINGTON e BARRON, 1967; DARRAG e SINCLAIR, 1969). O DODINE é um não sistêmico empregado com eficiência no controle de Sarna de macieira e pereira, e também no controle de Mancha Folhar de cereja (GALLI, TOKESHI, DE CARVALHO, BALMER, KIMATI, CARDOSO e SALGADO (1968).

3.4. Meios de cultura e soluções usadas

3.4.1. Meio mínimo sólido (PONTECORVO e col., 1953)

Nitrato de sódio	6,0 gramas
Cloreto de potássio	0,52 gramas
Sulfato de magnésio 7H <sub>2</sub> O	0,52 gramas
Fosfato dihidrogenado de potássio	1,52 gramas
Sulfato de Ferro	traços
Sulfato de Zinco	traços
Glicose	10,0 gramas
Agar (oxid nº 3)	15,0 gramas
Água destilada	1 litro

O pH foi ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico.

#### 3.4.2. Meio completo sólido (PONTECORVO, e col., 1953)

O meio completo constituiu-se de meio mínimo, no qual foi adicionado:

Peptona (Oxoid)	2,00 gramas
Extrato de leveduras	0,50 gramas
Caseína hidrolizada	1,50 gramas
Ácido nucléico de leveduras hidrolizado (solução)	2,50 ml
Solução de vitaminas	1,00 ml

Água destilada completando 1 litro, sendo o pH ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico.

Os meios eram autoclavados a uma atmosfera de pressão, numa temperatura de 120°C, durante 15 minutos, e guardados em lugar fresco e es curo.

#### 3.4.3. Meio mínimo líquido com 2% de meio completo

Este meio foi preparado adicionando-se à 98 ml de meio míni mo líquido (sem ágar), 2 ml de meio completo líquido (sem ágar).

3.4.4. Meio mínimo-Galactose (ROBERTS, 1959)

Foi preparado da mesma forma que o meio mínimo, substituindo a glicose por galactose, sendo o pH = 5,0.

3.4.5. Meio de Acetato de amônio (APIRION, 1962)

Acetato de amônio	12,0 gramas
Cloreto de sódio	2,0 gramas
Sulfato de magnésio 7H <sub>2</sub> O	0,5 gramas
Fosfato dihidrogenado de potássio	3,0 gramas
Sulfato de Ferro	traços
Sulfato de Zinco	traços
Agar (Oxoid nº 3)	15,0 gramas

Adicionou-se água destilada até completar 1 litro, sendo o pH ajustado para 6,1 com hidróxido de amônio ou ácido clorídrico.

O meio foi autoclavado a uma atmosfera de pressão, durante 15 minutos, e guardado em lugar fresco e escuro.

3.4.6. Solução de vitaminas

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

Esta solução foi esterilizada em vapor fluente por 15 minutos, repetindo-se esta operação durante três dias, sendo então a solução guardada em frasco escuro, no refrigerador.

#### 3.4.7. Ácido nucléico de leveduras hidrolizado

Colocou-se 2,0 gramas de ácido nucléico de leveduras em 15 ml de solução normal de ácido clorídrico e 2,0 gramas do mesmo ácido nucléico de leveduras em 15 ml de solução normal de hidróxido de sódio. As soluções foram aquecidas a 100°C durante 20 minutos e, em seguida, misturadas. O pH foi ajustado a 6,0, e a solução resultante foi filtrada a quente. O volume foi ajustado para 40 ml, e a preparação foi guardada no refrigerador sob clorofórmio.

#### 3.4.8. Solução salina 0,15 M

Cloreto de sódio foi dissolvido em água destilada para uma solução 0,89% e, em seguida, a solução foi autoclavada.

#### 3.4.9. Solução de Tween

Foi dissolvido Tween 80 em água destilada para dar uma concentração final de 0,1% (v/v). A solução foi autoclavada e conservada no refrigerador.

#### 3.4.10. Soluções de Fungicidas

As soluções de fungicidas utilizados no presente trabalho foram sempre preparadas no momento do uso.

Os fungicidas foram pesados em balanças de alta precisão, sendo que os materiais necessários ao preparo das soluções tais como espátulas, frascos, pipetas, água destilada, etc. eram esterilizados convenientemente.

Após pesar a quantidade necessária, o fungicida era transferido para um frasco esterilizado de vidro (30 ml), no qual era adicionado um volume necessário de água destilada e esterilizada. Agitava-se bem o frasco até completa dissolução do fungicida, e a solução assim preparada era imediatamente usada.

### 3.5. Técnicas gerais empregadas

#### 3.5.1. Preparo de suspensão de conídios

Com uma alça de platina flambada transferia-se conídios para um tubo de ensaio contendo 2 ml de solução de Tween. O tubo era agitado fortemente em agitador mecânico ou manualmente, a fim de promover a desagregação das cadeias de conídios.

Por meio de um hemocitômetro se determinava o número de conídios existente em 1 ml de suspensão.

Por meio de diluições, pipetando-se volume necessário e conhecido de suspensões em 9 ml de salina, chegava-se à concentração desejada de conídios.

#### 3.5.2. Semeadura e Incubação

Em cada placa era semeado 0,1 ml da suspensão de conídios de concentração conhecida. Cada placa de Petri possuía um papel de filtro esterelizado em sua tampa, com a finalidade de absorver o excesso de umidade. Para espalhar a suspensão na superfície do meio de cultura, usou-se um espalhador de vidro que era flambado cuidadosamente no momento do uso.

Durante todo o desenvolvimento do trabalho usou-se uma temperatura de incubação de 37°C.

#### 3.5.3. Determinação das curvas de sobrevivência

Em placas contendo meio completo adicionado de fungicida, em diferentes doses, foram semeados conídios da linhagem bi 1; meth 1 usando-se sempre duas repetições para cada tratamento.

As concentrações de fungicida usadas foram as seguintes:  
Fungicida CLORONEB: 0 - 10 - 20 - 40 - 80 - 160 - 320 - 640 ug/ml  
Fungicida DODINE: 0,0 - 0,25 - 0,50 - 1,00 - 2,00 - 4,00 - 8,00 ug/ml  
Fungicida VITAVAX: 0 - 10 - 20 - 40 - 80 - 160 - 320 - 640 ug/ml

Após o período de incubação de 3 ~ 7 dias, foi contado o número de colônias formadas em cada tratamento. As curvas de sobrevivência foram construídas usando o número de colônias formadas em cada repetição de cada tratamento.

#### 3.5.4. Determinação da frequência de recombinação mitótica

Uma suspensão em tween, de conídios diplóides originados da linhagem bi//MSE, foi preparado de modo a conter cerca de  $2 \times 10^6$  conídios por mililitro. Com o auxílio de um fio de platina era feita uma única inoculação no centro da placa contendo meio completo e fungicida.

As doses de fungicidas eleitas, foram aquelas que permitiam o desenvolvimento das colônias em um período de tempo satisfatório, já que, concentrações elevadas provocavam uma inibição no desenvolvimento das colônias e, em certos casos, devido ao longo período em que as placas permaneciam em incubação, ocorria contaminação ou ressecamento do meio de cultura, o que causava a inutilização das placas.

Quando as colônias atingiam um diâmetro médio de 7 centímetros, era feita a contagem do número de setores de coloração branca e amarela existentes em cada placa.

Os setores recombinantes foram classificados em dois grupos:

- a) Grandes setores: todos os setores visíveis a olho nú.
- b) Microsetores: todos os setores visíveis somente através de estereomicroscópio.

#### 3.5.5. Determinação da ploidia dos setores segregantes

Os setores segregantes poderiam apresentar conídios haplóides ou diplóides. A determinação da ploidia desses setores foi feita medindo-se em microscópio cadeias de 5 conídios, montado em lisol diluído (1 : 10), considerando-se que o lisol tende a manter os conídios em cadeias (PONTECORVO, TARR GLOOR e FORBES, 1954). Os conídios diplóides apre-

sentavam um diâmetro de 4 u , enquanto que os haplóides apresentavam 3, 1 u de diâmetro.

### 3.5.6. Isolamento de mutantes resistentes

Com uma alça de platina flambada, transferia-se conídios para uma solução de tween até atingir uma concentração de cerca de  $2 \times 10^6$  conídios por mililitro.

Em placas contendo meio completo adicionado de fungicida, em uma concentração previamente testada e que não permitia o desenvolvimento de colônias sensíveis, era colocado 0,1 ml da suspensão de conídios por placa, espalhando-se com um espalhador de vidro. As colônias que se formavam nesse meio eram ensaiadas quanto à resistência ao fungicida usado.

## 3.6. Análise genética

### 3.6.1. Heterocários

Heterocários foram obtidos no presente trabalho, usando-se o método descrito e discutido por PONTECORVO, ROPER, HEMMONS, MACDONALD e BUFTON (1953).

O método consiste em colocar em tubos contendo 2 ml de meio mínimo líquido mais 2% de meio completo líquido, conídios das linhagens que se quer cruzar. Em seguida agita-se bem os tubos, colocando para incubar durante 72 horas a 37°C. A película que se forma na superfície do meio líquido durante este período é retirada, dividida em quatro partes que são colocados equidistantes na superfície de meio mínimo sólido, em placa de Petri. Após 3-4 dias de incubação há o surgimento de setores heterocarióticos.

### 3.6.2. Análise através do ciclo parassexual

### 3.6.2.1. Obtenção de diplóides

Diplóides heterozigotos originam-se da fusão de núcleos haplóides de constituição genética diferentes.

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

Pela medida do diâmetro dos conídios em microscópio, confirmava-se o caráter diplóide dos mesmos, e esses diplóides assim obtidos foram purificados em meio mínimo.

### 3.6.2.2. Uso de p-fluorofenilalanina (pFA) na indução de segregação somática

O uso de p-fluorofenilalanina para provocar a haploidização em linhagens diplóides de *A. nidulans*, foi descrito por MORPURGO (1961). Esta substância age inibindo o desenvolvimento de setores diplóides, e permitindo o desenvolvimento normal de setores haplóides.

A técnica usada no presente trabalho foi descrita por LHOAS (1961), e consiste em adicionar a pFA diretamente no meio de cultura. Em cada placa de Petri eram feitas quatro inoculações equidistantes, e depois que as colônias se desenvolviam, os setores haplóides eram transferidos para uma placa mestra com 26 colônias na formação 5x5+1 (AZEVEDO, 1966).

### 3.6.2.3. Mapeamento dos genes que conferem resistência aos fungicidas

Após o desenvolvimento na placa mestra, as colônias eram transferidas para outra placa contendo meio completo e fungicida na dose usada para isolar os mutantes resistentes. A transferência era feita utilizando-se um replicador que constitui de uma base de madeira, na qual se

prendem 26 agulhas de platina de comprimento uniforme. As agulhas foram colocadas de modo correspondente às posições das colônias na placa mestra. As agulhas do replicador eram flambadas antes de serem usadas e resfriadas em placa de Petri contendo meio mínimo.

Todas as colônias tanto sensíveis como resistentes aos fungicidas, eram ensaiadas para os requisitos nutricionais. Para isso preparava-se uma série de placas, contendo meio mínimo suplementado com as substâncias requeridas pelas linhagens paternas, menos um dos requisitos. Desta maneira determinou-se em que grupo de ligação se achava o gene responsável pela resistência ao fungicida.

### 3.6.3. Análise meiótica

O método usado no presente trabalho foi descrito por PONTECORVO, ROPER, HEMMONS, MACDONALD e BUFTON (1953), e consiste no preparo normal de heterocários em placas de Petri contendo cerca de 40 ml de meio mínimo. As placas foram vedadas com fita celulósica, pois tal procedimento favorece a formação de corpos de frutificação, provavelmente devido a uma anaerobiose parcial.

Após 10 dias de incubação, verificou-se a formação de cleistotécios. Cleistotécios maduros e de maior volume foram transferidos para placa de Petri contendo agar a 3%, usando-se para isso uma agulha de platina. Nesta superfície sólida, através do rolamento do cleistotécio, retirou-se conídios e células de "Hulle" que rodeiam estes corpos de frutificação. Cleistotécios limpos foram transferidos individualmente para tubos de ensaios contendo 0,5 ml de solução salina, e esmagados contra as paredes dos mesmos, usando-se para isso uma pipeta de 1 ml. A mesma pipeta foi usada para remover os ascósporos aderidos nas paredes dos tubos e suspendê-los na solução salina. A suspensão de ascósporos foi transferida para frasco contendo 9,5 ml de salina, completando desta maneira um volume de 10 ml. Desta suspensão foram semeadas alíquotas de 0,1 ml em meio completo, o que permitia verificar se o cleistotécio era híbrido ou não. O restante de cada uma das suspensões foi mantida em refrigerador a 4°C.

### 3.6.4. Teste de heterocário

Para verificar se a resistência aos fungicidas dos mutantes isolados era devida à fatores nucleares ou citoplasmático, foram feitos testes de heterocário (JINKS, 1954) realizados da seguinte maneira: Uma suspensão de conídios de heterocário resultante do cruzamento entre o mutante resistente e a linhagem MSE, era preparada de modo a conter  $5 \times 10^2$  conídios por mililitro. Em placas contendo meio completo adicionado de fungicida na mesma concentração usada para isolar o mutante resistente, era semeado 0,1 ml da suspensão de conídios por placa. Se ocorresse apenas a germinação de conídios da linhagem original resistente, isso era uma indicação de que a resistência era controlada por fator ou fatores nucleares. Caso não ocorresse germinação de conídios ou ocorresse a germinação de conídios de ambas linhagens, isso dava uma indicação de que a resistência era controlada por fator ou fatores citoplasmáticos.

### 3.7. Cálculos e análises estatísticas

Na análise estatística do número dos diferentes tipos de setores obtidos, foi usado o teste de  $\chi^2$  calcula pela seguinte fórmula (GRANER, 1966):

$$\chi^2 = \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

onde,

$f_o$  = frequência observada

$f_e$  = frequência esperada

O valor de recombinação (c) foi calculado pela seguinte fórmula (AZEVEDO, 1972):

$$c = \frac{\text{nº de recombinantes}}{\text{nº total ascosporos}}$$

O desvio padrão (s) foi calculado pela fórmula (ROSATO, 1973):

$$s = \frac{p(1-p)}{N}$$

onde,

$p$  = frequência de recombinantes

$N$  = número total de ascosporos

#### 4. RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Curva de sobrevivência

#### 4.1.1. Fungicida CLORONEB

As colônias que se formavam a partir de conídios da linhagem bi 1; meth 1, apresentavam desenvolvimento muito lento, mesmo nas doses baixas (até 40 ug/ml), tendo após sete dias de incubação não mais que 6 milímetros de diâmetro em média. Entretanto apesar desta ação pronunciada do fungicida, a percentagem de germinação até a dose de 80 ug/ml era praticamente de 100% como mostra a Tabela I e Figura 1.

Somente na dose 160 ug/ml ocorreu uma acentuada diminuição de germinação (54%). As colônias que se formavam em doses superior a 80 ug/ml não produziã conídios, e após atingir no máximo 2 centímetros de diâmetro cessavam de se desenvolver.

#### 4.1.2. Fungicida DODINE

Em presença deste fungicida as colônias que se formavam apresentavam morfologicamente idênticas às formadas nas testemunhas, inclusive com relação à produção de conídios. Na dose de 4 ug/ml não havia formação de colônias. Notou-se também, que com o aumento da dose de fungicida, a percentagem de germinação de conídios reduzia-se lentamente sendo que, na dose de 2 ug/ml, ela caia bruscamente para 19% (Tabela II e Figura 2).

#### 4.1.3. Fungicida VITAVAX

Em doses baixas (até 40 ug/ml) as colônias se desenvolviam quase que normalmente apresentando, no entanto, crescimento mais lento e coloração verde mais escura que a testemunha. Em doses altas (80 ug/ml em diante) as colônias tinham seu desenvolvimento inibido, não atingindo mais que alguns milímetros de diâmetro, sendo que na dose de 160 ug/ml as colônias formavam apenas pequenos pontos.

Com o aumento da dose de fungicida, havia uma acentuada queda na percentagem de germinação, atingindo um mínimo de 18% de conídios germinados nas doses de 160 ug/ml (Tabela III e Figura 3).

TABELA I - Porcentagem de sobreviventes da linhagem bi 1; meth 1, tratada com fungicida CLORONEB.

Doses (ug/ml)	Nº colônias formadas	Média	%
0	80	74,5	100
	69		
10	69	64,5	87
	60		
20	84	73,5	99
	63		
40	42	67,5	91
	93		
80	69	70,5	95
	72		
160	42	40,0	54
	38		
320	0	0	0
	0		

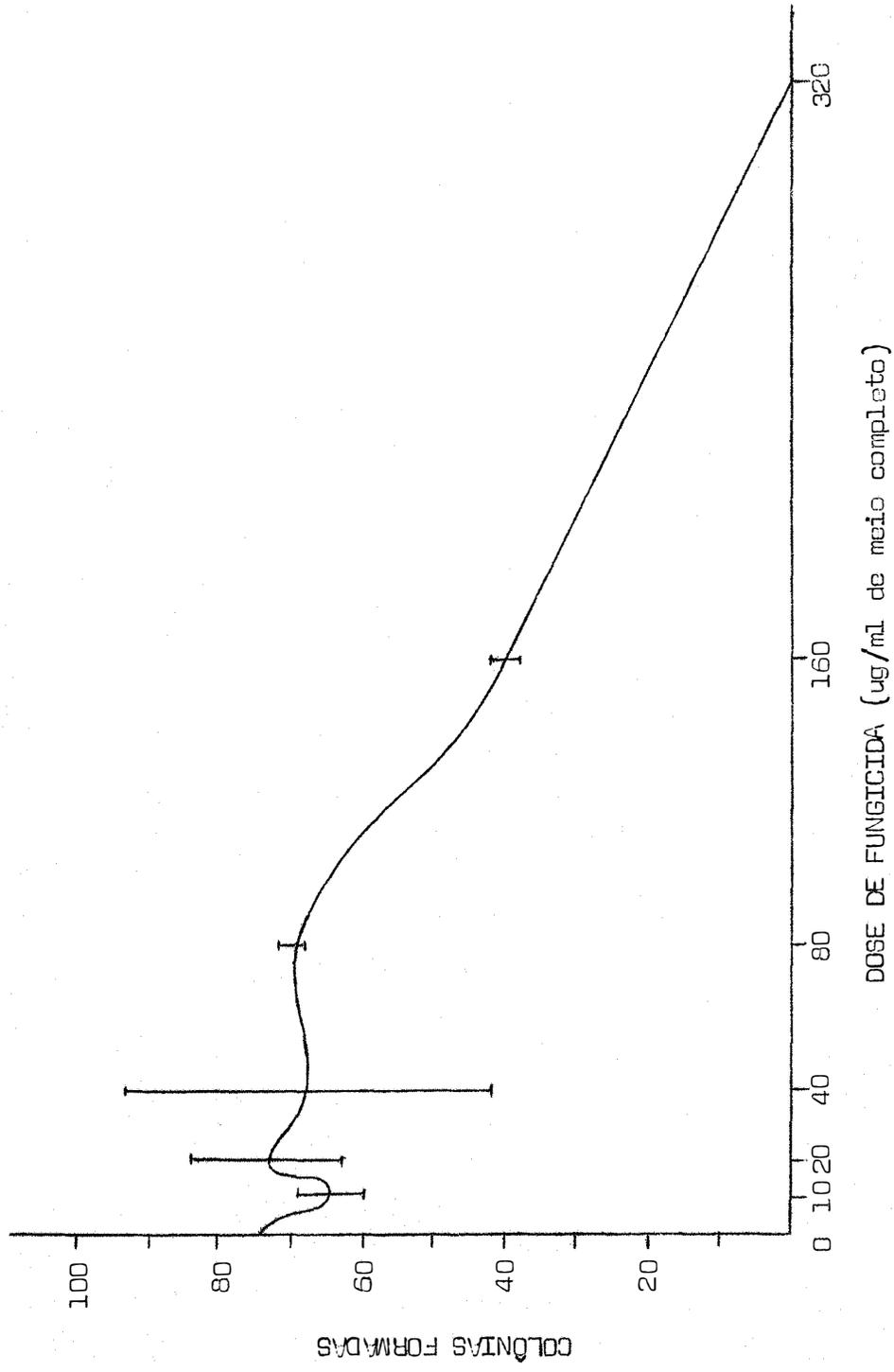


FIGURA 1 - Curva de sobrevivência da linhagem b.1.; meth 1 tratada com fungicida CLORONEB.

TABELA II -- Percentagem de sobreviventes da linhagem bi 1; meth 1 tratada com fungicida DODINE.

Doses (ug/ml)	Nº colônias formadas	Média	%
0	80	79,5	100
	79		
0,25	70	65	82
	60		
0,50	54	61	77
	68		
1,0	52	57	72
	62		
2,0	14	15	19
	16		
4,0	0	0	0
	0		

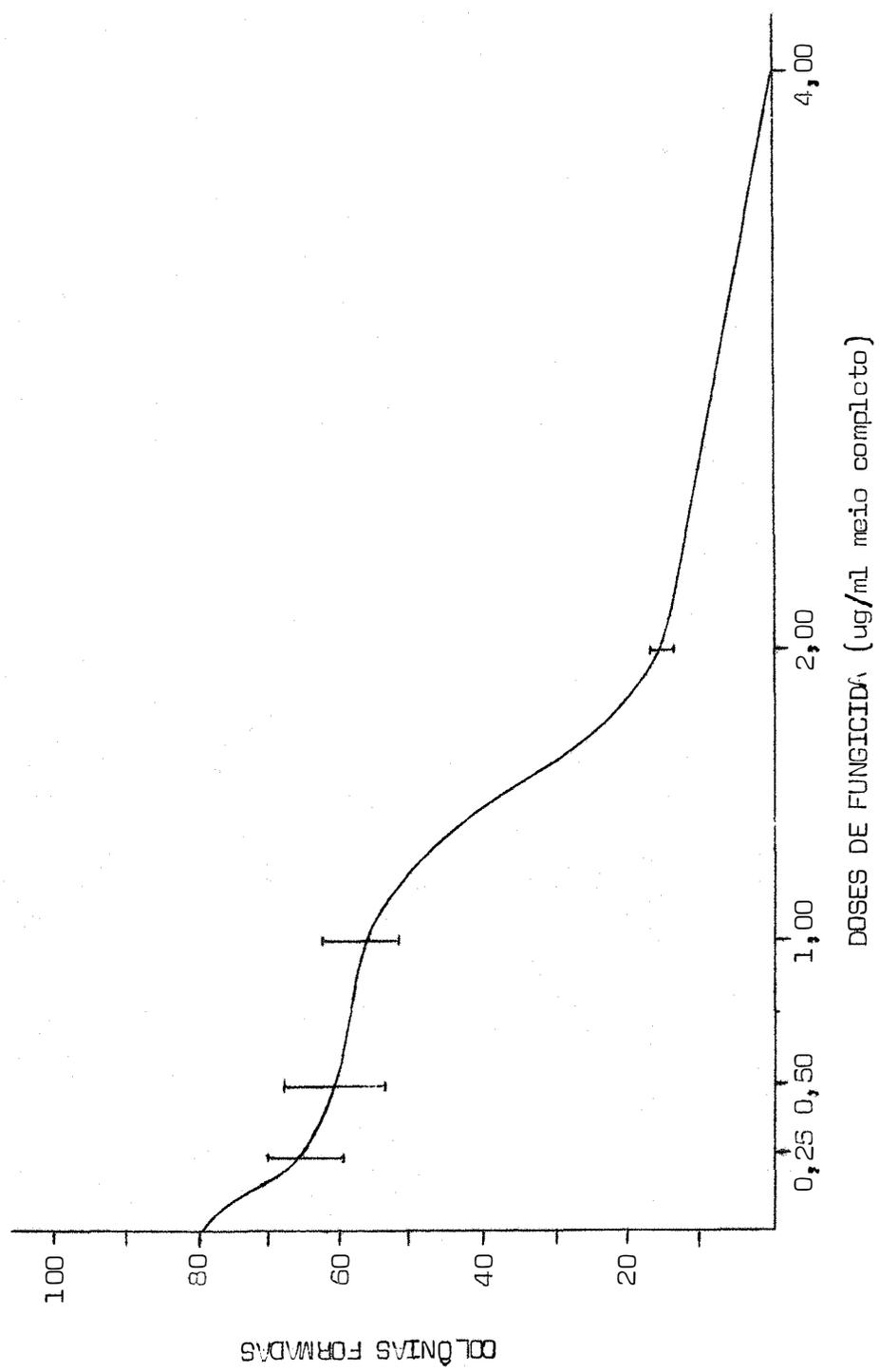


FIGURA 2 -- Curva de sobrevivência da linhagem bi. I. meth. I. tratada com fungicida DODINE

TABELA III - Percentagem de sobreviventes da linhagem bi 1; meth 1, trata  
da com fungicida VITAVAX.

Doses (ug/ml)	Nº colônias formadas	Médias	%
0	80		
	75	78,5	100
10	39		
	60	49,5	63
20	30		
	60	45,0	57
40	57		
	30	43,5	55
80	20		
	24	22,0	28
160	12		
	17	14,5	18
320	0		
	0	0	0

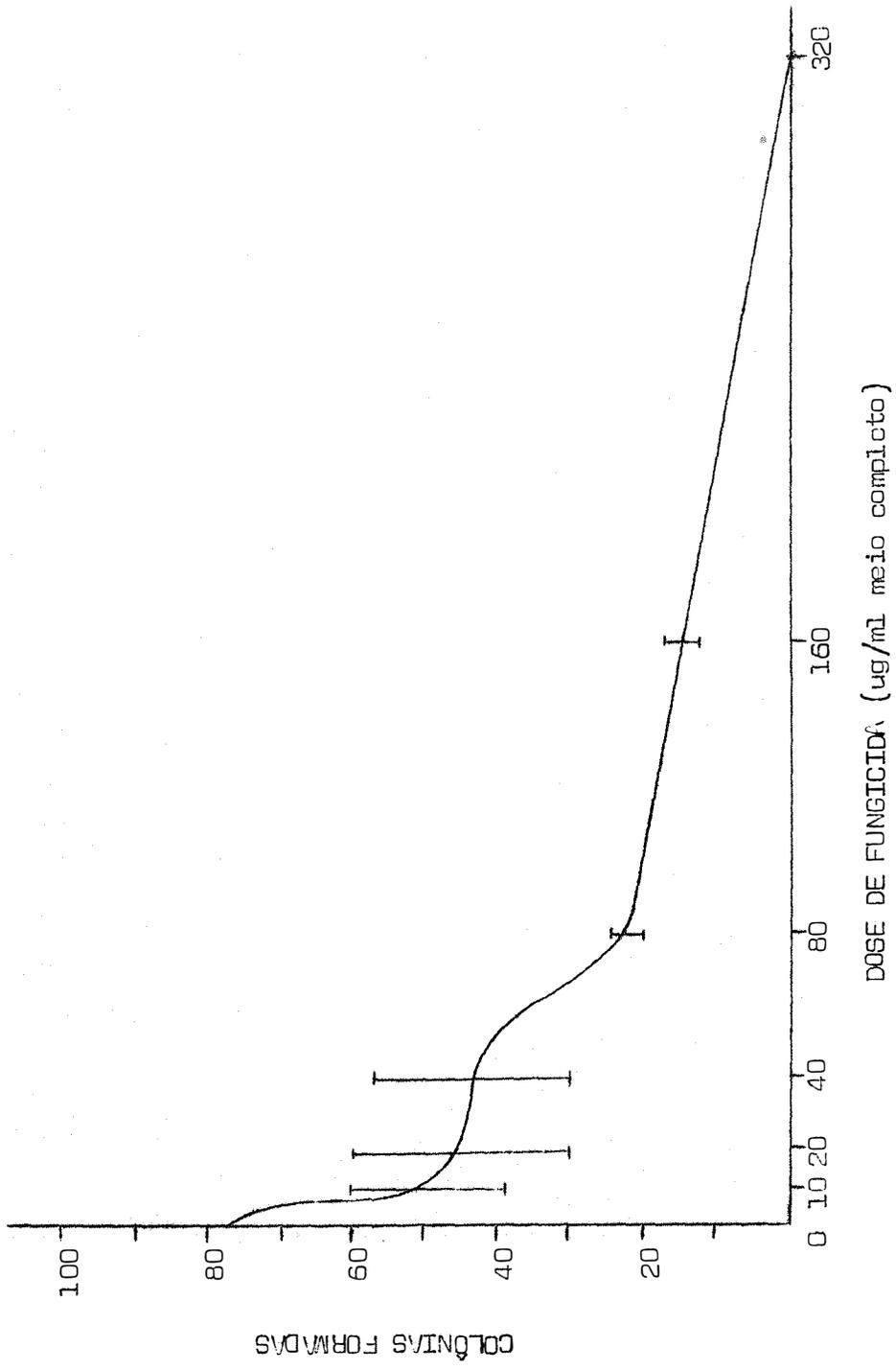


FIGURA 3 - Curva de sobrevivência da linhagem bil. meth 1 tratada com fungicida VITAVOX

## 4.2. Recombinação mitótica

### 4.2.1. Fungicida CLORONEB

Utilizou-se a concentração de 10 ug/ml de fungicida adicionado ao meio completo. Foram preparadas 20 placas, e destas, foram utilizadas 16, sendo descartadas as demais por não apresentarem colônias formadas ou no estágio de desenvolvimento desejado. Nas 16 placas, foi encontrado um total de 259 setores recombinantes, somando-se grandes e microsetores (Tabela V). Enquanto a testemunha (Figura 4) apresentou um total de 152 setores em 16 placas (Tabela IV), o tratamento CLORONEB praticamente duplicou o número de setores recombinantes, o que demonstrou a grande capacidade deste fungicida em aumentar a frequência de recombinação mitótica (Figura 5).

A aplicação do teste  $X^2$  no número total de setores recombinantes obtidos com o tratamento CLORONEB, mostrou ser altamente significativa a diferença entre este tratamento e a testemunha. Diferenças significativas foram também encontradas quando se analisou separadamente os grandes e microsetores (Tabela VIII).

Pela medida do diâmetro de conídios, foi verificado que num total de 67 setores de colônias provenientes de tratamento CLORONEB, 70,14% eram haplóides, em contraste com a testemunha que apresentou apenas 26,66% de setores haplóides em 45 setores analisados.

### 4.2.2. Fungicida DODINE

Utilizou-se a concentração de 2,0 ug/ml de fungicida adicionado ao meio completo. Na Tabela VI observam-se os resultados obtidos com o fungicida DODINE. Este fungicida mostrou ser também bastante eficiente em promover o aumento da frequência de recombinação mitótica em diploides de A. nidulans (Figura 6).

Nas 16 placas consideradas, encontrou-se um total de 254 setores, sendo que, 48 eram grandes setores e 206 microsetores.



FIGURA 4 - Setores espontâneos ocorrendo na linhagem diploide bi 1/MSE de A. nidulans.

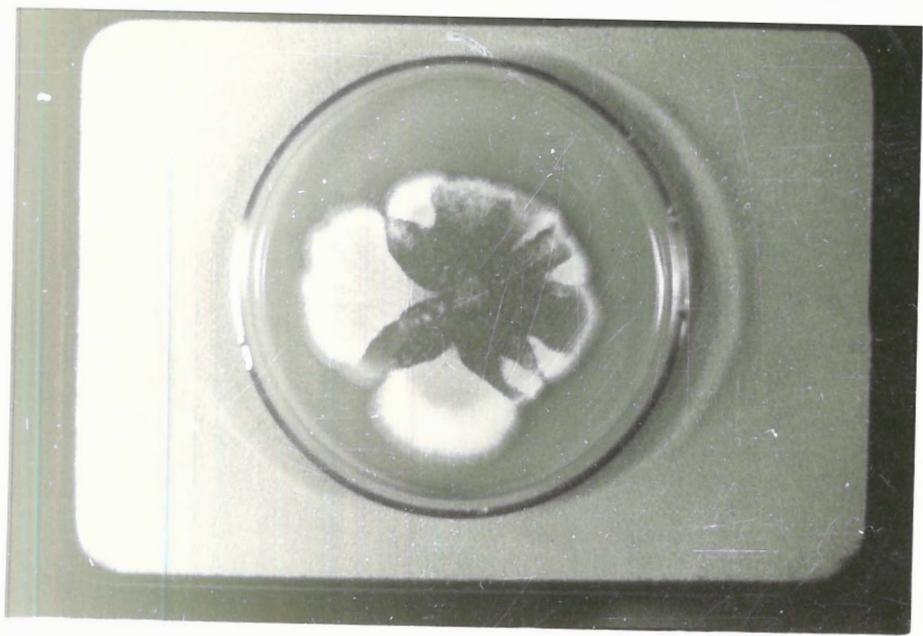


FIGURA 5 - Setores ocorrendo na linhagem diplóide bi 1//MSE de A. nidulans desenvolvida em meio completo adicionado de 10 ug/ml de fungicida CLORONEB.

A análise estatística apresentou um  $\chi^2$  altamente significativo com relação ao número total de setores recombinantes em comparação com o controle. Quando se analisou separadamente os dois tipos de setores, o  $\chi^2$  foi não significativo para grandes setores, sendo entretanto, altamente significativo para microsetores (Tabela VIII).

A ploidia de 41 setores foi determinada, verificando-se que 21,95% dos mesmos eram haplóides.

#### 4.2.3. Fungicida VITAVAX

Usou-se a concentração de 10 ug/ml de fungicida adicionado ao meio completo. Um exame de tabela VII nos mostra que em 16 placas foi encontrado apenas um total de 101 setores recombinantes, contra 152 da testemunha.

Ao contrário do CLORONEB e DODINE, o VITAVAX apresentou uma redução acentuada no número de grandes setores, sendo que o número de microsetores foi praticamente igual ao da testemunha (Figura 7).

A análise estatística do número total de setores recombinantes mostrou um  $\chi^2$  altamente significativo, o que mostra a capacidade deste fungicida em reduzir a recombinação mitótica em diplóides de A. nidulans. A análise separada dos setores recombinantes apresentou um  $\chi^2$  altamente significativo para grandes setores, sendo que para microsetores o  $\chi^2$  foi não significativo (Tabela VIII).

Num total de 34 setores examinados 67,65% mostraram ser haplóides, resultado semelhante ao encontrado com o tratamento CLORONEB.

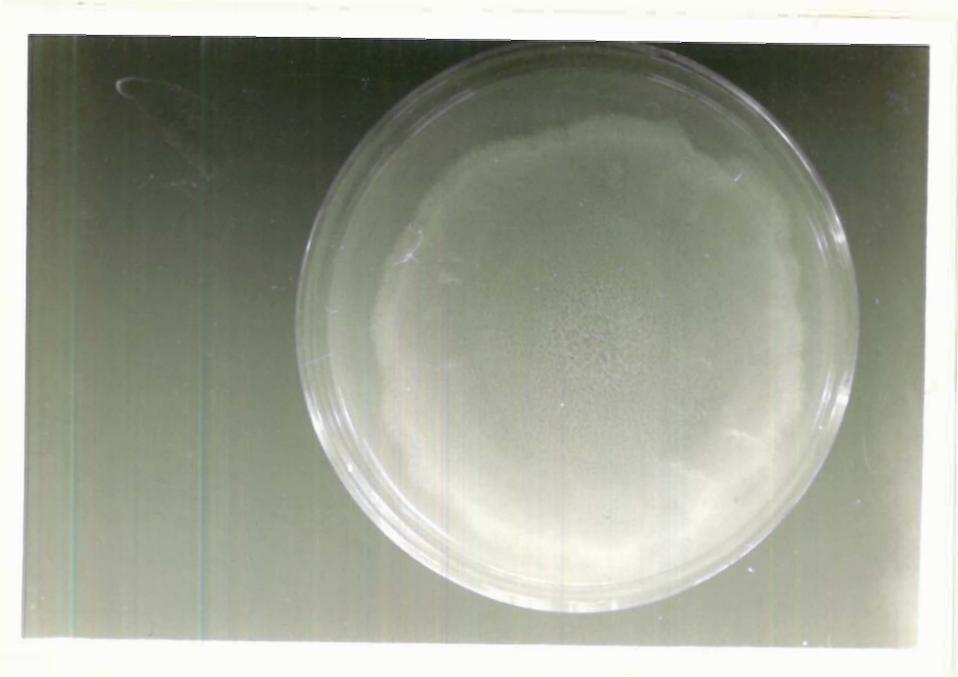


FIGURA 6 -- Colônia da linhagem diplóide bi 1//MSE de A. nidulans desenvolvida em meio completo adicionado de 2 ug/ml de fungicida DODINE.

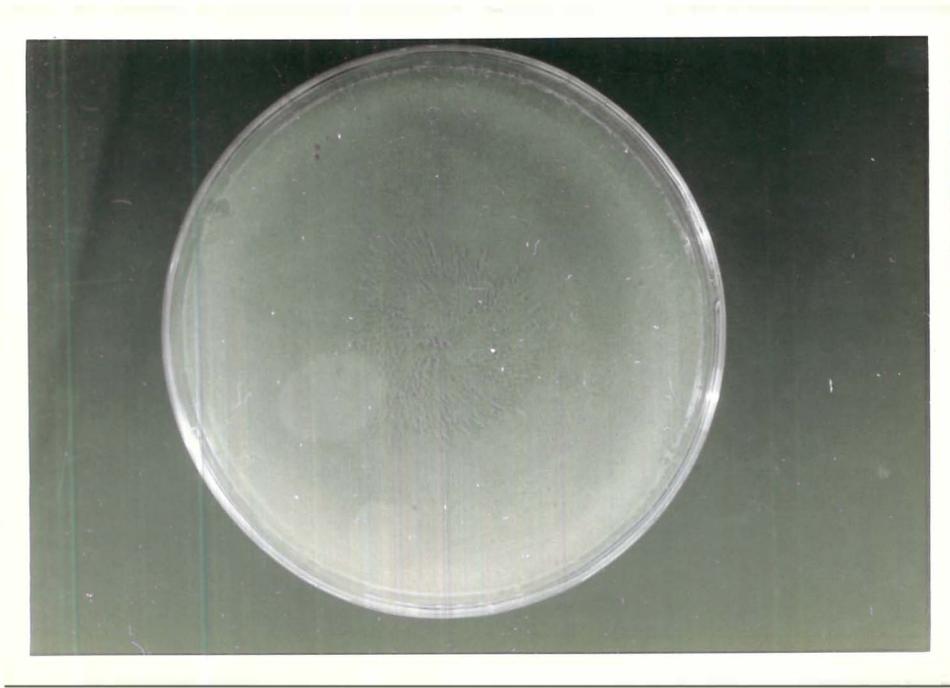


FIGURA 7 -> Colônia da linhagem diplóide hi 1//MSE de A. nidulans desenvolvida em meio completo adicionado de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de fungicida VITAVAX.

TABELA IV - Número de setores recombinantes espontâneos na linhagem di-  
plóide bi 1//MSE de A. nidulans.

Placa nº	Gran. Setores	Microsetores	Total
1	5	3	8
2	3	4	7
3	2	4	6
4	5	8	13
5	6	7	13
6	7	8	15
7	4	9	13
8	5	5	10
9	5	5	10
10	1	6	7
11	2	12	14
12	4	4	8
13	4	3	7
14	3	4	7
15	2	3	5
16	5	4	9
<b>TOTAL</b>	<b>63</b>	<b>89</b>	<b>152</b>

TABELA V - Número de setores recombinantes na linhagem diplóide bi 1//MSE tratada com o fungicida CLORONEB (10 ug/ml).

Placa nº	Gran. Setores	Microsetores	Total
1	3	15	18
2	9	12	21
3	5	10	15
4	3	13	16
5	9	13	22
6	14	22	36
7	2	3	5
8	7	7	14
9	6	7	13
10	10	7	17
11	2	2	4
12	13	3	16
13	2	6	8
14	6	0	6
15	6	28	34
16	2	12	14
<b>TOTAL</b>	<b>99</b>	<b>160</b>	<b>259</b>

TABELA VI - Número de setores recombinantes na linhagem diplóide bi 1//MSE tratada com o fungicida DODINE (2,0 ug/ml).

Placa nº	Gran. Setores	Microsetores	Total
1	7	12	19
2	5	10	15
3	6	20	26
4	5	13	18
5	2	14	16
6	3	14	17
7	2	14	16
8	1	10	11
9	1	17	18
10	5	18	23
11	5	14	19
12	2	3	5
13	0	7	7
14	1	7	8
15	1	21	22
16	2	12	14
<b>T O T A L</b>	<b>48</b>	<b>206</b>	<b>254</b>

TABELA VII -- Número de setores recombinantes na linhagem diplóide bi 1//MSE tratada com o fungicida VITAVAX (10 ug/ml).

Placa nº	Gran. Setores	Microsetores	Total
1	0	5	5
2	0	5	5
3	0	10	10
4	0	2	2
5	1	13	14
6	0	1	1
7	4	6	10
8	0	1	1
9	1	9	10
10	0	5	5
11	0	8	8
12	0	8	8
13	0	4	4
14	0	3	3
15	0	10	10
16	0	5	5
<b>TOTAL</b>	<b>6</b>	<b>95</b>	<b>101</b>

TABELA VIII -- Análise estatística. Comparação entre números de grandes setores, microsetores e totais produzidos dos pelos vários fungicidas.

Treatamentos	Gran. Setores	$\chi^2$	Micro setores	$\chi^2$	Total	$\chi^2$
CLORONEB	99	20,57 <sup>+++</sup>	160	56,64 <sup>+++</sup>	259	75,32 <sup>+++</sup>
DODINE	48	3,57 <sup>ns</sup>	206	153,01 <sup>+++</sup>	254	68,45 <sup>+++</sup>
VITAVAX	63	51,57 <sup>+++</sup>	95	0,40 <sup>ns</sup>	101	17,11 <sup>+++</sup>
TESTEMUNHA		--	89	--	152	--

#### 4.3. Mutantes resistentes : características e análise genética

##### 4.3.1. Fungicida CLORONEB

Em placas contendo meio completo e fungicida na dose de 1280 ug/ml (total de 40 placas), foram semeados conídios, numa concentração de  $2 \times 10^5$  conídios por placa.

Durante um período de incubação de 3-5 dias, houve o surgimento de uma massa branca e compacta no centro de algumas placas, devido a germinação de grande número de conídios nelas colocados. No entanto, não houve formação de colônias típicas, a não ser após um tempo de incubação de 15 a 20 dias, quando ocorreu surgimento de colônias verdes em três placas (uma por placa). Conídios de uma das colônias após purificação, foram inoculados no centro de placas contendo os seguintes meios: Meio completo adicionado de fungicida nas doses de 640 e 1280 ug/ml e meio completo sem fungicida.

Para comparação, a linhagem original bi 1; meth 1 foi inoculada também em placas contendo os mesmos meios acima descritos. Houve formação de colônias em todas placas, mas as placas com fungicida que foram inoculadas com conídios provenientes do possível isolado resistente, apresentavam colônias, cujo desenvolvimentos eram superiores às colônias provenientes de conídios da linhagem original, e colocados nas mesmas doses de fungicida. Nas doses de fungicida empregadas (640 e 1280 ug/ml), as colônias bi 1; meth 1 atingiam um diâmetro de 3 a 1 centímetros, respectivamente, enquanto que as colônias originadas do isolado, apresentavam diâmetros de 5 a 3 centímetros num período de incubação de 7 dias, mostrando desta maneira ser o isolado mais resistente ao fungicida CLORONEB que a linhagem original (Figura 8).

Este mutante resistente ao fungicida CLORONEB, foi denominado de clo 1. As características desse mutante podem assim ser resumidas: quando colocado em meio completo com fungicida, apresentava aspecto aparentemente normal, com coloração verde e produção normal de conídios. No entanto, quando colocado em meio completo sem fungicida, apresentava colora-

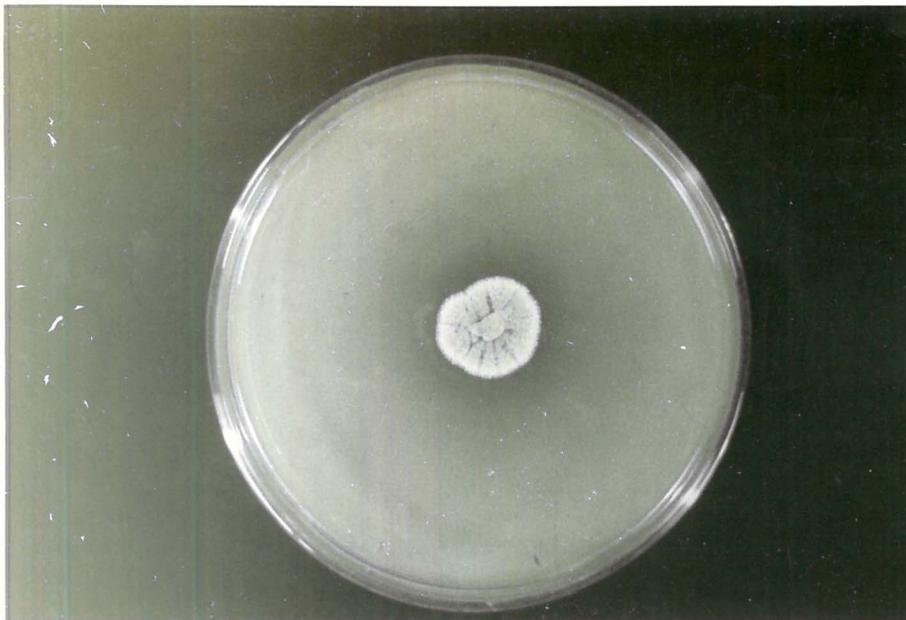


FIGURA 8 -- Linhagem original bi 1; meth 1 (alto) e mutante clo (abaixo) desenvolvidos em meio completo adicionado de 640 ug/ml de fungicida CLORONEB.



FIGURA 9 -- Colônia do mutante clo<sub>1</sub> dependente parcial do fungicida CLORONEB, apresentando baixa produção de conídios por ter se desenvolvido na ausência do fungicida.

ção marron, crescimento irregular e baixa produção de conídios, mostrando desta maneira sua dependência parcial ao fungicida CLORONEB (Figura 9).

Conídios diplóides obtidos do cruzamento do mutante clo 1 com a linhagem MSE, não germinavam quando colocados em meio contendo o fungicida na dose de 640 ug/ml, mostrando ser a resistência ao CLORONEB devida a um fator recessivo.

A análise genética mostrou ser o caráter resistência devido a um gene mendeliano simples, estando este gene localizado no grupo de ligação IV a 44,12 unidades de recombinação da marca pyro 4 (Tabelas IX e XI).

#### 4.3.2. Fungicida DODINE

Em placas contendo meio completo e fungicida na dose de 15 ug/ml, foram semeados  $2 \times 10^5$  conídios por placa (total de 30 placas).

Após um período de incubação de 3 - 5 dias, havia a formação de poucas colônias em algumas placas que foram ensaiadas quanto à resistência ao fungicida. Somente uma colônia confirmou ser resistente quando comparada com a linhagem original (bi 1; meth 1), ambas colocadas em meio com fungicida na dose de 20 ug/ml, seguindo-se o mesmo esquema usado para ensaiar o mutante clo 1. Conídios do mutante quando colocados em meio contendo 20 ug/ml de DODINE, davam origem à colônias aparentemente normais e com produção normal de conídios, enquanto que conídios da linhagem original, quando colocados nesta mesma condição, não germinavam (Figura 10).

Este mutante resistente ao fungicida DODINE foi denominado de dod 1.

Conídios diplóides obtidos do cruzamento de mutante dod 1 e a linhagem MSE, não germinavam quando colocados em meio contendo o fungicida na dose de 15 ug/ml, indicando a recessividade do caráter resistência.

Todos os setores segregantes haplóides obtidos do tratamento de diplóides com pFA, não germinavam quando colocados em meio contendo fungicida na dose de 15 ug/ml. Também ascósporos provenientes de cleistotécios híbridos resultantes do cruzamento do mutante com a linhagem MSE, não

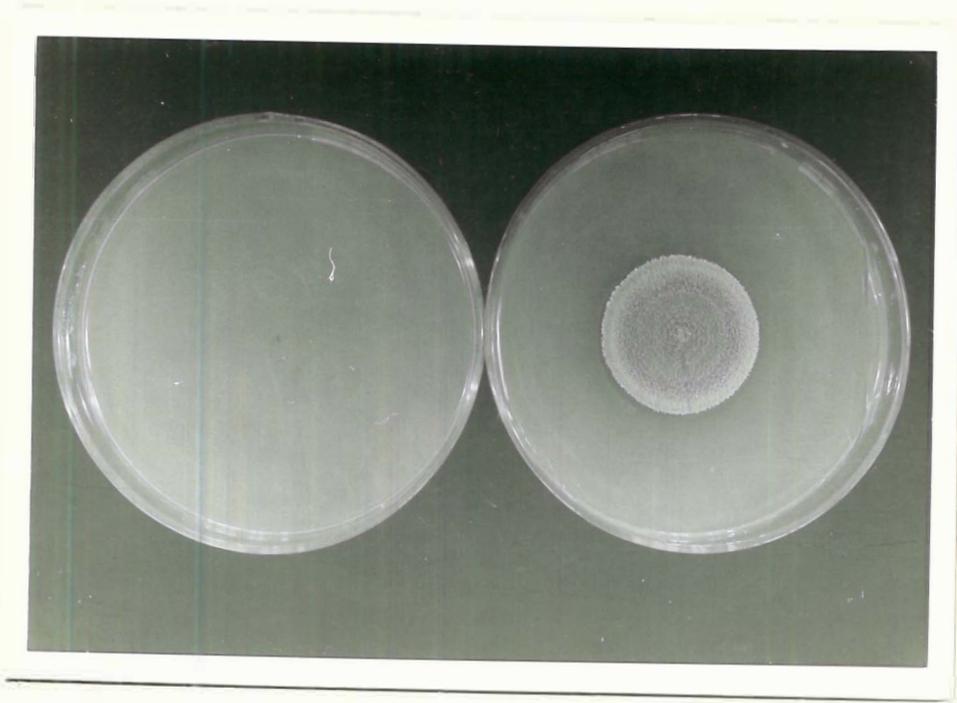


FIGURA 10 -- Linhagem original bi 1; meth 1 (esquerda) e mu-  
tante dod1 (direita) inoculados em meio comple-  
to adicionado de 20 ug/ml de fungicida DODINE.

germinavam quando colocados nas mesmas condições, tornando-se deste modo impossível o mapeamento genético deste mutante.

Teste de heterocário para verificar se esta resistência era devido a fatores citoplasmáticos foi feito, semeando-se conídios do heterocário resultante do cruzamento entre o mutante do<sub>1</sub> e a linhagem MSE em meio completo, adicionado de 15 ug/ml de fungicida DODINE. Não houve germinação de conídios, o que indicou ser esta resistência ao DODINE regulada por fator ou fatores extranucleares.

#### 4.3.3. Fungicida VITAVAX

Em 40 placas contendo meio completo e fungicida na dose de 320 ug/ml, foram semeados conídios numa concentração de  $2 \times 10^5$  conídios por placa. Após três dias de incubação, houve a emergência de uma única colônia de aspecto semelhante a uma colônia normal, apenas com coloração verde de mais escura.

O desenvolvimento de colônias originadas de conídios da colônia isolada, quando comparado com colônias provenientes de conídios da linhagem ni 1; meth 1 era mais rápido quando inoculados em meio contendo fungicida na dose de 320 ug/ml (Figura 11). Este mutante resistente ao fungicida VITAVAX foi denominado de Vit 1.

Diplóides resultantes do cruzamento entre o mutante e a linhagem MSE, apresentavam desenvolvimento mais lento que o mutante haplóide, indicando a natureza semidominante do caráter que conferia resistência.

A análise genética mostrou estar o gene para resistência localizado no grupo de ligação VII (Tabelas X e XII) não apresentando, no entanto, ligação com gene nic 8 localizado também no grupo de ligação VII.

#### 4.3.4. Frequência de mutantes resistentes

Os três fungicidas apresentaram diferentes frequências de mutantes resistentes como podemos observar na tabela XIII.

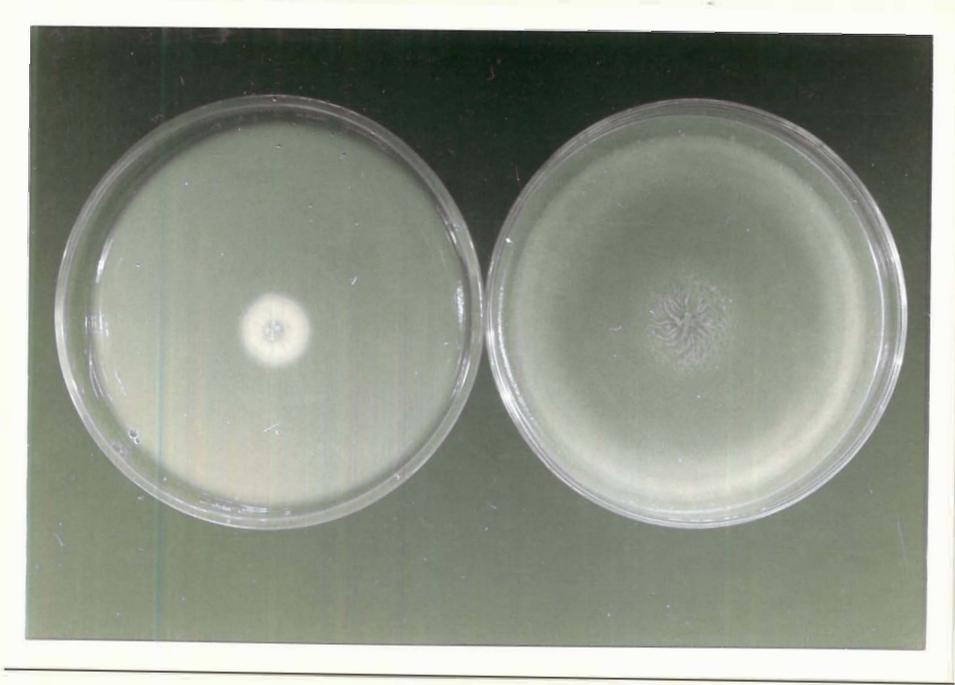


FIGURA 11 -- Linhagem original bi 1; meth 1 (esquerda) e mu-  
tante Vit<sub>1</sub> (direita) desenvolvidos em meio com  
pleto adicionado de 320 ug/ml. de fungicida VI-  
TAVAX.

TABELA IX -- Análise mitótica : Setores haplóides obtidos por meio do pFA a partir do diplóide bi<sub>1</sub> meth<sub>1</sub> clo<sub>1</sub> // MSE.

Grupo de ligação	Marcadores	Resistentes	Não Resistentes
I	pro <sup>+</sup> paba <sup>+</sup>	4	2
	pro paba	2	3
II	w <sup>+</sup>	2	2
	w	4	3
III	gal <sup>+</sup>	1	4
	gal	5	1
IV	piro <sup>+</sup>	6	0
	piro	0	5
V	fac <sup>+</sup>	3	3
	fac	3	2
VI	s <sup>+</sup>	2	2
	s	4	3
VII	nic <sup>+</sup>	5	4
	nic	1	1
VIII	ribo <sup>+</sup>	2	4
	ribo	4	1

TABELA X - Análise mitótica : Setores haplóides obtidos por meio do pFA a partir de bi 1; meth 1; Vit 1 x MSE.

Grupo de ligação	Marcadores	Resistentes	Não resistentes
I	pro <sup>+</sup> paba	2	10
	pro paba	5	5
II	w <sup>+</sup>	4	9
	w	3	6
III	gal <sup>+</sup>	6	9
	gal	1	6
IV	pyro <sup>+</sup>	3	6
	pyro	4	9
V	fac <sup>+</sup>	1	11
	fac	6	4
VI	s <sup>+</sup>	5	4
	s	2	11
VII	nic <sup>+</sup>	7	0
	nic	0	15
VIII	ribo <sup>+</sup>	5	5
	ribo	2	10

TABELA XI - Fenótipos e frequências observadas de colônias obtidas do cruzamento  $clo_1 \times MSE$

Fenótipo	Freq. Observadas
Resistente - piro <sup>+</sup>	25
Resistente - piro <sup>-</sup>	35
Sensível - piro <sup>+</sup>	10
Sensível - piro <sup>-</sup>	32
T O T A L	102

$$c = \frac{45}{102} = 0,4412 \text{ ou } 44,12\%$$

$$s = 4,41$$

$$c = 44,12 \pm 4,41$$

$$\chi^2 \text{ (relação 1:1) } = 3,18^{ns}$$

TABELA XII - Fenótipos e frequências observadas de colônias obtidas do cruzamento  $Vit_1 \times MSE$ .

Fenótipo	Freq. Observadas
Resistente - nic <sup>+</sup>	31
Resistente - nic <sup>-</sup>	21
Sensível - nic <sup>+</sup>	37
Sensível - nic <sup>-</sup>	13
T O T A L	102

$$c = \frac{58}{102} = 0,5686 \text{ ou } 56,86\%$$

$$s = 5,68$$

$$c = 56,86 \pm 5,68$$

$$\chi^2 \text{ (relação 1:1) } = 0,04^{ns}$$

TABELA XIII -- Frequência de mutantes resistentes nos fungicidas CLORONEB, DODINE e VITAVAX obtidos espontaneamente na Linhagem bi 1 meth 1 de A. nidulans.

Fungicidas	Doses (ug/ml)	Nº Conídios semeados	Mutantes obtidos	Frequência de mutantes em $10^6$ conídios
CLORONEB	1280	$8 \times 10^6$	3	0,375
DODINE	15	$6 \times 10^6$	1	0,167
VITAVAX	320	$8 \times 10^6$	1	0,125

## 5. DISCUSSÃO

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Recombinação mitótica

#### 5.1.1. Fungicida CLORONEB

O modo de ação de certos agentes físicos e químicos no aumento da frequência de recombinação mitótica, foi estudado por HOLLIDAY (1961, 1964), e ESPOSITO e HOLLIDAY (1964) que concluíram estar a capacidade desses agentes relacionados com a capacidade dos mesmos em inibir a replicação genética. A inibição da síntese de DNA produziria um estado de desenvolvimento não balanceado na célula, o qual favoreceria o pareamento de cromossomos homólogos e subsequente recombinação. HOCK e SISLER (1969) observaram que o fungicida CLORONEB age, entre outras maneiras, inibindo direta ou indiretamente a síntese de DNA, a um grau tal, que se pode esperar a cessação de desenvolvimento do organismo em Rhizoctonia solani. Isto nos leva a supor que este fungicida, na baixa dose empregada no nosso trabalho (10 ug/ml) atuaria, provavelmente, inibindo de modo mais suave a síntese de DNA, criando desta maneira, condições favoráveis para o pareamento dos cromossomos homólogos e subsequente recombinação, sem causar interrupção total do desenvolvimento do organismo.

A elevada percentagem (70,15) de setores segregantes haplóides obtidos nas colônias tratadas com o CLORONEB, mostra que este fungicida não só aumenta a frequência de recombinação mitótica, como também favorece a haploidização de diplóides de A. nidulans. Esses resultados são semelhantes aos resultados obtidos por HASTIE (1970) com o fungicida benlate.

Isto sugere que o CLORONEB, além do modo de ação acima discutido, pode atuar de outra maneira na promoção do aumento da frequência de recombinação mitótica, ou seja, através do aumento da segregação cromossômica. Substância capaz de aumentar consideravelmente a frequência de segregantes haplóides, já foi descrita por MORPURGO (1961), sendo que os mecanismos envolvidos na formação de recombinantes por meio de haplodização

de diplóides, se dá através de aneuploidia com perdas sucessivas de cromossomos até que o estado haplóide seja atingido (KAFFER, 1960).

Esta capacidade do CLORONEB de promover a haploidização de diplóides poderá ser útil em estudos genéticos, como por exemplo, aqueles que envolvem análises genéticas através do ciclo parassexual. Entretanto, devido a sua capacidade em inibir a síntese de DNA, torna-se necessário verificar antes de tudo, se esta inibição não iria aumentar de modo considerável a frequência de permutas mitóticas, o que não é desejável numa análise genética através do ciclo parassexual, pois isso alteraria completamente os marcadores genéticos existentes nos diferentes grupos de ligação.

Desta maneira, podemos considerar dois modos prováveis de ação do fungicida CLORONEB com relação ao aumento da frequência de recombinação mitótica em diplóides de *A. nidulans*: a) inibindo o síntese de DNA, aumentaria a frequência de recombinantes mitóticos por meio de permuta mitótica; b) induzindo a haploidização, aumentaria a frequência de recombinantes por meio de segregação cromossômica.

A alta frequência de grandes setores ( $\chi^2$  altamente significativo - Tabela VIII) nos tratamentos com o fungicida CLORONEB, provavelmente se deve ao fato deste fungicida atuar logo no início da germinação dos conídios, possibilitando desta maneira, um maior desenvolvimento dos setores segregantes por ele induzidos.

#### 5.1.2. Fungicida DODINE

Este fungicida também apresentou alta capacidade de aumentar a frequência de recombinação mitótica em diplóides de *A. nidulans*, mas esta capacidade não pode ser relacionada com uma inibição de síntese de DNA. O DODINE atua principalmente alterando a permeabilidade da parede celular, o que resulta na perda de constituintes celulares e, também, inativando certos enzimas vitais envolvidos no metabolismo de carboidratos (BROWN e SISLER, 1960). Entretanto, esta perda de material e inativação

de algumas enzimas vitais, provavelmente causaria um atraso na divisão celular, o que permitiria uma maior oportunidade e tempo de pareamento dos cromossomos homólogos e em consequência maior ocorrência de permutas mitóticas.

A baixa percentagem (21,95) de segregantes haplóides obtidos nas colônias tratadas com DODINE, é uma indicação de que a maioria dos setores recombinantes são resultantes de permuta mitótica. Resultados semelhantes foram obtidos por FRATELLO, MORPURGO e SERMONTI (1960), quando trataram diplóides de *A. nidulans* com doses baixas de formaldeído.

A alta frequência de micro setores ( $\chi^2$  altamente significativo - Tabela VIII) nos tratamentos com o fungicida DODINE, provavelmente é devido à ação retardada deste fungicida na indução de permuta mitótica, impossibilitando desta forma um maior desenvolvimento dos setores segregantes.

### 5.1.3. Fungicida VITAVAX

Este fungicida, ao contrário do CLORONEB e DODINE, apresentou uma redução no número total de setores recombinantes quando comparado com a testemunha.

Como não foi encontrada nenhuma referência de como este fungicida exerce seu efeito fungitóxico, podemos levantar a hipótese de que este fungicida deve ter alguma ação, quer seja direta ou indireta, nos mecanismos envolvidos no pareamento dos cromossomos homólogos. A alta percentagem (67,65) de setores segregantes haplóides, obtidos nas colônias tratadas com este fungicida, é uma indicação de que os recombinantes obtidos são resultantes de segregação cromossômica, não envolvendo, portanto, pareamento, e permuta entre cromossomos homólogos.

..

Comparando os dados obtidos, podemos verificar que os três fungicidas usados no presente trabalho, apresentaram resultados bastante diferentes com relação à ação desses agentes na frequência de recombinação

mitótica. Enquanto que os fungicidas CLORONEB e DODINE apresentaram alta capacidade de aumentar a frequência de recombinação mitótica, o fungicida VITAVAX, ao contrário, apresentou uma redução acentuada no número total de setores recombinantes. Mesmo entre os fungicidas CLORONEB e DODINE houve diferenças, já que o primeiro aumentou significativamente, tanto a frequência de grandes setores quanto a de microsetores, e o DODINE apenas teve efeito significativo somente no aumento da frequência de microsetores (Tabela VIII).

Desta maneira os resultados obtidos não podem ser generalizados a outros fungicidas, bem como não devem ser extrapolados a outras espécies de fungos. No entanto, é uma indicação importante das reais possibilidades da ocorrência do problema de frequência de recombinação mitótica, em condições de campo, quando fungicidas são aplicados para o controle de fungos fitopatogênicos que apresentam o ciclo parassexual.

## 5.2. Mutantes resistentes

Ao contrário do que ocorre no controle de outros organismos como insetos e bactérias, a emergência de mutantes resistentes em fungos, em condições de campo, e que cheguem a causar problemas na agricultura é raro (GEORGOPOULOS, 1969). Entretanto em laboratório, mutantes de diferentes espécies de fungos resistentes a fungicidas já foram isolados (ASHIDA, 1965; GEORGOPOULOS e ZARACOVITIS, 1967).

Os problemas de resistência a fungicidas, os mecanismos genéticos e bioquímicos envolvidos nessa resistência, ainda não estão claramente elucidados (GEORGOPOULOS e ZARACOVITIS, 1967). Sabe-se que os fungicidas atuais são geralmente inespecíficos, e desta forma são capazes de inibir um grande número de processos vitais no metabolismo do fungo (GALLI, TOKESHI, DE CARVALHO, BALMER, KIMATI, CARDOSO e SALGADO, 1968). Desta maneira, torna-se difícil determinar com absoluta certeza, quais as modificações que sofre um organismo nos seus processos metabólicos e na sua estrutura, de modo a tornar-se resistente a uma determinada fungicida. Em certos casos, no entanto, é possível especular sobre o mecanismo de resistên-

cia a um fungicida como no caso de WESCOTT e SISLER, (1954) que observaram maior acúmulo de ciclohexamida na espécie sensível de Saccharomyces pastorianus, do que na espécie resistente de Saccharomyces fragilis, provavelmente devido à perda de sítios de acúmulo da substância tóxica na espécie resistente. Também a maior absorção de derivados de oxatiin nas espécies de fungos sensíveis do que nas espécies resistentes foi observado por MATHE (1968). Como o VITAVAX é um dos derivados do oxatiin, pode-se supor que a resistência ao fungicida VITAVAX, do mutante obtido no presente trabalho, está relacionado com a menor capacidade deste mutante em absorver e acumular o tóxico em seu organismo. Resultados semelhantes obteve THRELFALL (1968) com mutantes de A. nidulans resistentes aos fungicidas PCNB e TCNB.

No caso do mutante resistente ao fungicida DODINE, as causas que promovem esta resistência devem ser outras. O teste de heterocário mostrou ser esta resistência controlada por fator ou fatores citoplasmático. ARLETT, GRINDLE e JINKS (1962) isolaram mutantes de A. nidulans cujo caráter era controlado por fatores citoplasmático num total de 7 partículas. Desta maneira, pode-se supor que uma ou mais partículas citoplasmáticas devem estarem envolvidas nos mecanismos de resistência ao fungicida DODINE. Entretanto, como se sabe, este fungicida atua principalmente causando alterações na permeabilidade da parede celular (BROWN e SISLER, 1960), através da ligação do seu grupo guanidino com pontos de ligação existentes na parede celular. Desta forma, poder-se-ia supor que, a partícula ou partículas responsáveis pela resistência ao DODINE, estejam envolvidas direta ou indiretamente na formação dos pontos de ligação na parede celular. Devido às alterações sofridas nas suas estruturas pela mutação, estas partículas alteradas impediriam a formação dos pontos de ligação na parede celular, através dos quais o DODINE atuaria, tornando desta forma, o organismo resistente a este fungicida.

O fenômeno de um organismo tornar-se dependente de uma substância que normalmente lhe é tóxica, como no caso do mutante clo 1, já foi relatado por EMERSON (1947), YEGIAN e BUDD (1948), CURTIS, STAUFFER e BACKUS (1955). Entretanto, os mecanismos através dos quais um organismo torna-se dependente de uma substância que normalmente lhe é tóxica, não es

tá ainda esclarecido. No presente caso o mutante clo 1 provavelmente sofreu alterações na sua estrutura gênica de modo a adaptar o seu metabolismo ao uso do CLORONEB ou seus derivados. O uso de derivados metabólicos de fungicida CLORONEB na formação de compostos necessários ao seu organismo foi relatado por HOCK e SISLER (1969) em Rhizoctonia solani.

#### 5.2.1. Frequência de mutantes resistentes

Devido a raridade de surgimento de mutantes de fungos resistentes à fungicidas, em condições de campo (GEORGOPOULOS, 1969), era de se esperar também uma baixa frequência de mutantes resistentes em condições de laboratório. Realmente isto ocorreu no presente trabalho como podemos ver na Tabela XIII. O fungicida CLORONEB apresentou a maior frequência de mutantes, enquanto que o VITAVAX teve a menor frequência. No entanto, devido ao pequeno número de conídios analisados, ensaios mais extensos têm que serem realizados para que se possa ter uma melhor idéia da frequência de mutação para resistência a estes fungicidas em A. nidulans.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi desenvolvido com a finalidade de se estudar a ação de fungicidas na frequência de recombinação mitótica em Aspergillus nidulans, isolar mutantes resistentes aos fungicidas usados e analisados geneticamente e, finalmente, determinar a frequência de mutantes resistentes.

Os fungicidas usados foram os sistêmicos 1,4-dicloro-2,5-dimetoxil benzeno (CLORONEB) e 2,3-dihidro-5-carboxanilido-6-metil-1,4-oxatiin (VITAVAX), e o não sistêmico acetato de n-dodecilguanidina (DODINE).

Para se estudar a frequência de recombinação mitótica, foi usada a linhagem diplóide bi 1//MSE, e para o isolamento, mapeamento e os estudos de frequência de mutação foi usada a linhagem bi 1; meth 1.

Nos estudos da frequência de recombinação mitótica, foram considerados dois tipos de setores: a) grandes setores: todos os setores visíveis a olho nú; b) microsetores: todos os setores visíveis somente através de estereomicroscópio, sendo levado em consideração apenas os setores de coloração branca e amarela.

As curvas de sobrevivência aos fungicidas foram determinadas e mutantes resistentes foram isolados e analisados geneticamente.

Pelos resultados obtidos podemos concluir que:

1 - Nas doses empregadas os fungicidas CLORONEB (10 ug/ml) e DODINE (2 ug/ml), apresentaram alta capacidade de aumentar a frequência de recombinação mitótica, enquanto que o VITAVAX (10 ug/ml) ao contrário, apresentou uma redução acentuada no total de setores recombinantes.

2 - Os fungicidas CLORONEB e VITAVAX apresentaram-se como agentes indutores da haploidização de diplóides de A. nidulans, enquanto que no tratamento com DODINE a frequência de setores haplóides foi praticamente igual à testemunha.

3 - A resistência aos fungicidas CLORONEB e VITAVAX foi de-

vida em ambos os casos a um único gene, estando o gene para resistência ao CLORONEB localizado no grupo de ligação IV, e o gene para resistência ao VITAVAX localizado no grupo de ligação VII. A resistência ao fungicida DODINE foi determinada como sendo de natureza citoplasmática.

4 - Os resultados bastante diferentes obtidos com os três fungicidas, em relação à frequência de recombinação mitótica e características dos mutantes resistentes analisados, não podem necessariamente ser generalizados a outros fungicidas. Embora não podendo a priori serem extrapolados a outras espécies de fungos, os resultados são, no entanto, uma indicação das possibilidades de ocorrência do problema em condições de campo.

## 7. SUMMARY

## 7. SUMMARY

The present research was carried out to study the effect of three fungicides in relation to the alterations in the frequency of mitotic recombination in a diploid strain of the filamentous fungus Aspergillus nidulans. Also studies related to the isolation of resistant mutants, their frequencies and genetic location of such mutants were carried out.

The fungicides used were: 1,4-dichloro-2,5-dimethoxybenzene (CLORONEB), 2,3-dihydro-5-carboxanilido-6-methyl-1,4-oxathiin (VITAVAX) and n-dodecylguanidine acetate (DODINE).

The strains used were the diploid strain bi 1//MSE and the haploid strain bi 1; meth 1. From the results obtained the following conclusions can be drawn:

1 - CLORONEB (10 ug/ml) and DODINE (2 ug/ml) caused an increase in the frequency of mitotic recombination. On the other hand, the fungicide VITAVAX (10 ug/ml) caused reduction in the total number of recombinant sectors when compared with the control.

2 - CLORONEB and VITAVAX were able to induce large amount of haploidization of the diploid strain used. DODINE did not increase the frequency of haploid sectors.

3 - Resistance to the fungicides CLORONEB and VITAVAX was monogenic. The gene which confers resistance to CLORONEB was located in linkage group IV and the gene for resistance to VITAVAX was located in linkage group VII.

Resistance to the fungicide DODINE had a cytoplasmic nature.

4 - The obtained results regarding the frequency of mitotic recombination and nature of the analysed mutants although cannot be necessarily extrapolated to the other species of fungi, are an indication of the possibility of occurrence of such problems in field conditions.

## 8. BIBLIOGRAFIA CITADA

8. BIBLIOGRAFIA CITADA

- APIRON, D. (1962). A general systems for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice versa in micro-organisms. Nature, London, 195: 959-961
- ARLETT, G.F., M. GRINDLE & J.L. JINKS, (1962) The "red" cytoplasmic variant of Aspergillus nidulans. Heredity, 17: 197-209.
- ASHIDA, J. (1965) Adaptation of fungi to metal toxicants. Annual Review of Phytopathology, 3: 153-174.
- AZEVEDO, J.L. (1966) Estudos sobre recessivos letais em Aspergillus nidulans (Eidam) Winter. Tese de Livre-Docência, ESALQ, USP. 121 pp.
- AZEVEDO, J.L. (1972) Genética fisiológica e de microrganismos. Publicação didática do Instituto de Genética. ESALQ, USP. 490 pp.
- BARTZ, J.A. & J.E. MITCHELL (1970) Evidence for the metabolic detoxification of n-dodecylguanidine acetate by ungerminated macroconidia of Fusarium solani f. sp. phaseoli. Phytopathology, 60:350-354.
- BROWN, I.F. & H.D. SISLER (1960) Mechanisms of fungitoxic action of n-dodecylguanidine acetate. Phytopathology, 50: 830-839.
- BUXTON, E.W. (1956) Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of Fusarium oxysporum. The Journal of General Microbiology, 15: 133-139.
- CURTIS, R.W., J.F. STAUFFER & M.P. BACKUS (1956) Acenophthene-requiring strain of Penicillium chrysogenum. American Journal of Botany, 43: 594-600.
- DARRAG, I.E.M. & J.B. SINCLAIR (1969) Evidence for systemic protection against Rhizoctonia solani with Cloroneb in cotton seedlings. Phytopathology, 59: 1102-1106.
- EDGINGTON, L.V. & G.L. BARRON (1967) Fungitoxio spectrum of oxathiin compounds. Phytopathology, 57: 1256-1257.

- EDGINGTON, L.V., G.S. WALTON & P. MILLER (1966) Fungicide selective for Basidiomycetes. Science, 153: 307-308.
- EMERSON, S. (1947) Growth responses of a sulfonamid-requiring mutant strain of Neurospora. Journal of Bacteriology, 54: 195-207.
- ESPOSITO, R.E. & R. HOLLIDAY (1964) The effect of 5-fluorodeoxyuridine on genetic replication and mitotic crossing over in synchronized cultures of Ustilago maydis. Genetics, 50: 1009-1017
- FRATELLO, B., G. MORPURGO & G. SERMONTI (1960) Induced somatic segregation in Aspergillus nidulans. Genetics, 45: 785-800.
- GALLI, F., H. TOKESHI, P.C.T. CARVALHO, E. BALMER, H. KIMATI, C.O.N. CARDOSO & C.L. SALGADO (1968) Manual de Fitopatologia. Biblioteca Agrônômica Ceres. São Paulo. 640 pp.
- GEORGOPOULOS, S.G. (1969) The problem of fungicide resistance. Bio-Science, 19: 971-973.
- GEORGOPOULOS, S.G. & C. ZARACOVITIS (1967) Tolerance of fungi to organic fungicides. Annual Review of Phytopathology, 5: 109-130.
- GRANER, E.A. (1966) Estatística. Edições Melhoramento, 2ª edição. São Paulo, 184 pp.
- HASTIE, A.C. (1970) Benlate-induced instability of Aspergillus diploide. Nature, London, 226: 771.
- HASTIE, A.C. & S.G. GEORGOPOULOS (1971) Mutational resistance to Fungitoxic benzimidazole derivatives in Aspergillus nidulans. The Journal of General Microbiology, 67: 371-373.
- HOCK, W.K. & H.D. SISLER (1969) Specificity and mechanism of antifungal action of chloroneb. Phytopathology, 59: 627-632.
- HOLLIDAY, R. (1961) Induced mitotic crossing over in Ustilago maydis. Genetical Research, 2: 231-248.
- HOLLIDAY, R. (1964) The induction of mitotic recombination by mitomycin in Ustilago and Saccharomyces. Genetics, 50: 323-335.

- IKEDA, Y., C. ISHITANI & K. NAKAMURA (1957) A high frequency of heterozygous diploids and somatic recombination induced in imperfecti fungi by ultra-violet light. The Journal of General Microbiology 3: 1-11.
- JINKS, J.L. (1954) Somatic selection in fungi. Nature, London, 174:408-410.
- KAFER, E. (1960) High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in Aspergillus nidulans. Nature, London, 186:619-620.
- KAPPAS, A. & S.G. GEORGOPOULOS (1970) Genetic analysis of dodine resistance in Nectria haematococca (Syn. Hipomyces solani). Genetics, 66: 617-622.
- LHOAS, P. (1961) Mitotic haploidization by treatment of Aspergillus niger diploide with para-Fluorophenylalanine. Nature, London, 190:744.
- MC CULLY, K. & E. FORBES (1965) The use of p-fluorophenylalanine with "master strains" of Aspergillus nidulans for assigning genes to linkage groups. Genetical research, Cambridge, 6: 352-359.
- MACNEILL, B.H. & J.V. SABANAYAGAM (1968) The induction of dodine tolerance in Fusarium oxysporum f. melonis: a technique applicable to the study of the bionomics of soil-borne fungal pathogens. Canadian Journal of Microbiology, 14: 1262-1263.
- MATHRE, D.E. (1968) Uptake and binding of oxathiin systemic fungicides by resistant and sensitive fungi. Phytopathology, 58: 1464-1469.
- MORPURGO, G. (1961) Somatic segregation induced by p-fluorophenylalanina (p-FP). Aspergillus News Letter, 2: 10.
- MORPURGO, G. (1963) Induction of mitotic crossing-over in Aspergillus nidulans by bifunctional alkylating agents. Genetics, 48:1259-1263.
- MORPURGO, G. & G. SERMONTI (1959) Chemically-induced instabilities in a heterozygous diploid of Penicillium chrysogenum. Genetics, 44: 137-152.
- PONTECORVO, G. (1954) Mitotic recombination in the genetic system of filamentous fungi. Caryologia, 4: 192.

- PONTECORVO, G. & E. KAFER (1958) Genetic analysis based on mitotic recombination. Advances in Genetics, 9: 71-104.
- PONTECORVO, G. & J.A. ROPER (1952) Genetic analysis without sexual reproduction by means of poliploidy in Aspergillus nidulans. The Journal of General Microbiology, 6 (Abstr. III).
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONS, K.D. MACDONALD & A.W.J. BUFTON (1953) The genetics of Aspergillus nidulans. Advances in Genetics, 3: 142-238.
- PONTECORVO, G., E. TARR-GLOOR & E. FORBES (1954) Analysis of mitotic recombination in Aspergillus nidulans. Journal of Genetics, 52: 226-237.
- ROBERTS, C.F. (1959) A replica plating technique for the isolation of nutritionally exating mutants of a filamentous fungus (Aspergillus nidulans) The Journal of General Microbiology, 20: 540-548.
- ROPER, J.A. (1952) Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. Experientia, 8: 14-15.
- ROPER, J.A. & R.H. PRITCHARD (1955) Recovery of the complementary products of mitotic crossig-over. Nature, London, 175: 639.
- ROSATO, Y. B. (1973) Efeitos do etil-metano-sulfonato e acriflavina na instabilidade mitótica em Aspergillus nidulans. Tese de Mestrado. ESALQ, USP. 74 pp.
- SCHMELING, V. & M. KULKA (1966) Systemic fungicidal activity of oxathiin derivatives. Science, 152: 659-660.
- THRELFALL, R.J. (1968) The genetics and biochemistry of mutants of Aspergillus nidulans resistant to chlorinated nitrobenzenes. The Journal of General Microbiology, 52: 35-44.
- TILLMAN, R.W.; H.D. SISLER (1971) A chloroneb-resistant mutant of Ustilago maydis. Phytopathology, 61: 914.
- TINLINE, R.D. & B.H. MACNEILL (1969) Parasexuality in plant oathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology, 7: 147-170.

- TUYL, J.M., L.C. DAVIDSE, & J. DEKKER (1973) Acquired resistance to benomyl and thiabendazole in Aspergillus nidulans. 2<sup>nd</sup> International Congress of Plant Pathology. Minneapolis (Abstr. No 0779).
- WARR, J.R. & J.A. ROPER (1965) Resistance to various inhibitors in Aspergillus nidulans. The Journal of General Microbiology, 40: 273-281.
- WESCOTT, E.W. & H.D. SISLER (1964) Uptake of cycloheximide by a sensitive and resistant yeast. Phytopathology, 54: 1261-1264.
- WOOD, S. & E. KAUFER (1969) Effects of ultraviolet irradiation on heterozygous diploids of Aspergillus nidulans. I. UV. Induced mitotic crossing over. Genetics, 62: 507-518.
- YEGIAN, D. & V. BUDD (1948) A variant of Mycobacterium ranae requiring streptomycin for growth. Journal of Bacteriology, 55: 459-461.