ASPECTOS GENÉTICOS DA RESISTÊNCIA AO CLORONEB EM UMA LINHAGEM MUTANTE DE *Aspergillus nidulans*

Cyro Grossi
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Orientador : JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do título de Doutor em Genética
e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A
ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL
SETEMBRO - 1980

E R R A T A

- Pg. 059 - Onde se lê: AZEVEDO, BARACHO, VENCovsky, 1970, de
ve-se ler: BARACHO, VENCovsky e AZEVEDO, 1970.
- Pg. 121 - Onde se lê: levando em consideração-as cinco li
nhagens resistentes, deve-se ler: levando em con-
sideração quatro das cinco linhagens resistentes.
- Pg. 133 - Após a citação de ELISBÃO, 1980; acrescentar: FOR
BES, E., 1959. Use of mitotic segregation for
assigning genes to linkage groups in *Aspergillus*
nidulans. *Heredity*, 13:67-80.
- Pg. 138 - Onde se lê ROPER, J., 1971, deve-se ler: ROPER,
J. A., 1971.
- Pg. 138 - A citação ROPER, J. A., 1952, deve preceder à ci-
tação ROPER, J.A., 1971.
- Pg. 139 - Onde se lê: pentachlonitrobenzene, deve-se ler:
pentachloronitrobenzene.

Às memórias de

CONRADO e LAVÍNIA, meus pais,

ANGELO e CONRADO, meus irmãos.

COM SAUDADE

À minha mulher, Cecília, com meu mais alto agradecimento, por tudo.

A meus filhos, Cyro e Renata

A meus irmãos

A Cleide

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Queremos agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e, principalmente a:

- Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela nossa introdução ao maravilhoso mundo dos fungos.
- Dr. Ernesto Paterniani Diretor do Instituto de Genética, da ESALQ/USP, pela acolhida e facilidades concedidas na utilização de instalações e equipamentos.
- Ministério da Educação e Cultura juntamente com a Universidade Estadual de Londrina que através do Convênio FUEL-PICD-CAPES concederam-me a bolsa de estudos de doutoramento.
- Colegas amigos do Curso de Pós-Graduação, pela convivência, apoio e colaboração.
- Professores do Curso de Pós-Graduação, pela contribuição a nossa formação científica e pelo ambiente sem constrangimento que nos proporcionaram.
- Prof. Dr. Flávio Cesar Almeida Tavares, pelo atendimento amigo em todos os sentidos.
- Ao doutorando Luiz Alberto Rocha Batista e ao Sr. Ayrton Rasera, pela contribuição na parte de análise estatística.
- Todos os funcionários do Instituto de Genética pelo carinhoso e estimulante bom dia, de todos os dias.
- Funcionários do Setor de Genética de Microrganismos: Antonio José Rocha Campos, Luiz Prospero, Rodolfo Fulini e Orlando Bueno Cardoso pela amizade e preocupação constante com o material técnico necessário.

CURRICULUM VITAE

Cyro Grossi, mineiro de Três Corações, filho de Conrado Grossi D'Angelo e de Lavinia Brazil Grossi, é licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo. Iniciou sua carreira Universitária na Universidade Estadual de Londrina em 1969, onde permanece como Professor Assistente.

Mestre em Genética Humana pela Universidade Federal do Paraná, tendo publicado trabalhos e apresentado temas em Congressos, nessa área.

Atualmente dedica-se à pesquisa na área de Genética de Microrganismos, mais especificamente Genética de Fungos.

O presente trabalho constitui-se um dos requisitos do Curso de Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo.

Í N D I C E

	Página
1. RESUMO	01
2. INTRODUÇÃO	03
3. REVISÃO DA LITERATURA	05
3.1. Obtenção de mutantes resistentes a hidrocarbó- netos aromáticos	06
3.2. Caracterização dos mutantes resistentes ao clo- roneb e análise genética	08
3.3. Relação de dominância em mutantes resistentes usando diplóides	13
3.4. <i>Aspergillus nidulans</i> e a detecção de mutagêni- cos	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Linhagens utilizadas	20
4.2. Meios de cultura e soluções utilizadas	23
4.2.1. Meio mínimo sólido	23
4.2.2. Solução de vitaminas	25
4.2.3. Ácido nucleico de leveduras hidroliza- do	25
4.2.4. Meio completo sólido	26
4.2.5. Meio de acetato de amônia	27
4.2.6. Meio mínimo galactose	28
4.2.7. MM líquido mais 2% de MC	28

4.2.8. Solução salina	28
4.2.9. Solução de "tween 80"	29
4.2.10. Solução de benlate	29
4.2.11. Solução de cloroneb	30
4.3. Medida do crescimento da colônia	31
4.4. Nomenclatura	32
4.4.1. Variantes morfológicos	32
4.4.2. Linhagens diplóides	33
4.5. Inoculação, semeadura, réplica, temperatura de incubação e diluições sucessivas	33
4.5.1. Inoculação	33
4.5.2. Semeadura	34
4.5.3. Réplica	34
4.5.4. Temperatura de incubação	35
4.5.5. Diluições sucessivas	35
4.6. Obtenção de colônias monoconidiais em origem..	35
4.7. Utilização de mutagênicos físicos; raios gama e luz ultra-violeta	36
4.7.1. Sobrevivência de conídios da linhagem <i>CHL-13</i> a mutagênicos físicos	37
4.7.2. Irradiação de conídios da linhagem <i>CHL-13</i> por dose de radiação gama ou luz ultra-violeta, correspondente a 5% de sobrevivência	40

4.7.3. Produção de setores a partir de microcolônias submetidas previamente à ação de raios gama ou de luz ultra-violeta.....	41
4.8. Purificação de setores	42
4.9. Grupos e tipos de variantes morfológicos	43
4.10. Obtenção de colônia monoconidial em origem, referente a cada tipo de variante morfológico	43
4.11. Teste de auxotrofia	44
4.12. Comportamento dos tipos de variantes morfológicos em presença ou ausência de cloroneb....	45
4.13. Seleção de variantes morfológicos	46
4.13.1. Análise da variância	46
4.13.2. Teste de Dunnett	46
4.13.3. Critérios para seleção dos variantes morfológicos resistentes e sensíveis ao cloroneb, que foram submetidos à análise genética	48
4.14. Análise genética	50
4.14.1. Obtenção de heterocários	50
4.14.2. Teste do heterocário	52
4.14.3. Ciclo parassexual	53
4.14.4. Análise meiótica	58
4.14.5. Teste de alelismo	62

4.15. Respostas das linhagens haplóides e diplóides às concentrações crescentes de cloroneb	63
4.16. Comportamento de linhagens haplóides com dife rentes genomas, porém, com genes para sensibi lidade ao cloroneb de origem comum	64
5. RESULTADOS	66
5.1. Curvas de sobrevivência relativas a conídios da linhagem <i>CHL-13</i> submetidos à ação de mutagê nicos físicos	66
5.1.1. Com relação a raios gama	66
5.1.2. Com relação à luz ultra-violeta	69
5.2. Frequência relativa de setores por placa, pro venientes de conídios não irradiados ou irra diados por dose equivalente a 5% de sobrevi vência, em relação a raios gama ou luz ultra violeta	71
5.3. Setores emergentes por ação de raios gama e luz ultra-violeta sobre microcolônias das li nhagens <i>ppy</i> e <i>CHL-13</i>	72
5.4. Grupos de variantes morfológicos e tipos repre sentativos	75
5.5. Auxotrofia dos variantes morfológicos	83
5.6. Crescimento de diferentes linhagens em diferen tes concentrações de cloroneb	83

5.7. Seleção de variantes morfológicos para análise genética	88
5.7.1. Resultados das análises de variância...	88
5.7.2. Variantes morfológicos selecionados através do teste de Dunnett	91
5.7.3. Variantes morfológicos que foram submetidos à análise genética	92
5.8. Análise genética	94
5.8.1. Distinção entre herança nuclear e extra nuclear	94
5.8.2. Análise mitótica	95
5.8.2.1. Obtenção e mensuração de diplóides	95
5.8.2.2. Haploidização dos diplóides ..	97
5.8.3. Análise meiótica	103
5.8.4. Alelismo ou heterogeneidade genética...	104
5.9. Curvas de dose-resposta	104
5.10. Influência de outros genes na sensibilidade ao cloroneb	111
6. DISCUSSÃO	114
6.1. Possível utilização da linhagem <i>CHL-13</i> na detecção de mutagênicos	114
6.2. Análise dos setores emergentes da linhagem <i>CHL-13</i> submetida a várias doses de radiação gama ou luz ultra-violeta	116

	Página
6.3. Análise genética dos setores	117
6.4. Relação de dominância	123
7. CONCLUSÕES	126
8. SUMMARY	127
9. LITERATURA CITADA	129

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
01 - Símbolos dos genes marcadores e os respectivos significados	22
02 - Sobrevivência de conídios da linhagem <i>CHL-13</i> submetidos previamente à ação de raios gama ...	67
03 - Sobrevivência de conídios da linhagem <i>CHL-13</i> submetidos previamente à ação da luz ultra-violeta	69
04 - Frequência de setores por placa, provenientes de conídios irradiados ou não (controles)	72
05 - Número de setores emergentes da linhagem <i>CHL-13</i> de acordo com a dose de radiação por raios gama	73
06 - Número de setores emergentes da linhagem <i>CHL-13</i> de acordo com o tempo de exposição à luz ultra-violeta	74
07 - Grupos de variantes morfológicas e tipo representativo de cada grupo, obtidos por ação de raios gama	77
08 - Grupos de variantes morfológicas e tipo representativo de cada grupo, obtidos por ação de luz ultra-violeta	79

- 09 - Diâmetros das colônias correspondentes aos tipos de variantes morfológicos obtidos por ação de raios gama sobre a linhagem *CHL-13*, as linhagens *ppy* e *CHL-13* em diferentes concentrações de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas. Três repetições por linhagem e por concentração de cloroneb 85
- 10 - Diâmetros das colônias correspondentes a 14 tipos de variantes morfológicos obtidos por ação de luz ultra-violeta sobre a linhagem *CHL-13'*, as linhagens *ppy* e *CHL-13*, em diferentes concentrações de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas. Três repetições por linhagem e por concentração de cloroneb..... 86
- 11 - Diâmetros das colônias correspondentes a 15 tipos de variantes morfológicos obtidos por ação de luz ultra-violeta sobre a linhagem *CHL-13*, as linhagens *ppy* e *CHL-13*, em diferentes concentrações de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas. Três repetições por linhagem e por concentração de cloroneb 87
- 12 - Resultados da análise da variância sobre os dados constantes na Tabela 9; entre linhagens, entre dosagens e entre linhagens e dosagens 88

13 - Desdobramento dos graus de liberdade da fonte de variação linhagem dentro de dosagem, baseado na Tabela 12	89
14 - Resultados da análise de variância sobre os dados constantes na Tabela 10; entre linhagens, entre dosagens e entre linhagens e dosagens	89
15 - Desdobramento dos graus de liberdade da fonte de variação linhagem dentro de dosagem, baseado na Tabela 14	90
16 - Resultados da análise de variância sobre os dados constantes na Tabela 11, entre dosagens, entre linhagens e entre linhagens e dosagens	90
17 - Desdobramento dos graus de liberdade da fonte de variação linhagem dentro de dosagem, baseado na Tabela 16	91
18 - Variantes morfológicos selecionados pelo teste de Dunnett	92
19 - Linhagens resistentes e uma sensível ao cloroneb utilizadas para análise genética, selecionadas de acordo com o item 4.13.2.	93
20 - Resultados dos testes de heterocários	94
21 - Diâmetros médios de conídios (DMC) em micra. Média de cinco conídios com cinco repetições	96

22 - Localização do <i>locus</i> para resistência ou sensibilidade ao cloroneb, utilizando os setores brancos resultantes de haploidização dos diplóides: a) <i>CLV-2.5//MSE</i> ; b) <i>CLV-4.8//MSE</i> ; c) <i>CLG-16.1//MSE</i>	100
23 - Localização do <i>locus</i> para resistência ou sensibilidade ao cloroneb, utilizando os setores brancos resultantes de haploidização dos diplóides: a) <i>CLV-8.2//MSE</i> ; b) <i>CLV-8.16//MSE</i> ; c) <i>CLV-32.5//MSE</i>	101
24 - Localização do <i>locus</i> para resistência ou sensibilidade ao cloroneb, utilizando os setores brancos resultantes de haploidização dos diplóides: a) <i>CLG-16.6//CHL-17</i> ; b) <i>CLV-16.15//CHL-17</i>	102
25 - Mapeamento do <i>locus</i> para resistência ou sensibilidade cloroneb, para cada variante morfológico, levando em consideração os <i>loci</i> para resistência ao cloroneb e <i>gal</i> , ambos localizados no grupo de ligação III	103
26 - Diâmetros das colônias das linhagens haplóides resistentes, <i>CLV-4.8</i> e <i>CLV-8.15</i> , da linhagem MSE e das linhagens diplóides <i>CLV-4.8//MSE</i> e <i>CLV-8.15//MSE</i> , em concentrações crescentes de cloroneb	105

Tabela

Página

27 - Diâmetros de colônias das linhagens haplóides resistentes <i>CLV-32.5</i> e <i>CLV-8.2</i> , da linhagem MSE e das linhagens diplóides <i>CLV-32.5//MSE</i> e <i>CLV-8.2//MSE</i> , em concentrações crescentes de cloroneb	106
28 - Comportamento dos produtos de haploidização da linhagem <i>CLV-8.2//MSE</i> , em diferentes meios de cultura	112
29 - Comportamento dos produtos de haploidização da linhagem <i>CLV-8.2//MSE</i> , em concentrações crescentes de cloroneb	113

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01 - Representação esquemática dos grupos de ligação da linhagem MSE e de seus respectivos genes marcadores. Melhor esclarecimento a respeito pode ser encontrado em CLUTTERBUCK (1974).....	21
02 - Curva de sobrevivência de conídios da linhagem <i>CHL-13</i> , submetidos previamente à ação de raios gama	68
03 - Curva de sobrevivência de conídios da linhagem <i>CHL-13</i> , submetidos previamente à ação de luz <u>ú</u> ltra-violeta	70
04 - Setor emergente de colônia da linhagem <i>CHL-13</i> , submetida à ação de raios gama. Dose - 2 Kr ...	75
05 - Comportamento das linhagens <i>CLV-4.8</i> (▲....▲), <i>CLV-4.8//MSE</i> (●—●) e MSE (■ --- ■) em concentrações crescentes de cloroneb. Figura baseada nos dados contidos na Tabela 26	107
06 - Comportamento das linhagens <i>CLV-8.15</i> (▲....▲), <i>CLV-8.15//MSE</i> (●—●) e MSE (■ --- ■) em concentrações crescentes de cloroneb. Figura baseada nos dados contidos na Tabela 26	108
07 - Comportamento das linhagens <i>CLV-8.2</i> (▲....▲), <i>CLV-8.2//MSE</i> (●—●) e MSE (■ --- ■) em concentrações crescentes de cloroneb. Figura baseada nos dados contidos na Tabela 27	109

Figura

Página

- 08 - Comportamento das linhagens *CLV-32.5* ($\blacktriangle \dots \blacktriangle$),
CLV-32.5//MSE ($\bullet \text{---} \bullet$) e MSE ($\blacksquare \text{---} \blacksquare$) em con-
 centrações crescentes de cloroneb. Figura baseada
 da nos dados contidos na Tabela 27 110

1. RESUMO

A utilização de linhagem de *Aspergillus nidulans* para a detecção de substâncias que acarretam mutação 'de ponto, tem recebido relativa atenção por parte dos pesquisadores. Com aquela finalidade, foi verificada na presente pesquisa a possibilidade de utilização de uma linhagem (CHL-13) que é resistente e parcialmente dependente do cloroneb para detecção de mutagênicos físicos. Verificou-se a possibilidade dessa linhagem ser utilizada para tal mister.

Foram, estatisticamente, selecionadas para análise genética seis linhagens resistentes e duas sensíveis, das 201 obtidas através do método de emersão de setores.

Pelo teste de alelismo verificou-se que os fatores genéticos pertenciam a um mesmo *locus*; testes de heterocário mostraram que fatores extranucleares não influíram na manifestação do caráter resistência ou sensibilidade ao cloroneb; por análise mitótica concluiu-se que o *locus* em

epígrafe estava no grupo de ligação III; análise meiótica indicou que o *locus* para resistência ou sensibilidade ao cloroneb situava-se a aproximadamente 30 unidades de recombinação do *locus galA*₁, além de ter sido verificado através de oito diferentes produtos de haploidização, que genes de outros *loci* não influíram na sensibilidade da linhagem ao cloroneb.

2. INTRODUÇÃO

O fenômeno da resistência a fungicidas agrícolas tem sido objeto de inúmeros estudos, principalmente após a introdução no mercado de fungicidas sistêmicos, com relação aos quais, maior frequência de mutantes resistentes tem sido detectada.

Entre os fungicidas sistêmicos, no grupo dos hidrocarbonetos aromáticos situa-se o cloroneb em relação ao qual a ocorrência de mutantes resistentes é bastante frequente.

Uma característica interessante apresentada pelos mutantes resistentes ao cloroneb é a semi-dependência da droga, característica esta, que permite grande facilidade na distinção entre colônias resistentes e sensíveis, quando estas são encontradas em meio sólido sem cloroneb.

Objetiva-se, no presente trabalho, usar uma linhagem de *Aspergillus nidulans* resistente e parcialmente de-

dependente de cloroneb para obter revertentes e verificar se o método pode ser usado com sucesso na detecção de mutagênicos. Pretende-se ainda analisar, do ponto de vista genético, alguns dos mutantes obtidos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Embora o problema da resistência em , fungos com relação a certas substâncias inibidoras já houvesse sido estudado, sob o ponto de vista genético, com o uso de linhagens de *Aspergillus nidulans*, tais como: resistência à acriflavina (ROPER e KÄFER, 1957), ao fluroacetato (APIRION, 1962), à fluorfenilalanina, teoquil, iodoacetato, actidiona e verde malaquita (WARR e ROPER, 1965), o primeiro pesquisador a se utilizar de linhagens de *A. nidulans* para desvendar o mecanismo genético envolvido na resistência de fungos a fungicidas agrícolas foi THRELFALL (1968), o qual admitiu que a não utilização deste fungo por outros pesquisadores foi devido ao fato do mesmo não ser um patógeno de plantas.

Para melhor entendimento, a presente revisão da literatura será descrita em itens, considerando-se apenas a obtenção e estudos genéticos de mutantes resistentes a fungicidas do grupo dos hidrocarbonetos aromáticos onde se loca

liza o cloroneb. Completando, será introduzido no contexto um item a respeito da utilização de linhagens de *A. nidulans* na detecção de mutagênicos.

3.1. Obtenção de mutantes resistentes a hidrocarbonetos aromáticos

THRELFALL (1968) em suas pesquisas pioneiras com esse grupo de fungicidas utilizou-se de dois fungistáticos: o pentacloronitrobenzeno (PCNB) e o tetracloronitrobenzeno (TCNB). Com referência ao PCNB, conídios de linhagens sensíveis de *Aspergillus nidulans* foram semeados em placas contendo meio de cultura adicionado de 200 µg/ml de PCNB, originando três mutantes resistentes. No caso do TCNB foram feitos inóculos de linhagens sensíveis em placas contendo meio de cultura mais 500µg/ml de TCNB, para obtenção de setores. Este método foi usado várias vezes, mas somente um setor resistente foi isolado. Os genes para resistência relacionados com as linhagens resistentes foram designados por *pcnb*₁, *pcnb*₂, *pcnb*₃ e *tcnb*₁. Não foi constatada diferença entre os requisitos nutricionais das linhagens mutantes e os das linhagens que lhes deram origem.

Usando método análogo ao usado por THRELFALL (1968) para o TCNB, PACHECO SANT'ANA (1974) e AZEVEDO, PACHE

CO SANT'ANA e BONATELLI (1977), usaram a linhagem *biA₁*; *methG₁* e placas contendo meio sólido e cloroneb em concentração tal que impedia o desenvolvimento da colônia sensível. As colônias que surgiram foram ensaiadas para resistência ao cloroneb e dentre as resistentes obtidas foi selecionada a linhagem *chl₁* para análise genética. Obtiveram ainda, estes pesquisadores, mutantes resistentes ao cloroneb por um método semelhante ao descrito por THRELFALL (1968) com relação ao TCNB, somente que os inóculos dos conídios da linhagem *biA₁*; *methG₁* foram feitos em placas contendo meio sólido e uma concentração de cloroneb que reduzia grandemente o tamanho das colônias sensíveis. Dos setores vigorosos emergentes das colônias sensíveis um foi purificado, originando a linhagem *chl₂*, a qual não foi submetida à análise genética.

TUYL (1977) em uma ampla pesquisa, utilizou-se de diferentes tipos de fungicidas e diferentes fungos, entre estas linhagens de *A. nidulans* e entre os fungicidas o cloroneb. Foram obtidos dez mutantes resistentes ao cloroneb, sendo dois por mutação natural (*CHL-1* e *CHL-2*) e oito por tratamento prévio dos conídios por luz ultra-violeta (*CHL-3*, *CHL-4*, *CHL-5*, *CHL-6*, *CHL-7*, *CHL-8*, *CHL-9*, *CHL-10*). Para obtenção dos mutantes, conídios previamente irradiados ou não foram semeados em meio sólido ou entre duas camadas de meio sólido ao qual foi adicionado o cloroneb, que impedia o crescimento das colônias sensíveis.

MARTINEZ ROSSI (1979) inoculou conídios da linhagem *proA₁ pabaA₆ yA₂*, em dois pontos diametralmente opostos em placas contendo meio sólido e concentrações crescentes de cloroneb (51,9 a 280 µg/ml). Após sete dias de incubação a 37°C surgiram setores dos quais, após purificação, cinco deles originaram as linhagens *CHL-11*, *CHL-12*, *CHL-13*, *CHL-14* e *CHL-15*.

3.2. Caracterização dos mutantes resistentes ao cloroneb e análise genética

VONVOYANNI e GEORGOPOULOS (1966) em pesquisa realizada a respeito da relação de dose-resposta, na tolerância de *Hypomyces* ao difenil, afirmaram que os mutantes resistentes são caracterizados por seus respectivos graus de resistência e que para se obter completa informação sobre a sensibilidade dos mutantes e da linhagem que lhes deu origem foram feitas as curvas de dose-resposta.

THRELFALL (1968; 1972) utilizou-se de curvas de dose-resposta do modo preconizado por VONVOYANNI e GEORGOPOULOS (1966), tendo verificado que o mutante mais resistente ao PCNB foi aquele isolado em presença de TCNB.

Os mutantes resistentes *Chl₁* e *Chl₂* isolados por AZEVEDO, PACHECO SANT'ANA e BONATELLI (1977) foram por

eles caracterizado através das curvas de dose-resposta como sendo resistentes e parcialmente dependentes de cloroneb.

As relações de dose-resposta para mutantes resistentes ao cloroneb em *A. nidulans*, com referência à sensibilidade destes mutantes à concentrações crescentes de cloroneb e PCNB, foram estabelecidas por TUYL (1977) através das curvas de dose-resposta feitas para as linhagens *CHL-1*, *CHL-4* e *CHL-8*, para as linhagens que lhes deram origem e para a linhagem MSE. Analisando estas curvas, TUYL (1977) verificou que existe uma estreita relação entre os graus de resistência destes mutantes com relação ao cloroneb e PCNB, tendo admitido como provável a existência de um único *locus* como responsável pela resistência a hidrocarbonetos aromáticos. Admitiu ainda, que em curvas de dose-resposta, quanto mais sensível for a linhagem mais brusca será a inclinação da curva.

MARTINEZ ROSSI (1979) além de se utilizar de curvas de dose-resposta, estimou a inclinação da curva de dose-resposta para todos os mutantes resistentes e parcialmente dependentes de cloroneb por ela obtidos através do ED_{50} , conceituado como a dose efetiva que causa 50% de inibição no diâmetro das colônias.

O ED_{50} para as linhagens sensíveis (MSE, *proA₁*, *paba A₆*, *yA₂* e selvagem) variou de 19 a 33 µg de cloroneb por mililitro de meio sólido, enquanto que para quatro

das cinco linhagens resistentes foi sempre acima de 1.500 µg/ml. No caso da linhagem *CHL-13*, o ED_{50} estava próximo de 440 µg/ml, o que evidenciou, segundo a pesquisadora, uma menor dependência ou uma maior toxidez do fungicida para esta linhagem.

THRELFALL (1968) efetuou um teste de 3 pontos entre as linhagens *bi*₁; *tenb*₁ e *yA*₂; *meth*₁ *gal*₁; *nic*₈; *ribo*₂, tendo analisado 108 produtos pós meióticos dos quais 79 (15 resistentes e 64 sensíveis) eram tipos parentais, 11 (seis resistentes e cinco sensíveis) provenientes de permutas entre *meth*₂ e *tenb*₁, 17 (três resistentes e 14 sensíveis) provenientes de permuta entre *tenb*₁ e *arg*₂ e um (um resistente e nenhum sensível) com permuta nas duas regiões. Afirmou o pesquisador que o *locus tenb*₁ estava situado entre *meth*₂ e *gal*₁.

AZEVEDO, PACHECO SANT'ANA e BONATELLI (1977) verificaram a não ocorrência de ligação meiótica entre o *locus* para resistência ao cloroneb, por eles considerado como pertencente ao grupo de ligação IV e qualquer um dos genes marcadores, *pyro A*₄ e *methG*₁, localizados neste mesmo grupo.

Dos dez mutantes resistentes ao cloroneb isolados por TUYL (1977) somente a linhagem *CHL-8* foi submetida à análise meiótica. Verificou que quatro *loci* referentes à resistência a quatro fungicidas: cicloexamida (*actC*), carboxin (*carC*), imazalil (*ima G*) e cloroneb (*chlA*) estavam liga-

dos entre si. O mapa de ligação do grupo III pode ser visto esquematizado abaixo:

<i>chl A</i>	<i>phen A</i>	<i>ima G</i>	<i>car C</i>	<i>act C</i>
35	2	18	32	

Afirmou que a localização do *locus chlA*, a 35 unidades do mapa do *ima G* estava de acordo com o suposto alelismo com o *penb* e que THRELFALL (1968) mapeou este *locus* a 15 unidades do *locus arg B* e a 17 unidades de *gal A₁*. Afirmou ainda, que a posição do *locus chlA*, esquematização a seguir, estava de acordo com o mapa de ligação de CLUTTERBUCK (1974), referente a um segmento do grupo III:

		(<i>penbA</i>)		(<i>actA</i>)				
<i>s A</i>	<i>arg B</i>	<i>chlA</i>	(<i>gal A₁</i>)	<i>ima G</i>	<i>phen A</i>	<i>carC</i>	<i>actC</i>	
///	15	12		2(5)	18	32		

Para as linhagens *CHL-12*, *CHL-13*, *CHL-14*, MARTINEZ ROSSI (1979) verificou, através de cruzamentos com a linhagem MSE, que o *locus* para resistência ao cloroneb estava aproximadamente a 32 unidades do *locus galA₁*.

O gene *chl₁₁*, que não foi localizado em seu grupo de ligação, apresentou uma fraca ligação genética com o marcador *galA₁* e nenhuma ligação com genes marcadores dos demais grupos de ligação. Para justificar o fato, MARTINEZ ROSSI (1979) procurou relacioná-lo com o fenômeno da instabi

lidade em *Aspergillus nidulans*, por considerar que a instabilidade que ocorria com a linhagem *CHL-11* era semelhante a que existia em linhagens com duplicações cromossômicas, fato observado primeiramente por BAINBRIDGE e ROPER (1966) e posteriormente por NGA e ROPER (1968) e AZEVEDO E ROPER (1970). Procurou a pesquisadora justificar a instabilidade da linhagem pela ocorrência de uma região cromossômica com material genético em excesso, possivelmente uma duplicação, localizada no grupo de ligação III.

Nos testes de alelismo realizados entre os mutantes obtidos em relação ao PCNB, THRELFALL (1968) não encontrou nenhum recombinante sensível em centenas de ascósporos analisados o que sugeria que os genes, para resistência à droga, eram realmente alelos ou genes situados em *loci* muito próximos.

Em cruzamento realizado entre uma linhagem portadora do gene *penb*₁ e outra com o gene *tenb*₁, foi encontrado um recombinante sensível em 98 ascósporos analisados, fato que indicava, segundo o pesquisador, que os genes poderiam pertencer a *loci* distintos.

TUYL (1977), apesar de não ter efetuado teste de alelismo, afirmou que as dez linhagens resistentes ao *cloroneb* por ele obtidas eram provenientes de mutações em um mesmo *locus*.

Testes de alelismo foram realizados por MARTINEZ ROSSI (1979), tendo a pesquisadora afirmado que os genes *chl₁₁*, *chl₁₂*, *chl₁₃* e *chl₁₄* pertenciam a um mesmo *locus*.

3.3. Relação de dominância em mutantes resistentes usando diplóides

Afirmou THRELFALL (1968) que a tentativa para medir a taxa de crescimento dos heterozigotos diplóides foi frustrada devido à emergência de setores, mais cedo ou mais tarde, a partir das colônias de heterozigotos diplóides, quando estas cresciam em meio sólido + PCNB, mas afirmou que o caráter resistência era recessivo.

AZEVEDO, PACHECO SANT'ANA e BONATELLI (1977) através da observação das curvas de dose-resposta do diplóide e das linhagens haplóides que o originaram, verificaram que o gene para resistência ao cloroneb era semi-dominante, fenômeno semelhante ao observado em mutantes resistentes à acriflavina (ROPER e KÄFER, 1957) e a actidione (WARR e ROPER, 1965).

Considerando que o estudo da dominância era frequentemente dificultado na decisão de qual critério adotar, pois existem vários graus de dominância, TUYL (1977) para uma quantificação do grau de dominância tomou como padrão

o valor do ED_{50} das linhagens sensíveis, por inibição do crescimento por tóxicos e conceituou o Fator de Resistência como segue:

$$\text{Fator de Resistência} = \frac{\text{Valor do } ED_{50} \text{ do haplóide resistente (Heterozigoto diplóide)}}{\text{Valor do } ED_{50} \text{ do haplóide sensível (diplóide)}}$$

A porcentagem de dominância foi calculada como sendo a razão entre o fator de resistência do diplóide heterozigoto resistente e aquele do haplóide resistente, multiplicando a razão por 100.

Usando tal metodologia TUYL (1977) verificou que o grau de dominância em relação à resistência aos fungicidas por ele utilizados podia variar de totalmente recessivo, no caso do mutante resistente ao cloroneb (*CHL-8*), à completa dominância, no caso de alguns mutantes resistentes à ciclohexamida.

A comparação das curvas de dose resposta referente às linhagens haplóides *CHL-11*, *CHL-12*, *CHL-13*, *CHL-14*, *CHL-15* com as dos diplóides originados do cruzamento de cada uma, com a linhagem MSE e com a curva de dose resposta desta última linhagem, levou MARTINEZ ROSSI (1979) a afirmar que o caráter resistência ao cloroneb em *A. nidulans* é realmente recessivo.

ELISBÃO (1980) constatou nos ensaios efetuados com outros mutantes resistentes e parcialmente dependentes de cloroneb vários graus de dominância, tais como: dominante, sobredominante, semi-dominante e recessivo.

3.4. *Aspergillus nidulans* e a detecção de mutagênicos

A utilização de linhagens de *A. nidulans* para a verificação de mutações induzidas, tanto diretas quanto reversas, teve início com o trabalho de SIDDIQI (1962a). O autor utilizou a linhagem *biA₁; methG₁* e o ácido nitroso como substância mutagênica. O sistema preconizado por SIDDIQI (1962a), pela facilidade de detecção de mutações diretas e reversões verdadeiras ou decorrentes de supressores, serviu de base para os estudos realizados por LILLY (1963 e 1965), BALL e ROPER (1966), ALDERSON e CLARK (1968); AILYNG (1969), PUTRAMENT et alii (1970), KLINCZUK (1970) e SCOTT et alii (1973). MOURA DUARTE (1968, 1971 e 1972) utilizando este mesmo sistema foi o primeiro pesquisador a usar uma linhagem de *A. nidulans* na procura de possíveis mutagênicos, dentro de uma família de ésteres inorgânicos. Confirmou que os sulfatos de metila, etila, propila e butila eram mutagênicos, como havia sido proposto por KOLMARK (1963), trabalhando com *Neurospora crassa*, mas que o iodeto de metila e os sulfetos

de dimetila e dietila não o eram.

Um outro sistema com a mesma finalidade, baseado na indução de mutantes resistentes à p-fluorfenilalanina e simultaneamente dependentes parciais de tirosina foi proposto por MORPURGO (1962a). Este sistema foi usado por CALVORI e MORPURGO (1966) para o estudo de mutação induzida por luz ultra-violeta e ácido nitroso e por SINHA (1967) na verificação de resistência à p-fluorfenilalanina.

Um sistema que leva em consideração o fenômeno da resistência a um inibidor, baseado na reversão de mutantes resistentes a 8-azaguanina, foi elaborado por MORPURGO (1962b). Este sistema foi utilizado por ARLETT (1966) para analisar a influência do citoplasma na resistência à 8-azaguanina e por BIGNAMI et alii (1977) para verificar entre 13 pesticidas quais seriam os mutagênicos.

Fundamentado no fenômeno da resistência a 2-tioxantina, no qual estão implicados pelo menos oito *loci*, foi estruturado mais um sistema por DARLINGTON e SCAZZOCHIO (1967), ALDERSON e SCAZZOCHIO (1967), ALDERSON (1969), ALDERSON e HARTLEY (1969) e HARTLEY (1970). DE SERRES (1972), o recomendou para detecção de mutagênicos.

OLIVEIRA (1978) verificou que linhagens resistentes à arginina podiam ser facilmente obtidas e que na reversão, além de verdadeira, estariam envolvidos sete supressores, além de fatores citoplasmáticos. Concluiu que uma li-

nhagem sensível à arginina poderia ser utilizada na detecção de mutagênicos.

O fenômeno de resistência ao cloroneb, dado à facilidade com que se obtêm mutantes resistentes e reversíveis sensíveis, aqueles tendo a sua evidenciação favorecida pela propriedade de dependência parcial do fungicida apresentada pelas linhagens com as quais trabalharam, levou AZEVEDO PACHECO SANT'ANA e BONATELLI (1977), MARTINEZ ROSSI (1979) e ELISBÃO (1980) a preconizarem um sistema para detecção de mutagênicos. Outros sistemas voltados especialmente à detecção de mutações de ponto podem ser encontrados em ROPER (1971), HOLLAENDER (1971), CLUTTERBUCK (1974), LEGATOR (1976) e HOLSTEIN et alii (1979).

Outros sistemas foram criados empregando *A. nidulans* para a detecção de mutagênicos que atuam em outros níveis além da mutação de ponto.

BIGNAMI et alii (1974) utilizaram duas linhagens diplóides (MORPURGO, 1962b) para detectar rapidamente a capacidade mutagênica de drogas farmacêuticas, através do aumento da não disjunção induzida, fenômeno este que já havia sido constatado por MORPURGO (1961), LHOAS (1961 e 1968), VAN ARKELL (1963), HASTIE (1970) e KAPPAS e GEORGOPOULOS (1974) com o uso de outras substâncias. Com a mesma finalidade acompanharam o aumento da permuta mitótica por ação da droga ensaiada, aumento este que já havia sido verificado por MORPUR

GO (1963), SHANFIELD e KÄFER (1971) e CLACKOWER (1972), também usando outras substâncias.

BIGNAMI et alii (1977) utilizaram os mesmos sistemas para ensaiar pesticidas.

GEORGOPOULOS, KAPPAS e HASTIE (1976) ensaiaram 18 fungicidas quanto a capacidade de acarretarem um aumento de não-disjunção e concluíram que somente o faziam aqueles que comprovadamente atuavam no material hereditário. Entre estes situavam-se os fungicidas aromáticos, pois apesar do amplo espectro de ação destes fungicidas, incluindo inibição de síntese protéica (WEBER e OGAWA, 1965), na permeabilidade da membrana (GEORGOPOULOS, ZAFERATIS e GEORGANDES, 1967), alteração na parede (MACRIS e GEORGOPOULOS, 1967 e THRELFALL, 1972), o efeito primário seria ao nível do material hereditário e portanto os demais efeitos seriam tão somente consequência de concentrações elevadas dos fungicidas.

KAPPAS (1977) utilizou uma linhagem diplóide e a técnica da ativação metabólica (AMES et alii, 1975) para examinar o poder mutagênico do daconil, um fungicida do grupo dos aromáticos e que não havia se mostrado mutagênico nos ensaios de GEORGOPOULOS, KAPPAS e HASTIE (1976).

DE BERTOLDI, BARALE e GIOVANETTI (1978) utilizaram o fenômeno da conversão gênica para detecção de mutagênicos. Basearam-se na concepção de ZIMMERMAN (1971), corrobo-

rada por MURTHY (1979), de que existe uma correlação muito estreita entre a capacidade mutagênica e a convertogênica de uma substância.

DE BERTOLDI, GRISELI e BARALE (1979) explorando fundamentalmente a estrutura fina do locus *pabaA₁* (SIDDIQI, 1972b) prepararam três linhagens diplóides destinadas à detecção de mutagênicos.

Outro sistema que tem por finalidade a detecção de mutagênicos baseia-se no incremento da transposição do determinante de deterioração de um grupo de ligação para outro, como foi verificado por ROSATO (1973) e ROSATO e AZEVEDO (1979) com o uso de linhagens deterioradas e o etil metanosulfanato como agente indutor da transposição.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagens utilizadas

Foram utilizadas quatro linhagens de *Aspergillus nidulans*.

a) MSE (Master Strain E): Foi obtida por McCULLY e FORBES (1965), sendo caracterizada por apresentar marcadores genéticos específicos para cada um dos oito grupos de ligação do *A. nidulans*. É sensível ao cloroneb e possui conídios brancos.

Na Figura 1 estão representados os oito grupos de ligação com os símbolos dos respectivos genes marcadores, sendo que o significado de cada símbolo pode ser encontrado na Tabela 1.

GRUPOS DE LIGAÇÃO	MARCADORES GENÉTICOS	
I	$\underset{ }{suA_1}$ adE_{20}	o $\underset{ }{yA_2}$ adE_{20}
II	$\underset{ }{wA_3}$	o
III	$\underset{ }{galA_1}$	o
IV		o $\underset{ }{pyroA_4}$
V		$\underset{ }{facA_{303}}$
VI	$\underset{ }{sB_3}$	
VII		o $\underset{ }{nicB_8}$
VIII		o $\underset{ }{riboB_2}$

o = centrômero

Figura 1 - Representação esquemática dos grupos de ligação da linhagem MSE e de seus respectivos genes marcadores. Melhor esclarecimento a respeito pode ser encontrado em CLUTTERBUCK (1974).

TABELA 1 - Símbolos dos genes marcadores e os respectivos significados.

Símbolos dos genes marcadores	Significados
<i>adE</i> ₂₀	Requisito para adenina
<i>facA</i> ₃₀₃	Incapaz de crescer em meio contendo acetato como única fonte de carbono.
<i>galA</i> ₁	Incapaz de crescer em meio contendo galactose como única fonte de carbono.
<i>nicB</i> ₃	Requisito para ácido nicotínico.
<i>pabaA</i> ₆	Requisito para ácido <i>p</i> -aminobenzóico.
<i>proA</i> ₁	Requisito para prolina.
<i>pyroA</i> ₄	Requisito para piridoxina.
<i>riboB</i> ₂	Requisito para riboflavina.
<i>sB</i> ₃	Requisito para tiosulfato.
<i>suA</i> ₁ <i>adE</i> ₂₀	Supressor do mutante <i>adE</i> ₂₀ .
<i>wA</i> ₃	Conídios brancos.
<i>yA</i> ₂	Conídios amarelos.

b) *CHL-17* - Possui as mesmas marcas da MSE, conídios brancos, porém é resistente ao cloroneb. Linhagem obtida e gentilmente cedida por ELISBÃO (1980).

c) LINHAGEM *proA*₁ *paba*₆ *yA*₂ - Incapaz de crescer na ausência de prolina ou de ácido *p*-aminobenzóico

ou de ambos. Possui genes marcadores, os quais designam a linhagem, no grupo de ligação I. Possui conídios amarelos. No presente trabalho esta linhagem será designada por *ppy*.

d) *CHL-13* - Linhagem obtida, através de setor emergente de colônia de linhagem *ppy* que se desenvolveu em meio sólido + cloroneb (60 µg/ml), por MARTINEZ ROSSI (1979). Possui as mesmas características nutricionais da linhagem *ppy*, sendo porém resistente ao cloroneb.

As linhagens MSE e *ppy* são originárias do Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra e podem ser encontradas no estoque do Setor de Genética de Microorganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP.

4.2. Meios de cultura e soluções utilizadas

4.2.1. Meio mínimo sólido (PONTECORVO et alii, 1953-Modificado)

Genericamente designado por MM nas páginas seguintes. Caracteriza-se por apresentar uma fonte de nitrogênio (NaNO_3), uma fonte de carbono (glicose), sais minerais e

ágar, de acordo com as especificações abaixo:

Nitrato de Sódio	6,0 gramas
Cloreto de Potássio	0,52 gramas
Sulfato de Magnésio $7H_2O$	0,52 gramas
Fosfato de dihidrogenado de Po- tássio	1,52 gramas
Sulfato de Ferro	0,01 grama
Sulfato de Zinco	0,01 grama
Glicose	10,0 gramas
Ágar	15,0 gramas
Água Destilada	1 litro

O pH foi ajustado para 6,8 com hidróxido de sódio.

O MM assim constituído foi autoclavado a $120^{\circ}C$ e a uma atmosfera de pressão por 15 minutos. A conservação foi feita à temperatura ambiente.

4.2.2. Solução de vitaminas

Entram na constituição desta solução:

Ácido <i>p</i> -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

A solução foi levada ao banho-maria por 15 minutos. A conservação foi feita sob clorofórmio e o frasco que a continha, colocado em geladeira a 4°C.

4.2.3. Ácido nucleico de leveduras hidrolizado

Dois gramas de ácido nucleico de leveduras foram colocados em 15 ml de solução normal de ácido clorídrico e 2,0 gramas do mesmo ácido nucleico 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 para 6.0 e a solução resultante foi filtrada. O volume desta última solução foi elevado com água

destilada para 40 ml e a preparação foi guardada no refrigerador a 4°C sob clorofórmio.

4.2.4. Meio completo sólido (PONTECORVO et alii, 1953 - Modificado)

Genericamente designado por MC nas páginas que se seguem.

Apresenta este meio a seguinte constituição:

Peptona	2,0 g
Caseína Hidrolizada	1,5 g
Extrato de Leveduras	0,5 g
Solução de Vitaminas (preparada conforme descrito no item 4.2.2.).	1,0 ml
Hidrolizado de Ácido Nucleico de leveduras (preparado conforme descrito no item 4.2.3.)	2,5 ml
Meio Mínimo (preparado conforme descrito no item 4.2.4.) para completar	1.000,0 ml

O pH foi ajustado para 6.8.

O meio assim constituído foi autoclavado a

120°C a uma atmosfera de pressão por 15 minutos e conservado à temperatura ambiente.

4.2.5. Meio de acetato de amônia (APIRION, 1962)

Genericamente designado por MA nas páginas seguintes:

Na preparação deste meio entraram:

Acetato de Amônia	12,0 g
Cloreto de Sódio	2,0 g
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	0,5 g
Fosfato Hidrogenado de Potássio ..	3,0 g
Sulfato de Ferro	10 mg
Sulfato de Zinco	10 mg
Ágar	15,0 g
Água Destilada	1.000,0 ml

O pH foi ajustado para 6.1 com hidróxido de amônio ou ácido clorídrico.

A solução preparada com a constituição acima foi autoclavada a uma atmosfera de pressão a 120°C por 15 minutos e a conservação foi feita à temperatura ambiente.

4.2.6. Meio mínimo galactose (ROBERTS, 1959)

Genericamente designado por MG nas páginas que se seguem.

A preparação foi feita de maneira análoga a do MM (item 4.2.1.) com a substituição da glicose por galactose, como fonte de carbono.

O pH foi ajustado para 5.0.

4.2.7. MM líquido mais 2% de MC

Adicionou-se ao MM líquido (descrito no item 4.2.1., exceto ágar) 2% de MC líquido (MC descrito no item 4.2.4., exceto ágar).

4.2.8. Solução salina

Formaram esta solução:

Cloreto de Sódio	8,5 g
Água Destilada até	1.000,0 ml

A solução obtida foi autoclavada a uma atmosfera de pressão e 120°C por 15 minutos e distribuída em fras-

cos (9 ml por frasco), para facilitar os experimentos em que eram necessárias diluições sucessivas.

A conservação foi feita à temperatura ambiente.

4.2.9. Solução de "tween 80"

Foi preparada como segue:

"Tween 80"	0,1 ml
Água Destilada	100,0 ml

A solução assim preparada foi autoclavada a uma atmosfera de pressão a 120°C e conservada a temperatura ambiente.

4.2.10. Solução de benlate

Metil - 1 (butilcarb moil) 2 - ben zimidazol carbonato 50% P.A. (ben late)	100 mg
Água destilada esterilizada	100 ml

4.2.11. Solução de cloroneb

1,4 - dicloro - 2,5 - dimetoxibenze	
no (cloroneb)	1,0 g
Água destilada esterilizada	100 ml

Esta solução foi preparada com o produto bruto fornecido pela "Dupont do Brasil S/A." Os resultados foram verificados considerando-se somente o produto ativo, que corresponde a 65% do produto bruto.

4.2.12. Suplementos adicionados ao MM

O estoque de suplementos foi preparado, dissolvendo-se cada um deles em água destilada esterilizada.

Solução Estoque (mg/100 ml de H ₂ O)		Quantidade adi- cionada por pla- ca contendo 20 ml de meio de cultura	Concentração final no meio de cultura
Ácido nicotínico (<i>nic</i>)	10,0 mg	0,1 ml	0,50 µg/ml
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico (<i>paba</i>)	5,0 mg	0,1 ml	0,25 µg/ml
Adenina (<i>ade</i>)	500,0 mg	0,1 ml	25,00 µg/ml
Piridoxina (<i>pyro</i>)	5,0 mg	0,1 ml	0,25 µg/ml
Prolina (<i>pro</i>)	1000 mg	0,1 ml	50,00 µg/ml
Riboflavina (<i>ribo</i>)	10,0 mg	0,1 ml	0,50 µg/ml
Tiosulfato de Sódio(s)	2000 mg	0,1 ml	100,00 µg/ml

As soluções foram submetidas a banho-maria por 15 minutos e conservadas a 4°C.

Nas páginas que se seguem, com uso do símbolo de qualquer dos suplementos, já fica implícito o uso da concentração final da substância no meio de cultura em µg/ml.

4.3. Medida do crescimento da colônia

O diâmetro da colônia foi utilizado como parâmetro de crescimento, sempre expresso em milímetros e como média das medidas de dois diâmetros perpendiculares entre si.

4.4. Nomenclatura

4.4.1. Variantes morfológicos

Cada variante morfológico foi designado por três letras maiúsculas, como foi preconizado por CLUTTERBUCK (1974), porém nesta pesquisa, as duas primeiras letras foram relacionadas com o cloroneb e a terceira, com a fonte de radiação.

A terceira letra podia ser V ou G. A letra V, inerente à luz ultra-violeta e a letra G, a raios gama. Seguiam-se um hifem e dois números. O primeiro, relacionado com o tempo de exposição à luz ultra-violeta ou com a dose de radiação (Kr) quando em relação a raios gama; o segundo, em ambos os casos, indicando a ordem de isolamento do variante morfológico.

Exemplos:

- a) *CLV-2.4* - quarto variante morfológico isolado após exposição à luz ultra-violeta por 2 minutos.
- b) *CLG-2.5* - quinto variante morfológico isolado após aplicação de 2 Kr.

4.4.2. Linhagens diplóides

As linhagens diplóides foram sempre indicadas pelas linhagens que lhes deram origem, separadas por duas linhas paralelas inclinadas (//).

4.5. Inoculação, semeadura, réplica, temperatura de incubação e diluições sucessivas

4.5.1. Inoculação

O ato de inocular consistiu na introdução de conídios em meio sólido por intermédio de um fio de níquel cromo, preso na extremidade de uma haste metálica. Antes de seu uso, o fio de níquel-cromo foi sempre aquecido ao rubro em chama de bico de Bunsen e resfriado em solução salina. O termo inóculo e todos a ele relacionados foram utilizadas na aceção de todo o processo descrito, acompanhado do nome do local no qual foi feito o inóculo, se no centro geométrico da placa ou aproximadamente no centro de um de seus quadrantes.

4.5.2. Semeadura

Na semeadura, os conídios ou esporos contidos em 0,1 ml de solução salina foram espalhados em meio sólido por meio da alça de Drigalsky. O ato de semear e os termos a ele relacionados foram usados para indicar o processo acima descrito.

4.5.3. Réplica

Consistiu a réplica na transferência de conídios de 26 colônias contidas em placas de Petri, com disposição pré-estabelecida, por intermédio de 26 fios de níquel-cromo fixados em um disco de acrílico dotado de uma haste de metal para seu fácil manuseio (Replicador multifio). Os fios de níquel-cromo apresentavam uma disposição 1 + 5x5, isto é, um fio de níquel-cromo isolado e 25 dispostos em cinco fileiras, com cinco fios cada uma, conforme o fizeram AZEVEDO, OLIVEIRA e ROCHA CAMPOS (1976).

O replicador, antes do uso, teve sempre seus fios aquecidos ao rubro e resfriados em MM. O termo réplica e todos os outros a ele relacionados subentendem todo o processo descrito.

4.5.4. Temperatura de incubação

Toda incubação foi feita a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.5.5. Diluições sucessivas

Consistiu este método na transferência de 1 ml de uma solução contendo conídios, de um frasco para outro contendo 9 ml de solução salina e deste para outro frasco contendo 9 ml de solução salina e assim sucessivamente, até que fosse atingida uma concentração de conídios, a mais próxima possível da desejada. Em cada transferência de 1 ml de solução, a concentração de conídios no novo frasco ficava equivalente a décima parte da do frasco anterior. A designação "diluições sucessivas" implica todo o processo descrito.

4.6. Obtenção de colônias monoconidiais em origem

Com uma alça de níquel-cromo, conídios foram retirados de uma colônia da linhagem *CHL-13* e colocados em um tubo de ensaio contendo 2 ml de solução de "tween 80". A solução contendo os conídios foi fortemente agitada para que os conídios se individualizassem. Procedeu-se a contagem dos coní-

dios no hematímetro de Neubauer e pelo método das diluições sucessivas descrito no item 4.5.5. foi obtida uma concentração final aproximada de 67×10 conídios por mililitro de solução salina. Desta última solução os conídios contidos em 0,1 ml foram semeados em cada uma de um total de 12 placas contendo MC, perfazendo um total aproximado de 67 conídios por placa.

Através de processo análogo, foram obtidas 12 placas com cerca de 71 conídios da linhagem *ppy* por placa. As placas contendo os conídios semeados foram incubadas por 24-30 horas. Após este período de tempo, estavam as microcolônias com aproximadamente um milímetro de diâmetro.

4.7. Utilização de mutagênicos físicos; raios gama e luz ultra-violeta

Para fornecimento de radiação gama foi usada a fonte de ^{60}Co do Centro de Energia Nuclear da Agricultura-CENA - ESALQ/USP e para luz ultra-violeta uma fonte de ondas curtas (2537A°). Estas fontes de radiação foram utilizadas com três finalidades: para verificação da sobrevivência de conídios da linhagem *CHL-13*, quando expostos à ação de diferentes doses daquelas radiações; para a irradiação de conídios pela dose correspondente a 5% de sobrevivência para ca-

da fonte de irradiação e determinação da frequência relativa por placa, de setores emergentes das colônias originadas de conídios irradiados ou não; para indução da formação de setores a partir da irradiação por aquelas fontes, de microcolônias monoconidiais das linhagens *ppy* e *CHL-13*, obtidas como descrito no item 4.6.

4.7.1. Sobrevivência de conídios da linhagem *CHL-13* a mutagênicos físicos

Conídios de linhagem *CHL-13* foram inoculados no centro de uma placa contendo MC e a placa foi incubada por 96 horas. Após este período de tempo, conídios foram retirados da nova colônia com uma alça de níquel-cromo e colocados em um tubo de ensaio contendo 2,0 ml de solução "tween 80" até que a solução ficou turva. Esta suspensão de conídios foi fortemente agitada para que os conídios se individualizassem. Alíquotas de 1 ml, desta suspensão, foram colocados em dois frascos, contendo cada frasco 9 ml de solução salina.

Da suspensão de conídios contida em um dos frascos foram retirados 6 ml, os quais foram distribuídos em alíquotas de 1 ml por seis novos frascos, contendo 9 ml de solução salina, cada frasco. Um destes frascos foi reservado

para servir de controle e os outros cinco submetidos à ação de raios-gama, cada frasco a uma das seguintes doses: 20 Kr, 40 Kr, 60 Kr, 80 Kr e 100 Kr. O conteúdo de cada um dos seis frascos foi submetido a diluições sucessivas (Ver item 4.5.5.) até 10^{-5} .

Foram preparadas placas contendo MC (três placas por diluição e por dose de radiação). Em cada uma destas placas foi colocado 0,1 ml da suspensão de conídios correspondente. Os conídios foram semeados e as placas incubadas por 24-30 horas. Este procedimento foi realizado por três vezes. Foram determinados os títulos (número de conídios por mililitro de solução) correspondentes aos conídios sobreviventes às diversas radiações, levando em consideração, para cada dose de radiação, a diluição que possibilitou a sobrevivência de 30 a 300 conídios, através da fórmula:

$$\text{Título} = \frac{\text{Número de sobreviventes por placa} \times \text{Volume de suspensão de conídios colocado por placa} \times \text{Diluição correspondente à dose de radiação, que permitiu a sobrevivência de 30 a 300 conídios}}{1}$$

O título do controle foi considerado como tendo 100% de sobrevivência e serviu de base para o cálculo

das porcentagens de sobrevivência referentes às demais doses.

Da solução de conídios contida no outro frasco foi retirado 1 ml, o qual foi colocado em um frasco contendo 9 ml de solução salina, tendo sido este frasco destinado a servir de controle. Os 9 ml restantes foram colocados em uma placa de Petri e submetidos à ação de luz ultra-violeta, sendo que, nos intervalos correspondentes aos períodos de tempo de 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos e 5 minutos, alíquotas de 1 ml foram retiradas e colocadas em frascos contendo 9 ml de solução salina, um frasco para cada intervalo de tempo.

A partir destas suspensões e da suspensão de conídios correspondente ao controle, foram feitas diluições (Ver item 4.5.5.) até 10^{-5} .

As porcentagens de sobrevivência em relação à luz ultra-violeta correspondentes aos respectivos intervalos de tempo foram, então, determinadas com o uso dos mesmos critérios usados para raios gama substituindo 20 Kr, 40 Kr, 80 Kr e 100 Kr por 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos e 5 minutos, respectivamente.

4.7.2. Irradiação de conídios da linhagem *CHL-13* por dose de radiação gama ou luz ultra-violeta, correspondente a 5% de sobrevivência

Conídios foram retirados de uma colônia da linhagem *CHL-13* e colocados em um tubo de ensaio contendo 2 ml de "tween 80". A contagem em hematímetro de Neubauer revelou a ocorrência de $0,7 \times 10^6$ conídios por mililitro de solução.

Em um frasco contendo 9 ml de solução salina foi colocado 1 ml da suspensão de conídios. Desta suspensão de conídios, alíquotas de 1 ml foram colocadas em três frascos contendo cada frasco 9 ml de solução salina.

O conteúdo de dois destes frascos sofreram mais duas diluições e o terceiro, através do processo das diluções sucessivas (Ver item 4.5.5.), apresentou uma concentração final de aproximadamente 7×10^2 conídios por mililitro de solução salina.

As últimas soluções diluídas dos dois primeiros frascos foram submetidas à ação de mutagênicos físicos (luz ultra-violeta e raios gama) nas doses correspondentes à aquelas que determinaram uma sobrevivência de 5% dos conídios. A diluição final do terceiro frasco foi utilizada como controle.

Alíquotas de 0,1 ml destas suspensões de conídios, irradiados ou não, foram colocadas em placas contendo

MC, cinco placas por tipo de radiação e cinco relativas ao controle, tendo sido os conídios semeados.

Após 24-30 horas de incubação, microcolônias monoconidiais foram transferidas para o centro de placas contendo MC; 50 placas referentes a cada modalidade de radiação e 50 ao controle. Estas 150 placas, contendo cada uma, uma colônia monoconidial, foram incubadas por oito dias e após este período de tempo foi verificado o número de setores e-mergentes das respectivas colônias.

4.7.3. Produção de setores a partir de microcolônias submetidas previamente à ação de raios gama ou de luz ultra-violeta

As 12 placas contendo microcolônias da linhagem *CHL-13* obtidas de acordo com o item 4.6. foram utilizadas como segue: seis placas foram submetidas à ação de raios gama, uma placa a cada uma das seguintes doses: zero Kr, 2 Kr, 4 Kr, 8 Kr, 16 Kr e 32 Kr. As outras seis foram submetidas à ação de luz ultra-violeta, uma placa para cada período de tempo, como segue: zero minutos (controle), 2 minutos, 4 minutos, 8 minutos, 16 minutos e 32 minutos.

A utilização de doses de radiação de raios gama inferiores a necessária para acarretar 5% de sobrevivên-

cia de conídios (90 Kr) teve como principal finalidade, além da produção de setores, verificar se a linhagem *CHL-13* apresentava uma alta sensibilidade ao mutagênico quanto à produção de mutantes.

Com relação à utilização de luz ultra-violeta, foram usados períodos de radiação acima do necessário para acarretar 5% de sobrevivência (2 minutos), inclusive este período, visando verificar se ocorria algum tipo de alteração ao nível cromossômico.

Procedeu-se do mesmo modo com relação às 12 placas contendo microcolônias da linhagem *ppy*, também obtidas de acordo com o item 4.6.

Seis placas de Petri contendo MC, relativas à cada placa irradiada e à cada placa controle, receberam, cada uma, uma microcolônia monoconidial, transferida por meio de uma alça de níquel-cromo. As 144 placas, assim preparadas, foram incubadas por oito dias e, após, procedeu-se à contagem dos setores.

4.8. Purificação dos setores

Conídios de cada setor foram retirados e inoculados no centro de placas de Petri contendo MC e estas placas incubadas por oito dias, originando os respectivos va-

riantes morfológicos. Não houve necessidade de purificação dos setores através de estrias, por estarem estes setores em sua totalidade bem configurados.

4.9. Grupos e tipos de variantes morfológicos

Os variantes morfológicos, oriundos dos setores, foram comparados entre si conforme a modalidade de radiação utilizada, para serem agrupados de acordo com a morfologia e coloração da colônia. Um representante de cada grupo foi escolhido ao acaso e designado genericamente por tipo.

4.10. Obtenção de colônia monoconidial em origem, referente a cada tipo de variante morfológico

Conídios de cada tipo de variante morfológico foram retirados com alça de níquel-cromo, por duas vezes e colocados em solução de "tween 80". Após forte agitação, 1 ml de cada solução, contendo conídios, foi transferido para um frasco contendo 9 ml de solução salina. Desta, foi retirado 1 ml e colocado em outro frasco contendo 9 ml de solução salina.

Desta última solução, 0,1 ml correspondente a

cada tipo de variante morfológico foi colocado em placa de Petri contendo MC e os conídios semeados. Após 24 horas de incubação, surgiram as microcolônias monoconidiais. Com uma alça de níquel-cromo microcolônias foram transferidas para novas placas contendo MC, uma microcolônia por placa e cada uma destas placas, referente a um tipo de variante morfológico. Após oito dias de incubação estavam as colônias perfeitamente desenvolvidas, cada uma monoconidial em origem, a partir das quais todos os experimentos que se seguem foram efetuados.

4.11. Teste de Auxotrofia

Com o intuito de ser constatado se houve alteração no genoma dos variantes morfológicos com referência às deficiências nutricionais, pois a linhagem original *CHL-13* era *pro paba*, foram preparadas placas de acordo com o especificado a seguir:

12 placas com MM

12 placas com MM + *paba*

12 placas com MM + *pro*

12 placas com MM + *pro* + *paba*.

Uma placa correspondente a cada meio de cultuu

ra foi dividida por um diâmetro virtual. Em uma das partes foram inoculadas conídios da linhagem *CHL-13* e na outra, conídios da linhagem *ppy*.

As outras 11 placas correspondentes a cada meio de cultura foram divididas, cada uma, em quadrantes e em cada quadrante inoculados conídios correspondentes a um tipo de variante morfológico. As placas foram incubadas por 96 horas.

4.12. Comportamento dos tipos de variantes morfológicos em presença ou ausência de cloroneb

Para verificação do comportamento dos tipos de variantes morfológicos foram utilizadas placas:

- a) Contendo MC.
- b) Contendo MC + cloroneb (52 µg/ml), concentração esta suficiente para indicar se a colônia se comportava como parcialmente dependente do fungicida ou como resistente e não dependente ou como sensível.
- c) Contendo MC + cloroneb (442 µg/ml), concentração esta suficiente para minimizar as colônias correspondentes a cada variante

morfológico sem que a colônia ficasse muito pequena, o que acarretaria dificuldade na mensuração do diâmetro da mesma.

Em cada placa de cada conjunto de placas, cada qual contendo uma das concentrações de cloroneb, vistas acima, foi feito um inóculo correspondente a linhagem MSE ou *ppy* ou a cada um dos tipos de variantes morfológicos obtidos a partir de microcolônias da linhagem *CHL-13* submetidas previamente à ação de raios gama ou de luz ultra-violeta. Após 96 horas de incubação e três repetições, os diâmetros das novas colônias foram determinados.

4.13. Seleção de variantes morfológicos

Os dados obtidos de acordo com o comportamento dos variantes morfológicos em presença ou ausência de cloroneb, segundo o item 4.12., permitiram que fossem feitos:

4.13.1. Análise de variância

Por esta análise estimaram-se as seguintes fontes de variação:

- a) Entre as linhagens;

- b) Entre dosagens;
- c) Entre linhagens e dosagens.

Permitiram, ainda, o desdobramento dos graus de liberdade da fonte de variação linhagem, dentro da dosagem, como segue:

- a. Entre linhagens dentro de MC
- b. Entre linhagens dentro da concentração de cloroneb (52 $\mu\text{g/ml}$ de MC).
- c. Entre linhagens dentro da concentração de cloroneb (442 $\mu\text{g/ml}$ de MC).

4.13.2. Teste de Dunnett (STEEL e TORRIE, 1960)

Através deste teste foi feita uma comparação entre os dados obtidos para cada variante morfológico, segundo o item 4.12., com os dados referentes a cada linhagem controle (*ppy* ou *CHL-13*), também obtidos segundo o item 4.12.

4.13.3. Critérios para seleção dos variantes morfológicos sensíveis e resistentes ao cloroneb que foram submetidos à análise genética

Dos variantes morfológicos, que apresentaram comportamento diferente das linhagens controles, foram selecionados aqueles que mostraram as seguintes características:

a. Sensíveis

Um variante morfológico sensível ao cloroneb, com comportamento diferente da linhagem *ppy*, e um com o mesmo comportamento daquela linhagem.

b. Resistentes

Para os resistentes, que apresentaram comportamento diferente da linhagem *CHL-13*, a seleção foi feita de acordo com os critérios especificados a seguir:

a. Quanto ao comportamento em MC

a_1 . Crescimento razoável

Diâmetro da colônia de 25 a 40 mm, inclusive.

a_2 . Diâmetro da colônia de 40 mm, exclusive, a 55 mm inclusive.

a₃. Crescimento ótimo

Diâmetro da colônia acima de 55 mm.

b. Quanto ao comportamento em MC contendo cloroneb (52 µg/ml).

b₁. Resistente e não dependente

b₂. Resistente e parcialmente dependente.

c. Levando-se em consideração o comportamento de cada variante morfológico em MC e em MC + cloroneb (52 µg/ml), teoricamente podiam ser esperados variantes morfológicos com:

c₁. Ótimo crescimento, resistente e não dependente.

c₂. Bom crescimento, resistente e não dependente.

c₃. Razoável crescimento, resistente e não dependente.

c₄. Ótimo crescimento, resistente e parcialmente dependente.

c₅. Bom crescimento, resistente e parcialmente dependente.

c₆. Razoável crescimento, resistente e parcialmente dependente.

Foi incluído neste grupo um variante morfológico com comportamento estatisticamente semelhante ao da linhagem *CHL-13*.

4.14. Análise Genética

4.14.1. Obtenção de heterocários

No presente trabalho, para formação do heterocário, foi utilizado o método preconizado por PONTECORVO et alii (1953).

Foram utilizadas as linhagens MSE e *CHL-17*, com conídios brancos, sendo a primeira sensível ao cloroneb e a segunda resistente; e variantes morfológicas *pro-paba*, resistentes e sensíveis ao cloroneb com conídios não brancos.

Conídios de cada variante morfológico sensível, com conídios da linhagem *CHL-17* e de cada variante morfológico resistente com conídios da linhagem MSE, separadamente, foram colocados em tubos de ensaio contendo 2 ml de MM

líquido mais 2% de MC líquido.

No caso da linhagem MSE, os conídios foram retirados com alça de níquel-cromo por duas vezes para serem colocados no tubo de ensaio e no caso dos variantes morfológicos resistentes, a alça foi utilizada por três ou quatro vezes, por ser a produção de conídios destes variantes morfológicos em MC bem menor que a da MSE.

No caso da *CHL-17*, sendo os variantes morfológicos sensíveis, o procedimento foi o inverso, pois os variantes morfológicos sensíveis, em MC, produzem relativamente maior quantidade de conídios que a *CHL-17*.

Esses tubos, contendo, cada um, conídios de uma linhagem sensível e conídios de uma linhagem resistente ao cloroneb, foram incubados por três a quatro dias. Na superfície do meio, em cada tubo, formou-se uma película, a qual foi transferida, com o uso de uma alça de níquel-cromo, para uma placa contendo MM, sendo a película em cada caso fragmentada em quatro pedaços, e cada fragmento colocado em um dos quadrantes virtuais da placa. Estas placas, contendo as películas, foram incubadas por sete a dez dias e após este período de tempo, ocorreu a formação de setores heterocarióticos, que apresentaram hifas contendo núcleos de diferentes constituições genéticas, os quais promoveram o balanceamento dos heterocários. A partir dos heterocários balanceados assim obtidos, foi verificada a existência ou não de he-

rança extranuclear (teste do heterocário); a localização do *locus* para resistência ou sensibilidade ao cloroneb no seu grupo de ligação (ciclo parassexual); a distância deste *locus* ao *locus* do gene marcador (análise meiótica) e se os genes em análise eram alelos (teste de alelismo).

4.14.2. Teste de heterocário (JINKS, 1963)

A partir dos heterocários balanceados obtidos de acordo com o item 4.14.1., surgidos pela plasmogamia entre hifas dos variantes morfológicos resistentes e as da linhagem MSE e entre as hifas dos variantes morfológicos sensíveis e as das linhagem *CHL-17*, foi verificado se a herança da resistência ou sensibilidade ao cloroneb era de origem nuclear ou extranuclear. Com tal finalidade, conídios de setores confirmadamente heterocarióticos, de cada tipo de heterocário, foram retirados com uma alça de níquel-cromo e colocados em um tubo de ensaio contendo 2 ml de solução de "tween 80". Foi empregado em seguida o processo das diluições sucessivas (item 4.6.), até a obtenção de uma concentração final de 500 a 1000 conídios por mililitro da última solução salina.

Foram preparados seis tipos de placas, como segue:

- a) Placas contendo MC
- b) Placas contendo MC + cloroneb (52 $\mu\text{g/ml}$).
- c) Placas contendo MM + *pro* + *paba*
- d) Placas contendo MM + *ade* + *nic* + *pyro* +
ribo + *s*
- e) Placas contendo MM + *pro* + *paba* + cloroneb (52 $\mu\text{g/ml}$)
- f) Placas contendo MM + *ade* + *nic* + *pyro* +
ribo + *s* + cloroneb (52 $\mu\text{g/ml}$).

Foram feitos oito conjuntos destas placas, um conjunto por tipo de heterocário. Em cada placa de cada conjunto destas placas, foi colocado 0,1 ml de suspensão de conídios do respectivo heterocário e feita a semeadura. Após 72 horas de incubação, foram realizadas as leituras das placas, com especial referência às pertencentes às letras *b*, *e* e *f*.

4.14.3. Ciclo parassexual

O primeiro passo no ciclo parassexual, a partir do heterocário balanceado, consistiu na obtenção de conídios diplóides, cujo método usado foi análogo ao descri-

to por ROPER (1952), como segue:

Dos heterocários balanceados formados entre cada variante morfológico resistente ao cloroneb e à linhagem MSE e entre cada variante morfológico sensível e à linhagem *CHL-17*, foram retirados conídios, com uma alça de níquel-cromo, e colocados em tubos de ensaio, cada tubo contendo 2 ml de solução de "tween 80", até que a solução ficou turva, indicando a ocorrência de aproximadamente 10^6 a 10^8 conídios por ml da solução. Estas suspensões foram submetidas à forte agitação, para que os conídios ficassem individualizados.

De cada suspensão 0,1 ml foi transferido para placas de Petri contendo MM e os conídios foram semeados. Nestas placas contendo MM, germinaram os conídios dos prováveis diplóides. Como poderiam existir resquícios de heterocários, que também crescem em MM, após 96 horas de incubação, com alça de níquel-cromo, por uma vez, foram retirados conídios dos diferentes possíveis diplóides e estes colocados em tubos de ensaio contendo 2 ml de "tween 80", um tubo para cada tipo de possível diplóide. Destas novas suspensões, após forte agitação, 0,1 ml de cada suspensão foi colocado em nova placa contendo MM e os conídios semeados. Após 24-30 horas de incubação, foram obtidos conídios em início de germinação.

De cada placa foram retirados quatro destes

conídios e cada um foi colocado em um dos quadrantes virtuais de uma nova placa de Petri contendo MM. Foram assim obtidos, após 96 horas de incubação, colônias monoconidiais, possivelmente diplóides em origem.

Para tal comprovação, com uma alça de níquel-cromo, conídios das diferentes linhagens haplóides e dos possíveis diplóides, foram colocados em lâminas, uma por linhagem haplóide ou possível diplóide, sendo que, em cada lâmina foi colocada uma gota de solução de lisol sobre os conídios e sobre cada gota uma lamínula. Houve uma espera de dez a 15 minutos, para que ocorresse a formação de cadeias de conídios. Foram medidas cadeias de cinco conídios, com cinco repetições e determinado o diâmetro médio de um conídio (DMC) para cada linhagem haplóide ou possível diplóide.

Para as medições pretendidas, foram utilizados:

- a) Microscópio Wild (Heerburg) M - 20-34983.
- b) Ocular micrométrica Carl Zeiss 48-92628 (8x), sendo que o intervalo entre dois traços equivaleu a 2 micra.

Os diplóides formados podem espontaneamente passar pelo processo de haploidização, processo este descrito por KÄFER (1961), constituindo o evento de uma não disjunção, que produz um núcleo $2n + 1$ e um outro $2n - 1$, podem

do o primeiro reverter ao estado diplóide (o qual pode ser homozigoto para marcas anteriormente em heterozigose), enquanto o $2n - 1$ pode perder mais cromossomos, até atingir um estágio haplóide estável.

Na presente pesquisa foram utilizados como agentes haploidizantes dois fungicidas: o benlate, que não aumenta o número de recombinantes mitóticos (KAPPAS, 1978) e o cloroneb, nas concentrações de 0,6 $\mu\text{g/ml}$ de MC e 12 $\mu\text{g/ml}$ de MC respectivamente.

Foram preparadas cinco placas com MC para cada tipo de fungicida nas concentrações especificadas acima e para cada tipo de diplóide. Cada placa foi virtualmente dividida em quadrantes e em cada quadrante foram inoculados conídios de um mesmo tipo de diplóide. Após cinco dias de incubação, conídios dos setores emergentes dos diplóides foram retirados com o fio de níquel-cromo e estrias foram feitas em novas placas com MC, estas também virtualmente divididas em quadrantes e em cada quadrante estrias correspondentes a um setor. Após 72 horas de incubação, conídios, de cada estria, foram retirados e inoculados em novas placas, também, divididas virtualmente em quadrantes, com a finalidade de complementar a purificação dos setores.

Foram levados em consideração tão somente os setores brancos em detrimento dos coloridos.

Após 12 horas de incubação, conídios de ca-

da setor foram inoculados em placas destinadas a possibilitarem a localização do *locus* para resistência ou sensibilidade ao cloroneb no seu respectivo grupo de ligação.

Foram estes os tipos de placas preparados:

- 1) Placas contendo MC, nas quais foram inoculados conídios, em 24 pontos, cada placa correspondente a um dos diplóides e cada inóculo a um setor.

Foram feitos mais dois inóculos de conídios por placa, correspondentes às linhagens que originaram o respectivo diplóide. Estas placas constituíram as placas mestras, a partir das quais, após 72 horas de incubação, colônias foram replicadas para os demais tipos de placas, assim constituídas:

- 2) Placas contendo MC + cloroneb (52 ou 130 µg/ml).
- 3) Placas contendo MM + *pro* + *paba* + *nic* + *ribo* + *pyro* + *ade* + *s* - genericamente MM + Tudo.
- 4) Placas contendo MM + Tudo - *nic*.
- 5) Placas contendo MM + Tudo - *paba*.
- 6) Placas contendo MM + Tudo - *ade*.
- 7) Placas contendo MM + Tudo - *pyro*.

- 8) Placas contendo MM + Tudo - *ribo*.
- 9) Placas contendo MM + Tudo - *s*.
- 10) Placas contendo MG + Tudo
- 11) Placas contendo MM + Tudo + cloroneb (52 ou 130 $\mu\text{g/ml}$).
- 12) Placas contendo MA + Tudo.

4.14.4. Análise meiótica

Fundamenta-se tal análise no ciclo sexual e principalmente na produção de cleistotécios híbridos, baseando-se a análise no método descrito por PONTECORVO et alii (1953).

Com esta finalidade, as películas formadas de acordo com o item 4.14.1. foram transferidas por intermédio de uma alça de níquel-cromo para placas contendo MM, cada placa correspondente a um tipo de variante morfológico. Estas películas foram fragmentadas por intermédio de um fio de níquel-cromo em quatro pedaços, cada uma, e cada um destes fragmentos colocado em um quadrante virtual da placa.

Como a anaerobiose parcial favorece a reprodução sexuada, as placas foram vedadas com fita celulósica (Durex) e após dez dias de incubação foram visualizados, com

auxílio de uma lupa, os cleistotécios, que poderiam ser híbridos ou não (AZEVEDO, 1973). Ainda com o auxílio da lupa, cinco cleistotécios de maior diâmetro, por variante morfológico, foram selecionados, pois geralmente correspondem aos híbridos (AZEVEDO, BARACHO, VENCovsky, 1970). Com um fio de níquel-cromo tais cleistotécios foram retirados das respectivas placas e colocados em novas placas contendo MM, uma por variante morfológico, com a finalidade de serem rolados com o auxílio de um fio de níquel-cromo e conseqüentemente despojados de conídios e células de Hülle que freqüentemente estão a eles aderidos. Cada cleistotécio, devidamente limpo, foi transferido com o auxílio de um fio de níquel-cromo para um tubo de ensaio contendo solução de "tween 80", tendo sido colocado na parede do tubo, em local no qual pudesse ser visto para que fosse feito o esmagamento deste cleistotécio, com o auxílio de uma pipeta de 1 ml, pipeta esta, que foi usada para lavar as paredes do tubo de ensaio com a solução de "tween 80", para que todos os ascósporos do cleistotécio ficassem em suspensão. De cada uma destas suspensões de ascósporos foi retirado 1 ml e este transferido para um frasco contendo 9 ml de solução salina. Destas soluções salinas contendo os ascósporos, foi retirado 0,1 ml de cada solução e transferido para uma placa contendo MC e os ascósporos foram semeados. Após 72 horas de incubação, já se podia constatar, pela coloração e diâmetro das colônias, se os cleistotécios

eram ou não híbridos e se a concentração de ascósporos estava o suficiente diluída, para que as hifas das colônias não se imbricassem, pois no caso da constatação deste último fato, com referência aos cleistotécios híbridos, novas diluições foram feitas, até que foram obtidas em média de 30 a 100 colônias por placa. Uma suspensão de conídios por variante morfológico, com as características acima, foi separada para uso imediato, tendo sido as demais colocadas em geladeira, a 4°C. Foram preparadas cinco placas contendo MC correspondentes e cada variante morfológico, e em cada placa colocado 0,1 ml da respectiva suspensão de ascósporos e os ascósporos foram semeados. Após 72 horas de incubação, foram preparadas cinco placas mestras por variante morfológico, com inóculos de conídios na disposição 1 + 5 x 5.

Destes 26 inóculos, dois foram feitos com conídios correspondentes aos tipos paternos, isto é, conídios da linhagem MSE ou da *CHL-17* e conídios do variante morfológico utilizado no respectivo cruzamento.

As 26 colônias de cada uma das cinco placas, referentes a cada variante morfológico, foram replicadas para placas contendo:

a) MC + cloroneb (52 ou 130 µg/ml).

b) MM + *pro* + *paba* + *ade* + *nic* + *pyro* + *ribo*
+ s.

c) MG + *pro* + *paba* + *ade* + *nic* + *pyro* + *ribo*
+ s.

As leituras foram feitas após 72 horas de incubação.

Através da fórmula $c = \frac{r}{n} \cdot 100$, na qual:

c = Valor da ligação genética

r = Número total de recombinantes

n = Número total de ascósporos analisados;

foi determinado o valor da ligação entre o *locus* para a resistência ou sensibilidade ao cloroneb e o *locus gal*, para cada cleistotécio analisado.

O desvio padrão, referente a cada valor de ligação, foi determinado segundo a fórmula preconizada por ROSATO (1973), na qual:

$$S = \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

Sendo: S = Desvio Padrão, p = frequência de recombinantes e N = número total de ascósporos analisados.

4.14.5. Teste de alelismo

O teste de alelismo tem por finalidade indicar se mutações mapeadas no mesmo grupo de ligação são ou não alélicas, isto é, se existe heterogeneidade genética ou se são dois ou mais genes relacionados com um mesmo caráter e pertencentes a um mesmo *locus*.

O teste fundamenta-se na análise dos produtos pós-meióticos, provenientes de cruzamentos entre linhagens de um mesmo fenótipo, no caso resistência ao cloroneb, porém com marcas diferentes para auxotrofia.

A técnica foi a mesma utilizada para a análise meiótica descrita no item 4.14.4., consistindo a diferença no fato de que, para o teste de alelismo, foram feitos cruzamentos entre linhagens resistentes. Foram utilizados os variantes morfológicos *CLV-2.5*, *CLV-8.2*, *CLV-32.5*, *CLV-8.15*, *CLV-32.22* e *CLV-16.1*, todos resistentes, os quais foram, individualmente, cruzados com a linhagem *CHL-17*, também resistente. Foram preparadas duas placas com MC + cloroneb (52 µg/ml). Em cada uma destas duas placas foram colocados de 30 a 100 ascósporos, para cada tipo de cruzamento. Após 72 horas de incubação, as placas foram analisadas.

4.15. Respostas das linhagens haplóides e diplóides a concentrações crescentes de cloroneb

Para se obter uma completa informação sobre os diplóides obtidos de acordo com o item 4.14.3. em relação às linhagens haplóides que os originaram, assim como entre estas linhagens, foram feitas as curvas de dose-resposta de maneira análoga à descrita por VOMVOYANNI e GEORGOPOULOS (1966).

Com esta finalidade foram preparados conjuntos de placas contendo MC e as seguintes concentrações de cloroneb, uma concentração por placa: 3,26 $\mu\text{g/ml}$ - 32,50 $\mu\text{g/ml}$ - 65,00 $\mu\text{g/ml}$ - 92,50 $\mu\text{g/ml}$ - 130,00 $\mu\text{g/ml}$ - 162,50 $\mu\text{g/ml}$ - 260 $\mu\text{g/ml}$.

Cada placa de um conjunto de placas contendo MC ou MC e uma das concentrações de cloroneb foi dividida virtualmente em quadrantes. Em dois quadrantes opostos de cada placa foram inoculados conídios de um dos variantes morfológicos resistente e parcialmente dependente do cloroneb e nos outros dois, conídios do diplóide correspondente.

Em outro conjunto de placas, nas mesmas condições daquelas, foram inoculados conídios da linhagem MSE.

O exposto acima foi efetuado por duas vezes, menos no caso de linhagem MSE, o que se traduziu por

quatro repetições por linhagem haplóide ou diplóide.

As placas foram incubadas por 72 horas, com observação constante, com a finalidade de acompanhar o desenvolvimento das colônias diplóides, as quais emitiam frequentemente setores que mascaravam a mensuração dos diâmetros das mesmas. Quando tal fato ocorria, para se determinar o diâmetro da colônia diplóide, mediu-se o raio, isto é, a distância entre a borda livre (local em que não houve emissão de setores) e o centro geométrico da colônia e esta distância foi multiplicada por dois.

4.16. Comportamento de linhagens haplóides com diferentes genomas, porém, com genes para sensibilidade ao clonagem de origem comum

Conídios da linhagem CLV-8.2//MSE foram inoculados no centro de placas contendo MC e benlate (0,6 µg/ml), perfazendo um total de 15 placas nestas condições. Após 96 horas de incubação foram isolados setores e estes submetidos à purificação por meio de estrias. Conídios destes produtos de haploidização foram inoculados em duas placas contendo MC, com a disposição 1 + 5 x 5, um inóculo referente a cada setor purificado. Esta preparação foi realizada duas vezes, resultando quatro placas mestras iguais duas a duas, as

quais foram incubadas por 72 horas. Colônias de duas destas placas, uma de cada par, foram replicadas para placas contendo MC e cloroneb (52 µg/ml). Colônias das outras duas placas foram replicadas para placas preparadas do mesmo modo que as utilizadas no item 4.14.3. Após 72 horas de incubação foram feitas as leituras das placas. Dos produtos de haploidização, foram selecionados aqueles que apresentaram diferença entre eles em pelo menos duas marcas. Conídios destas linhagens foram transferidos com o fio de níquel-cromo, das placas mestras para placas contendo MC e concentrações crescentes de cloroneb e feita análise do comportamento destas linhagens conforme o descrito no item 4.15.

5. RESULTADOS

5.1. Curvas de sobrevivência relativas a conídios da linhagem *CHL-13* submetidos à ação de mutagênicos físicos

5.1.1. Com relação a raios gama

Procedendo de acordo com o item 4.7.1., foi construída a Tabela 2 e a partir dos dados nela contidos foi elaborado o gráfico, que se encontra na Figura 2.

TABELA 2 - Sobrevivência de conídios da linhagem *CHL-13* submetidos previamente à ação de raios gama.

DOSES	CONÍDIOS VIVENTES SOBRE POR PLACA	DILUI- ÇÕES	TÍTULOS (nº de conídios/ml)	%
0 K1	99* (91 ; 106)**	10^{-4}	$9,90 \times 10^6$	100
20 K1	59 (75 ; 45)	10^{-4}	$5,90 \times 10^6$	59,60
40 K1	206 (231;186)	10^{-3}	$2,06 \times 10^6$	20,86
60 K1	137 (146;122)	10^{-3}	$1,37 \times 10^6$	13,86
80 K1	54 (74 ; 42)	10^{-3}	$5,40 \times 10^5$	5,45
100 K1	44 (49 ; 38)	10^{-3}	$4,40 \times 10^5$	4,44

* Média de três placas por dose de radiação.

** Entre parênteses valores maior e menor obtidos.

Figura 2 - Curva de sobrevivência de conídios da linhagem *CHL-13*, submetidos previamente à ação de raios gamma.

5.1.2. Com relação à luz ultra-violeta

De acordo com o método descrito no item 4.7.1. foi estruturada a Tabela 3 e os dados nela contidos utilizados para a feitura do gráfico, que pode ser visto na Figura 3.

TABELA 3 - Sobrevivência de conídios da linhagem *CHL-13* submetidos previamente à ação de luz ultra-violeta.

TEMPO DE EXPOSIÇÃO	CONÍDIOS VIVENTES SOBRE PLACA	SOBRE POR	DILUIÇÕES	TÍTULOS (nº de conídios/ml)	%
0	95 [*] (120; 77) ^{**}		10^{-4}	$9,50 \times 10^6$	100,00
1 minuto	112 (130; 96)		10^{-3}	$1,12 \times 10^6$	10,00
2 minutos	48 (50; 42)		10^{-3}	$4,80 \times 10^5$	5,00
3 minutos	196 (220;178)		10^{-2}	$1,96 \times 10^5$	2,00
4 minutos	31 (36; 26)		10^{-2}	$3,10 \times 10^4$	0,32
5 minutos	200 (210;190)		10^{-1}	$2,00 \times 10^4$	0,20

* Média de três placas por dose de radiação.

** Entre parênteses valores maior e menor obtidos.

Figura 3 - Curva de sobrevivência de conídios da linhagem *CHL-13* submetidos previamente à ação de luz ultra-violeta.

5.2. Frequência relativa de setores por placa, provenientes de conídios não irradiados ou irradiados por dose equivalente a 5% de sobrevivência em relação a raios gama ou à luz ultra-violeta

Com o uso do método descrito no item 4.7.2., foram obtidas 150 colônias com ou sem setores, dos quais 50 provenientes de conídios submetidos à dose de radiação correspondente a 5% de sobrevivência para raios gama (90 Kr) e 50, a 5% de sobrevivência para luz ultra-violeta (tempo de exposição: 2 minutos); as outras 50, relativas a conídios não irradiados (placas controles).

Os dados relativos àquelas placas, com a respectiva frequência de setores por placa, inerentes a cada modalidade de radiação e as controles, encontram-se na Tabela 4.

TABELA 4 - Frequência relativa de setores por placa provenientes de conídios irradiados ou não (controles).

TIPOS DE CONÍDIOS	NÚMERO DE PLACAS	NÚMERO DE SETORES	FREQUÊNCIA RELATIVA DE SETORES POR PLACA
Não irradiados (controles)	50	27	0,54
Irradiados por raios gama (90 Kr)	50	65	1,30
Irradiados por luz ultra-violeta (2 minutos)	50	58	1,16

5.3. Setores emergentes por ação de raios gama e luz ultra-violeta sobre microcolônias das linhagens *ppy* e *CHL-13*

Microcolônias das linhagens *ppy* e *CHL-13* obtidas de acordo com o item 4.6. foram submetidas à ação de raios gama e luz ultra-violeta, como já descrito no item 4.7.3. Após três repetições constatou-se que a linhagem *ppy* não produziu setores. Por outro lado, a linhagem *CHL-13* produziu setores tanto a partir de colônias irradiadas como das

não irradiadas. O número de setores para cada dose, emergentes das colônias *CHL-13*, por ação de raios gama, encontram-se na Tabela 5 e o número de setores, para cada período de tempo de exposição à luz ultra-violeta, encontra-se na Tabela 6. A Figura 4 apresenta uma colônia da linhagem *CHL-13* produzindo setor.

TABELA 5 - Número de setores emergentes da linhagem *CHL-13* de acordo com a dose de radiação por raios gama.

Dose de Radiação	Número de colônias analisadas	Número de setores	Número de setores/colônia
0 (controle)	18	10	0,55
2 Kr	18	19	1,06
4 Kr	18	14	0,77
8 Kr	18	11	0,61
16 Kr	18	13	0,72
32 Kr	18	21	1,17
Totais	108	88	

TABELA 6 - Número de setores emergentes da linhagem *CHL-13* de acordo com o tempo de exposição à luz ultra-violeta.

Tempo de exposição em minutos	Número de colônias analisadas	Número de setores	Número de setores/colônia
0 (controle)	18	11	0,61
2	18	27	1,5
4	18	21	1,17
8	18	25	1,39
16	18	23	1,28
32	18	27	1,50
Totais	108	134	

Figura 4 - Setor emergente de colônia da linhagem *CHL-13*, submetida à ação de raios gama. Dose - 2 Kr.

5.4. Grupos de variantes morfológicas e tipos representativos

Os variantes morfológicos, correspondentes aos respectivos setores purificados de conformidade com o item 4.9., foram separados de acordo com a modalidade de radiação utilizada sobre as microcolônias que os originaram e depois agrupados. Cada grupo ficou constituído de variantes morfológicos que apresentavam semelhança na morfologia e co-

loração. Foram formados 15 grupos em relação a raios gama e 29 grupos, à luz ultra-violeta. De cada grupo foi escolhido ao acaso um representante (Ver item 4.10.), que recebeu a designação genérica de tipo. Os diferentes grupos formados e os tipos respectivos podem ser encontrados nas Tabelas 7 e 8.

TABELA 7 - Grupos de variantes morfológicos e tipo representativo de cada grupo, obtidos por ação de raios gama.

Tipos e coloração das colônias	Grupos de variantes morfológicos				Totais
CLG 16.6 Coloração igual a da linhagem <i>ppy</i>	CLG-2.1, CLG-2.7, CLG-2.11, CLG-2.18, CLG-4.9, CLG-8.3, CLG-8.7, CLG-16.2, CLG-16.7, CLG-32.2, CLG-32.8, CLG-32.16, CLG-32.21.	CLG-2.2, CLG-2.8, CLG-2.14, CLG-4.4, CLG-4.10, CLG-8.4, CLG-8.8, CLG-16.3, CLG-16.8, CLG-32.4, CLG-32.10, CLG-32.17,	CLG-2.3, CLG-2.9, CLG-2.15, CLG-4.5, CLG-4.12, CLG-8.5, CLG-8.9, CLG-16.4, CLG-16.13, CLG-32.6, CLG-32.11, CLG-32.19,	CLG-2.6, CLG-2.10, CLG-2.16, CLG-4.7, CLG-8.2, CLG-8.6, CLG-8.11, CLG-16.6, CLG-32.1, CLG-32.7, CLG-32.13, CLG-32.20 e	49
CLG 4.2 Amarela ouro-velho	CLG-4.2,	CLG-16.5,	CLG-16.10 e	CLG-32.3	4
CLG 2.19 Amarela com nuance marrom	CLG-2.17,	CLG-2.19,	CLG-4.11 e	CLG-4.13	4
CLG 32.5 Amarela com nuance branca	CLG-2.12, CLG-32.5 e	CLG-4.6, CLG-32.12	CLG-4.14,	CLG-16.9	6
CLG 32.18 Amarela viva	CLG-32.18				1
CLG 8.10 Centro: lilás Periferia: amarela	CLG-8.10				1
CLG 4.8 Centro: lilás com nuance marrom Periferia: lilás com nuance amarela	CLG-4.8				1

(continua)

Tabela 7 (continuação)

Tipos e colo ração das cō lônias	Grupos de variantes morfológicos	Totais
<i>CLG 16.1</i> <i>CLG-16.1</i> Centro: marrom com nu <u>an</u> ça am <u>a</u> rela Periferia: mar rom clara		1
<i>CLG 16.11</i> <i>CLG-16.11 e CLG-16.12</i> Centro: amare <u>l</u> la-ouro Periferia: be ge com nu <u>an</u> ça amarela		2
<i>CLG 32.18</i> <i>CLG-32.18</i> Lilás com nu <u>an</u> ça branca		1
<i>CLG 32.15</i> <i>CLG-32.15</i> Centro: amare <u>l</u> la-ouro Periferia: ro- sada		1
<i>CLG 32.15</i> <i>CLG-32.15</i> Lilás		2
<i>CLG 8.1</i> <i>CLG-2.11 e CLG-8.1</i> Lilás clara		2
<i>CLG 2.5</i> <i>CLG-2.5 e CLG-4.3</i> Roxa		2
<i>CLG 32.4</i> <i>CLG-32.14</i> Lilás com nu <u>an</u> ça amarela		1
<i>CLG 32.9</i> <i>CLG-32.9</i> Amarela com nu <u>an</u> ça lilás		1
TOTAL GERAL		78

TABELA 8 - Grupos de variantes morfológicos e tipo representativo de cada grupo, obtidos por ação de luz ultravioleta.

Tipos e coloração das colônias	Grupos de variantes morfológicos					Totais
<i>CLV-8.2</i> Amarela-ouro com nuance branca	<i>CLV-2.1,</i> <i>CLV-4.5,</i>	<i>CLV-2.6,</i> <i>CLV-4.10,</i>	<i>CLV-4.2,</i> <i>CLV-8.1 e</i>	<i>CLV-4.4,</i> <i>CLV-8.2</i>		8
<i>CLV-4.7</i> Centro: lilás Periferia: amarela ouro-velho	<i>CLV-2.2,</i> <i>CLV-32.6 e</i>	<i>CLV-2.4,</i> <i>CLV-32.8</i>	<i>CLV-4.6,</i>	<i>CLV-4.7,</i>		6
<i>CLV-2.5</i> Amarela-ovo	<i>CLV-2.5,</i>	<i>CLV-4.3,</i>	<i>CLV-4.9 e</i>	<i>CLV-32.3</i>		4
<i>CLV-2.3</i> Amarela-ouro	<i>CLV-2.3,</i> <i>CLV-8.10 e</i>	<i>CLV-4.2,</i> <i>CLV-16.1</i>	<i>CLV-8.3,</i>	<i>CLV-8.4,</i>		6
<i>CLV-4.1</i> Marrom	<i>CLV-4.1 e</i>	<i>CLV-8.6</i>				2
<i>CLV-4.8</i> Bege	<i>CLV-4.8</i>					1
<i>CLV-32.7</i> Amarela escura	<i>CLV-32.7</i>					1
<i>CLV-8.5</i> Marrom clara com nuance amarela	<i>CLV-8.5,</i>	<i>CLV-8.7 e</i>	<i>CLV-8.9</i>			3
<i>CLV-16.6</i> Amarela com nuance roxa	<i>CLV-16.3,</i>	<i>CLV-16.6,</i>	<i>CLV-16.7 e</i>	<i>CLV-32.1</i>		4
<i>CLV-2.17</i> Bege com nuance amarela	<i>CLV-2.17,</i>	<i>CLV-16.8 e</i>	<i>CLV-16.18</i>			3

(continua)

Tabela 8 - (continuação)

Tipos e colo ração das co lônias	Grupos de variantes morfológicos	Totais
<i>CLV-4.14</i> Centro: Bege Círculo: ama rela ouro Periferia: be ge com nuança amarela	<i>CLV-2.11, CLV-2.14 e CLV-2.5</i>	3
<i>CLV-2.20</i> Centro:marrom Periferia: a- marela-ouro	<i>CLV-2.20, CLV-8.16, CLV-8.18, CLV-8.22 e CLV-32.16</i>	5
<i>CLV-8.24</i> Bege escura com nuança amarela	<i>CLV-4.16, CLV-4.20 e CLV-8.24</i>	3
<i>CLV-4.18</i> Centro:lilás clara Periferia: be ge com nuança amarela	<i>CLV-4.18</i>	1
<i>CLV-8.15</i> Centro: ama- rela ouro Periferia:li- lãs com nuan- ça amarela	<i>CLV-8.15 e CLV-8.25</i>	2
<i>CLV-16.15</i> Centro:lilás escura Círculo: ama rela com nuã ça lilás Círculo: lilás Periferia: li- lãs clara	<i>CLV-16.15</i>	1

(continua)

Tabela 8 - (continuação)

Tipos e coloração das colônias	Grupos de variantes morfológicas					Totais
<i>CLV-16.5</i> Bege com nuan <u>ça</u> amarela	<i>CLV-16.5</i>					1
<i>CLV-16.6</i> Lilás clara com nuan <u>ça</u> amarela	<i>CLV-8.8,</i>	<i>CLV-16.1 e</i>	<i>CLV-16.4</i>			3
<i>CLV-32.5</i> Amarela com nuan <u>ça</u> bege	<i>CLV-32.5</i>					1
<i>CLV-32.2</i> Lilás com nuan <u>ça</u> amarela	<i>CLV-32.2</i>					1
<i>CLV-32.4</i> Centro: amarela Periferia: Lilás com nuan <u>ça</u> roxa	<i>CLV-32.4</i>					1
<i>CLV-16.21</i> Bege com nuan <u>ça</u> lilás	<i>CLV-2.10,</i> <i>CLV-4.21,</i> <i>CLV-16.21 e</i>	<i>CLV-2.22,</i> <i>CLV-8.12,</i> <i>CLV-32.19</i>	<i>CLV-2.24,</i> <i>CLV-16.9,</i>	<i>CLV-4.19</i> <i>CLV-16.13,</i>		10
<i>CLV-2.12</i> Bege com nuan <u>ça</u> branca	<i>CLV-2.9,</i> <i>CLV-2.18,</i> <i>CLV-4.15,</i> <i>CLV-8.19,</i> <i>CLV-16.16,</i> <i>CLV-32.15,</i>	<i>CLV-2.12,</i> <i>CLV-2.21,</i> <i>CLV-4.17,</i> <i>CLV-8.20,</i> <i>CLV-16.17,</i> <i>CLV-32.25 e</i>	<i>CLV-2.13,</i> <i>CLV-4.11,</i> <i>CLV-8.11,</i> <i>CLV-8.21,</i> <i>CLV-16.22,</i> <i>CLV-32.25</i>	<i>CLV-2.17,</i> <i>CLV-4.12,</i> <i>CLV-8.14,</i> <i>CLV-8.23,</i> <i>CLV-32.12,</i>		23
<i>CLV-32.18</i> Lilás com nuan <u>ça</u> branca	<i>CLV-2.23,</i>	<i>CLV-16.14 e</i>	<i>CLV-32.18</i>			3

(continua)

Tabela 8 - (continuação)

Tipos e colo ração das cõ lônias	Grupos de variantes morfológicos				Totais
<i>CLV-8.13</i> Amarela	<i>CLV-2.8,</i> <i>CLV-2.26,</i> <i>CLV-8.17,</i> <i>CLV-16.23 e</i>	<i>CLV-2.16,</i> <i>CLV-2.27,</i> <i>CLV-16.10,</i> <i>CLV-32.9</i>	<i>CLV-2.24,</i> <i>CLV-4.13,</i> <i>CLV-16.12,</i>	<i>CLV-2.25,</i> <i>CLV-8.13,</i> <i>CLV-16.20,</i>	14
<i>CLV-32.20</i> Centro: bege Círculo: be- ge claro Periferia: be ge com nuança amarela	<i>CLV-32.20</i>				1
<i>CLV-16.11</i> Lilás	<i>CLV-16.11,</i> <i>CLV-32.21 e</i>	<i>CLV-16.19,</i> <i>CLV-32.23</i>	<i>CLV-32.13,</i>	<i>CLV-32.21,</i>	5
<i>CLV-32.22</i> Centro: mar- rom Círculo: ver melho-terra Periferia:mar rom	<i>CLV-32.11,</i> <i>CLV-32.24 e</i>	<i>CLV-32.17,</i> <i>CLV-32.27</i>	<i>CLV-32.19,</i>	<i>CLV-32.22,</i>	6
TOTAL GERAL					123

5.5. Auxotrofia nos variantes morfológicos

Procedendo de acordo com o item 4.12., somente foi constatado crescimento para todos os tipos e inclusive para as linhagens *chl₁₃* e *ppy*, nas placas contendo prolina e ácido *p*-aminobenzóico. Isso significa que não houve mutação para caracteres de deficiência nutricional nos setores analisados.

5.6. Crescimento de diferentes linhagens em diferentes concentrações de cloroneb

Seguindo o método descrito no item 4.12. foram determinados os diâmetros das colônias referentes a 15 tipos de variantes morfológicas originados da linhagem *CHL-13* por ação de raios gama (Tabela 7), da linhagem *ppy* e da linhagem *CHL-13*. Os dados inerentes a três repetições podem ser vistos na Tabela 9.

Com relação à luz ultra-violeta, como foram obtidos 29 tipos de variantes morfológicas (Tabela 8), estes tipos de variantes morfológicas passaram a constituir dois conjuntos, para facilitar o manuseio das placas e para fins de análise estatística.

O tratamento a elas conferido foi o mesmo

usado para os tipos de variantes morfológicos provenientes da ação de raios gama, incluindo em cada conjunto as linhagens *CHL-13* e *ppy*. Os resultados podem ser vistos nas Tabelas 10 e 11.

TABELA 9 - Diâmetros das colônias correspondentes aos tipos de variantes morfológicos obtidos por ação de raios gama sobre a linhagem *CHL-13*, as linhagens *ppy* e *CHL-13* em diferentes concentrações de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas. Três repetições por linhagem e por concentração de cloroneb.

Linhagens	Diâmetros das colônias em milímetros		
	MC	MC + cloroneb (52 µg/ml)	MC + cloroneb (442 µg/ml)
<i>ppy</i>	60 - 59 - 61	14 - 12 - 16	04 - 06 - 05
<i>CHL-13</i>	37 - 39 - 38	58 - 58 - 54	25 - 24 - 25
<i>CLG 16.6</i>	52 - 51 - 51	16 - 15 - 13	07 - 06 - 07
<i>CLG 4.2</i>	38 - 37 - 39	60 - 59 - 59	22 - 23 - 24
<i>CLG 2.19</i>	40 - 42 - 42	56 - 55 - 56	25 - 24 - 23
<i>CLG 32.5</i>	39 - 40 - 41	54 - 53 - 54	27 - 26 - 23
<i>CLG 32.18</i>	45 - 44 - 48	46 - 41 - 43	14 - 15 - 13
<i>CLG 8.10</i>	35 - 38 - 33	56 - 56 - 53	25 - 25 - 23
<i>CLG 4.8</i>	60 - 61 - 60	60 - 59 - 59	23 - 26 - 18
<i>CLG 16.1.</i>	62 - 58 - 59	58 - 59 - 61	14 - 15 - 17
<i>CLG 16.11</i>	40 - 39 - 42	61 - 62 - 59	25 - 26 - 23
<i>CLG 32.15</i>	44 - 44 - 43	42 - 43 - 45	21 - 22 - 20
<i>CLG 8.1</i>	45 - 43 - 46	24 - 23 - 24	08 - 10 - 07
<i>CLG 2.13</i>	58 - 59 - 58	61 - 62 - 61	23 - 25 - 26
<i>CLG 2.5.</i>	60 - 60 - 60	15 - 14 - 17	11 - 12 - 09
<i>CLG 32.14</i>	41 - 40 - 40	57 - 59 - 56	10 - 10 - 11
<i>CLG 32.8</i>	40 - 42 - 38	58 - 59 - 58	21 - 20 - 20

TABELA 10 - Diâmetros das colônias correspondentes a 14 tipos de variantes morfológicas obtidos por ação de luz ultra-violeta sobre a linhagem *CHL-13*, as linhagens *ppy* e *CHL-13* em diferentes concentrações de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas. Três repetições por linhagem e por concentração de cloroneb.

Linhagens	Diâmetros das colônias em milímetros		
	MC	MC + cloroneb (52 µg/ml)	MC + cloroneb (442 µg/ml)
<i>ppy</i>	69 - 59 - 61	15 - 13 - 15	05 - 05 - 05
<i>CHL-13</i>	37 - 37 - 39	55 - 56 - 57	25 - 26 - 24
<i>CLV 8.2</i>	38 - 37 - 39	57 - 59 - 56	25 - 25 - 25
<i>CLV 4.7</i>	36 - 35 - 35	54 - 55 - 54	25 - 25 - 24
<i>CLV 2.5</i>	46 - 39 - 40	40 - 41 - 41	20 - 19 - 20
<i>CLV 2.3</i>	40 - 38 - 49	55 - 55 - 55	20 - 20 - 18
<i>CLV 4.1</i>	52 - 51 - 51	25 - 26 - 25	20 - 19 - 19
<i>CLV 4.8</i>	40 - 41 - 41	51 - 52 - 51	17 - 19 - 18
<i>CLV 32.7</i>	36 - 35 - 35	54 - 55 - 55	25 - 25 - 24
<i>CLV 8.5</i>	50 - 50 - 50	58 - 59 - 59	15 - 14 - 17
<i>CLV 16.6</i>	30 - 32 - 31	55 - 55 - 56	26 - 25 - 25
<i>CLV 16.5</i>	32 - 31 - 34	52 - 51 - 53	26 - 25 - 26
<i>CLV 16.4</i>	36 - 37 - 37	58 - 62 - 59	25 - 26 - 25
<i>CLV 32.5</i>	30 - 30 - 30	60 - 59 - 60	20 - 21 - 20
<i>CLV 32.4</i>	30 - 32 - 30	58 - 59 - 59	15 - 14 - 16
<i>CLV 32.2</i>	39 - 38 - 39	45 - 46 - 45	11 - 12 - 14

TABELA 11 - Diâmetros das colônias correspondentes a 15 tipos de variantes morfológicas obtidos por ação de luz ultra-violeta sobre a linhagem *CHL-13*, as linhagens *ppy* e *CHL-13* em diferentes concentrações de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas. Três repetições por linhagem e por concentração de cloroneb.

Linhagens	Diâmetros das colônias em milímetros		
	MC	MC + cloroneb (52 µg/ml)	MC + cloroneb (442 µg/ml)
<i>ppy</i>	58 - 57 - 59	16 - 14 - 15	05 - 04 - 05
<i>CHL-13</i>	38 - 36 - 36	57 - 55 - 54	24 - 23 - 26
<i>CLV 16.21</i>	32 - 33 - 33	60 - 59 - 59	17 - 16 - 16
<i>CLV 2.12</i>	35 - 34 - 35	36 - 35 - 35	05 - 06 - 07
<i>CLV 32.18</i>	35 - 36 - 34	50 - 51 - 50	08 - 07 - 08
<i>CLV 8.13</i>	35 - 35 - 35	55 - 56 - 55	11 - 10 - 10
<i>CLV 2.17</i>	32 - 30 - 35	50 - 50 - 50	15 - 14 - 17
<i>CLV 4.14</i>	40 - 50 - 48	60 - 61 - 60	15 - 14 - 17
<i>CLV 2.24</i>	35 - 37 - 34	50 - 50 - 51	20 - 19 - 21
<i>CLV 2.20</i>	50 - 50 - 50	40 - 39 - 40	13 - 14 - 13
<i>CLV 8.24</i>	32 - 30 - 29	50 - 50 - 51	20 - 19 - 20
<i>CLV 4.18</i>	30 - 32 - 32	58 - 57 - 57	18 - 17 - 19
<i>CLV 8.15</i>	50 - 50 - 51	60 - 61 - 60	15 - 16 - 15
<i>CLV 16.15</i>	60 - 59 - 57	07 - 07 - 08	01 - 02 - 01
<i>CLV 32.20</i>	28 - 30 - 35	55 - 56 - 55	22 - 23 - 20
<i>CLV 16.11</i>	40 - 39 - 40	47 - 48 - 47	05 - 06 - 05
<i>CLV 32.22</i>	40 - 39 - 42	32 - 31 - 32	07 - 08 - 08

Todos estes variantes morfológicos apresentaram setores de les emergentes.

5.7. Seleção de variantes morfológicos para análise genética

5.7.1. Resultados das análises de variância

As análises foram efetuadas sobre os dados constantes das Tabelas 9, 10 e 11, separadamente, de acordo com o item 4.13.1. Os resultados referentes à Tabela 9, encontram-se nas Tabelas 12 e 13, os inerentes à Tabela 10, nas Tabelas 14 e 15 e os relativos à Tabela 11, nas Tabelas 16 e 17.

TABELA 12 - Resultados da análise da variância sobre os dados constantes na Tabela 9, entre linhagens, entre dosagens e entre linhagens e dosagens.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F
Entre linhagens	16	7.759,35	484,96	220,44**
Entre dosagens	2	27.731,10	13.865,55	6.302,52**
Entre linhagens e dosagens	32	14.263,79	445,74	202,61**
Resíduo	102	224,00	2,20	
Total	152	49.978,24		

$$\bar{x} = 37,2 \quad CV = 4\%$$

TABELA 13 - Desdobramento dos graus de liberdade da fonte de variação linhagem dentro de dosagem, baseado na Tabela 12.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Entre linhagens e dentro de MC	16	4.193,85	262,12	119,15**
Entre linhagens e dentro de 52 µg/ml de MC	16	15.153,25	947,08	430,49**
Entre linhagens e dentro de 442 µg/ml de MC	16	2.672,04	167,25	76,02**

TABELA 14 - Resultados da análise de variância sobre os dados constantes na Tabela 10, entre linhagens, entre dosagens e entre linhagens e dosagens.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Entre linhagens	14	1.996,10	142,58	176,02**
Entre dosagens	2	20.854,50	10.427,25	12.873,15**
Entre linhagens e dosagens	28	9.927,50	354,55	437,72**
Resíduo	90	72,67	0,81	
Total	134	32.850,77		

$$\bar{x} = 36,2$$

$$CV = 2,5\%$$

TABELA 15 - Desdobramento dos graus de liberdade da fonte de variação linhagens, dentro de dosagem, baseado na Tabela 14.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Entre linhagens				
dentro de MC	14	2.946,31	210,45	259,81**
Entre linhagens e dentro de 52 µg/ml de MC	14	7.742,31	533,74	658,94**
Entre linhagens e dentro de 442 µg/ml de MC	14	1.504,96	107,50	132,72**

TABELA 16 - Resultados da análise da variância sobre os dados constantes na Tabela 11, entre dosagens, entre linhagens e entre linhagens e dosagens.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Entre linhagens	16	4.264,00	266,56	157,73**
Entre dosagens	2	31.157,27	15.578,64	9.218,13**
Entre linhagens e dosagens	32	13.685,84	427,68	253,07**
Resíduo	102	172,67	1,69	
Total	152			

$$\bar{x} = 33,0$$

$$CV = 4,0\%$$

TABELA 17 - Desdobramento dos graus de liberdade da fonte de variação linhagem dentro de dosagem, baseado na Tabela 16.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Entre linhagem e dentro de MC	16	4.166,71	260,43	154,09**
Entre linhagens e dentro de 52 µg/ml de MC	16	11.603,69	725,23	429,13**
Entre linhagens e dentro de 442 µg/ml de MC	16	2.180,36	136,27	80,63

5.7.2. Variantes morfológicos selecionados através do teste de Dunnett (STEEL e TORRIE, 1960)

Como nas análises de variância efetuadas, todos os F apresentaram um valor altamente significativo, como pode ser visto nas Tabelas 12, 13, 14, 15, 16 e 17, indicando diferenças nas diversas linhagens dentro de dosagem. Para discriminação em relação às linhagens controles (*ppy* e *CHL-13*) foi aplicado o teste de Dunnett, nas condições descritas no item 4.13.2., o qual permitiu a seleção de 24 variantes morfológicas cujas colônias apresentaram seus diâmetros, nas diferentes concentrações de cloroneb, diferentes

dos diâmetros das colônias das linhagens *ppy* e *CHL-13* naquelas condições (Ver Tabelas 9, 10 e 11). Os 24 variantes morfológicos selecionados podem ser vistos na Tabela 18, formando dois conjuntos: os dos resistentes e o dos sensíveis ao cloroneb.

TABELA 18 - Variantes morfológicos selecionados através do teste de Dunnett.

Características	Variantes morfológicos				Totais
Resistentes ao cloroneb	<i>CLG-2.13</i>	<i>CLG-4.8</i>	<i>CLG-16.1</i>	<i>CLV-2.17</i>	
	<i>CLG-32.8</i>	<i>CLV-2.5</i>	<i>CLV-4.14</i>	<i>CLV-4.8</i>	
	<i>CLV-4.18</i>	<i>CLV-8.13</i>	<i>CLV-8.15</i>	<i>CLV-8.24</i>	
	<i>CLV.16.5</i>	<i>CLV-16.6</i>	<i>CLV-16.11</i>	<i>CLV-32.2</i>	
	<i>CLV-32.4</i>	<i>CLV-32.5</i>	<i>CLV-32.18</i>	<i>CLV-32.20</i>	20
Sensíveis ao cloroneb	<i>CLV-2.20</i>	<i>CLV-4.1</i>	<i>CLV-16.15</i>	<i>CLV-32.22</i>	4
Total Geral:					24

5.7.3. Variantes morfológicos que foram submetidos à análise genética

Fundamentada nos critérios estabelecidos no item 4.13.2. foi feita a Tabela 19, contendo cinco linhagens resistentes, cada uma com comportamento diferente nas dife-

rentes concentrações de cloroneb do da linhagem *CHL-13* e uma sensível, com comportamento diferente do da linhagem *ppy* naquelas concentrações. A estas linhagens destinadas à análise genética foram acrescentadas mais duas: a *CLV-8.2* com o mesmo comportamento da linhagem *CHL-13* e a *CLG-16.6* com o mesmo comportamento da linhagem *ppy*, nas diferentes concentrações de cloroneb.

TABELA 19 - Linhagens resistentes e uma sensível ao cloroneb utilizadas para análise genética, selecionadas de acordo com o item 4.13.2.

MC	MC + cloroneb		
	Resistente e não dependente	Resistente e dependente	Sensível
Razoável			
crescimento	<i>CLV-2.5</i>	<i>CLV-32.5</i>	————
Bom			
crescimento	————	<i>CLV-4.8</i>	————
Ótimo			
crescimento	<i>CLG-16.1</i>	<i>CLV-8.15</i>	<i>CLV-16.15</i>

5.8. Análise genética

5.8.1. Distinção entre herança nuclear e extranuclear

A fim de verificar se ocorria algum tipo de herança extranuclear nos haplóides em análise, procedeu-se como o definido no item 4.14.2. Os resultados obtidos por testes de heterocário (Tabela 20) afastaram a hipótese de herança extranuclear.

TABELA 20 - Resultados dos testes de heterocários.

R = Resistentes

S = Sensível

Heterocários entre as linhagens	b*		e**		f***	
	R	S	R	S	R	S
<i>CLG-16.6 e CHL-17</i>	28	34	-	48	35	-
<i>CLV-16.15 e CHL-17</i>	38	42	-	28	62	-
<i>CLG-16.1 e MSE</i>	52	37	48	-	-	37
<i>CLV-2.5 e MSE</i>	56	35	38	-	-	47
<i>CLV-32.5 e MSE</i>	22	49	18	-	-	28
<i>CLV-8.15 e MSE</i>	30	46	35	-	-	40
<i>CLV-4.8 e MSE</i>	42	23	37	-	-	21
<i>CLV-8.2 e MSE</i>	37	49	32	-	-	19

b* = MC + cloroneb (52 µg/ml)

e** = MM + *pro* + *paba* + cloroneb (52 µg/ml)

f*** = MM + *ade* + *pyro* + *ribo* + *s* + *nic* + cloroneb (52 µg/ml)

5.8.2. Análise mitótica

5.8.2.1. Obtenção e mensuração de diplóides

Procedendo de acordo com o item 4.14.1. foram obtidos heterocários balanceados entre a linhagem MSE e cada uma das linhagens: *CLG-16.7*, *CLV-2.5*, *CLV-32.5*, *CLV-4.8* e *CLV-8.2*, e entre a linhagem *CHL-17* e uma ou outra das duas linhagens: *CLG-16.6* ou *CLV-16.15*. Os conídios, dos possíveis diplóides obtidos, foram submetidos à mensuração, como descrito no item 4.14.3., juntamente com os conídios das linhagens haplóides que os originaram. Os resultados encontram-se na Tabela 21. Cada possível diplóide apresentou um diâmetro médio dos conídios (DMC) maior que o DMC de cada linhagem haplóide que o originou, donde eles foram considerados como realmente diplóides.

TABELA 21 - Diâmetro médio dos conídios (DMC) em micra. Média de cinco conídios com cinco repetições.

Linhagens haplóides	DMC	Possíveis diplóides	DMC
<i>CLG-16.6</i>	3,20	<i>CLG-16.6//CHL-17</i>	4,00
<i>CLV-16.15</i>	3,48	<i>CLV-16.15//CHL-17</i>	4,00
<i>CLG-16.1</i>	3,40	<i>CLG-16.1//MSE</i>	4,00
<i>CLV-2.5</i>	3,20	<i>CLV-2.5//MSE</i>	3,98
<i>CLV-32.5</i>	2,90	<i>CLV-32.5//MSE</i>	4,00
<i>CLV-8.15</i>	3,40	<i>CLV-8.15//MSE</i>	4,00
<i>CLV-4.8</i>	3,20	<i>CLV-4.8//MSE</i>	4,00
<i>CLV-8.2</i>	3,15	<i>CLV-8.2//MSE</i>	4,00
<i>MSE</i>	3,10		
<i>CHL-17</i>	3,21		

5.8.2.2. Haploidização dos diplóides

Para um melhor entendimento do processo, consideremos duas composições ferroviárias, cada uma com oito vagões e correspondendo cada vagão a um dos oito grupos de ligação do *A. nidulans* e genericamente designado pelo gene marcador do respectivo grupo de ligação. Assim sendo, se uma das composições corresponde a linhagem MSE, teremos:

Vagões	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Genes	<i>pro</i> ⁺							
Marcadores	<i>ou</i> <i>paba</i> ⁺	<i>w</i>	<i>lac</i>	<i>pyro</i>	<i>fac</i>	<i>s</i>	<i>nic</i>	<i>ribo</i>

Em um destes vagões existe um passageiro (marca a ser localizada), neste caso, marca para sensibilidade ao cloroneb.

A outra composição pode corresponder a qualquer um dos variantes morfológicos resistentes ao cloroneb, podendo ser genericamente representado, como segue:

Vagões	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Genes	<i>pro</i>							
Marcadores	<i>ou</i> <i>paba</i>	<i>w</i> ⁺	<i>lac</i> ⁺	<i>pyro</i> ⁺	<i>fac</i> ⁺	<i>s</i> ⁺	<i>nic</i> ⁺	<i>ribo</i> ⁺

Nesta composição, a marca a ser localizada é a para resistência ao cloroneb, forma alternativa da marca

para sensibilidade.

Se os 16 vagões estiverem no pátio de manobras (condição do diplóide), um manobrista (haploidizante) poderá fazer 252 composições diferentes sem repetição. O passageiro (marca para sensibilidade) referente à linhagem MSE permanecerá em um dos vagões (grupo de ligação), no qual se encontrava na composição inicial (a permuta mitótica normalmente não acompanha a haploidização) e o passageiro (marca para resistência) da outra composição inicial permanecerá em um dos vagões (homólogo ao da outra composição) do variante morfológico correspondente. Portanto, a marca a ser localizada estará sempre junta com o gene marcador no grupo de ligação correspondente.

Na prática, a localização do "*locus*" para resistência ou sensibilidade ao cloroneb foi feita através da análise das placas descritas no item 4.14.3..

Os resultados referentes aos produtos haplóides provenientes de diplóides formados por variantes morfológicos resistentes e a linhagem MSE encontram-se nas Tabelas 22 e 23 e os relacionados com os diplóides formados por variantes morfolótigos sensíveis e a linhagem *CHL-17*, na Tabela 24.

A análise das Tabelas 22 e 23 mostrou que existe uma correspondência biunívoca entre o número de seto-

res resistentes ao cloroneb e o número de gal^+ , e entre o número de sensíveis e o de gal . Logo, o gene (passageiro) para resistência ou sensibilidade encontra-se no grupo de ligação III.

A análise da Tabela 24 mostrou, como se esperava, o inverso, isto é, o gene para sensibilidade foi sempre com o gal^+ e o gene para resistência com gal .

TABELA 22 - Localização do *locus* para resistência ou sensibilidade ao cloroneb, utilizando os setores brancos resultantes da haploidização dos diplóides:

a) *CLV-2.5//MSE*;   b) *CLV-4.8//MSE*;

c) *CLG-16.1//MSE*

R = Resistentes

S = Sensíveis

Grupos de ligação	Genes mar- cadores	Produtos de haploidização dos diplóides					
		a		b		c	
		R	S	R	S	R	S
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	17	2	4	1	14	4
	<i>pro</i> <i>paba</i>	1	4	5	1	3	1
II	<i>w</i> ⁺	0	0	0	0	0	0
	<i>w</i>	18	6	9	2	17	5
III	<i>gal</i> ⁺	18	0	9	0	17	0
	<i>gal</i>	0	6	0	2	0	5
IV	<i>pyro</i> ⁺	17	4	7	1	16	2
	<i>pyro</i>	1	2	2	1	1	3
V	<i>fac</i> ⁺	16	3	8	1	13	4
	<i>fac</i>	2	3	1	1	4	1
VI	<i>s</i> ⁺	18	2	9	1	12	4
	<i>s</i>	0	4	0	1	5	1
VII	<i>nic</i> ⁺	16	1	7	2	11	3
	<i>nic</i>	2	5	2	0	6	2
VIII	<i>ribo</i> ⁺	10	3	6	2	12	2
	<i>ribo</i>	8	3	3	0	5	3

TABELA 23 - Localização do *locus* para resistência ou sensibilidade ao cloroneb, utilizando os setores brancos resultantes da haploidização dos diplóides:

a) *CLV-8.2//MSE*;

b) *CLV-8.15//MSE*;

c) *CLV-32.5//MSE*

R = Resistentes

S = Sensíveis

Grupos de ligação	Genes marcadores	Produtos de haploidização dos diplóides					
		a		b		c	
		R	S	R	S	R	S
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	8	9	3	6	6	7
	<i>pro</i> <i>paba</i>	4	2	3	10	4	4
II	<i>w</i> ⁺	0	0	0	0	0	0
	<i>w</i>	12	11	6	16	10	11
III	<i>gal</i> ⁺	12	0	6	0	10	0
	<i>gal</i>	0	11	0	16	0	11
IV	<i>pyro</i> ⁺	11	6	2	8	5	6
	<i>pyro</i>	1	5	4	8	5	5
V	<i>fac</i> ⁺	10	4	0	7	6	4
	<i>fac</i>	2	7	6	9	4	7
VI	<i>s</i> ⁺	10	3	5	10	3	6
	<i>s</i>	2	8	1	6	7	5
VII	<i>nic</i> ⁺	11	3	4	9	2	8
	<i>nic</i>	1	8	2	7	8	3
VIII	<i>ribo</i> ⁺	12	6	2	6	3	5
	<i>ribo</i>	0	5	4	10	7	6

TABELA 24 - Localização do *locus* para resistência ou sensibilidade ao cloroneb, utilizando os setores brancos resultantes da haploidização dos diplóides:

a) *CLG-16.6//CHL-17*

b) *CLV-16.15//CHL-17*

R = Resistente

S = Sensível

Grupos de ligação	Genes marcadores	Produtos de haploidização dos diplóides			
		a		b	
		R	S	R	S
I	<i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	3	12	1	13
	<i>pro</i> <i>paba</i>	4	6	1	0
II	<i>w</i> ⁺	0	0	0	0
	<i>w</i>	7	18	2	13
III	<i>gal</i> ⁺	0	18	0	13
	<i>gal</i>	7	0	2	0
IV	<i>pyro</i> ⁺	4	13	1	7
	<i>pyro</i>	3	5	1	6
V	<i>fac</i> ⁺	3	15	2	11
	<i>fac</i>	4	3	0	2
VI	<i>s</i> ⁺	4	14	2	9
	<i>s</i>	3	4	0	4
VII	<i>nic</i> ⁺	2	14	2	8
	<i>nic</i>	5	4	0	5
VIII	<i>ribo</i> ⁺	2	14	2	10
	<i>ribo</i>	5	4	0	3

5.8.3. Análise meiótica

De acordo com a metodologia descrita no item 4.14.4., foram feitas as análises dos ascósporos vindos de cleistotécios híbridos provenientes do cruzamento de variantes morfológicas resistentes com a linhagem *MSE* e dos variantes morfológicos sensíveis com a linhagem *CHL-17*, levando em consideração os *loci* para resistência ao cloroneb e *gal* (Ver item 5.8.2.2.).

Os dados obtidos encontram-se dispostos na Tabela 25, a qual mostra uma distância média entre os *loci* de aproximadamente 35 unidades.

TABELA 25 - Mapeamento do *locus* para resistência ou sensibilidade ao cloroneb, para cada variante morfológico, levando em consideração os *loci* para resistência ao cloroneb e *gal*, ambos localizados no grupo de ligação III.

Cruzamentos	Tipos paternais	Tipos recombinantes	C	S(%)
<i>CLV-8.15 x MSE</i>	80	40	33,33	4,30
<i>CLG-16.1 x MSE</i>	66	38	36,54	4,39
<i>CLV-32.5 x MSE</i>	70	40	36,36	4,39
<i>CLV-8.2 x MSE</i>	65	37	36,27	4,76
<i>CLV-4.8 x MSE</i>	73	39	34,82	4,35
<i>CLV-2.5 x MSE</i>	65	38	36,89	4,40
<i>CLV-16.15 x CHL-17</i>	67	39	36,79	4,40
<i>CLV-16.6 x CHL-17</i>	66	38	36,54	4,39

5.8.4. Alelismo ou heterogeneidade genética

Procedendo de acordo com o item 4.14.5., para os cinco cruzamentos efetuados obtivemos os seguintes números de colônias:

<i>CLV 2.5</i>	<i>x</i>	<i>CHL-17</i>	104
<i>CLV 32.5</i>	<i>x</i>	<i>CHL-17</i>	112
<i>CLV 32.22</i>	<i>x</i>	<i>CHL-17</i>	131
<i>CLV 4.8</i>	<i>x</i>	<i>CHL-17</i>	114
<i>CLV 8.2</i>	<i>x</i>	<i>CHL-17</i>	98
<i>CLG 16.1</i>	<i>x</i>	<i>CHL-17</i>	101

Todas as colônias eram resistentes sendo tal fato um forte indício de ausência de heterogeneidade genética.

5.9. Curvas de dose-resposta

Os diâmetros das colônias (média de 4 repetições) referentes a cada linhagem haplóide resistente e parcialmente dependente de cloroneb e *MSE*, ou diplóides nas diferentes concentrações de cloroneb, obtidos de acordo com o item 4.15., encontram-se dispostos nas Tabelas 26 e 27 e as curvas de dose-respostas obtidas através dos dados nelas contidos, nas Figuras: 5, 6, 7, 8. Estas figuras mostram clara-

mente o caráter recessivo para resistência e semi-dependência do cloroneb.

TABELA 26 - Diâmetros de colônias das linhagens haplóides resistentes *CLV-4.8* e *CLV-8.15*, da linhagem *MSE* e das linhagens diplóides *CLV-4.8//MSE* e *CLV-8.15//MSE*, em concentrações crescentes de cloroneb.

Concentrações de cloroneb (µg/ml de MC)	Linhagens				
	<i>CLV-4.8</i>	<i>CLV-4.8//MSE</i>	<i>CLV-8.15</i>	<i>CLV-8.15//MSE</i>	<i>MSE</i>
	Diâmetros em milímetros				
0	28,00	40,00	30,00	40,00	45,00
3,26	35,00	40,00	42,00	40,00	41,50
32,50	35,00	30,00	40,00	25,00	27,00
65,00	30,00	24,00	35,00	32,00	25,00
97,50	33,00	24,00	30,50	20,00	23,00
130	30,00	22,00	36,50	20,00	20,00
162,50	20,00	17,00	18,00	-	-
260,00	18,00	13,00	25,00	14,00	11,00

TABELA 27 - Diâmetros de colônias das linhagens haplóides resistentes *CLV-32.5* e *CLV-8.2*, da linhagem *MSE* e das linhagens diplóides *CLV-32.5//MSE* e *CLV-8.2//MSE* em concentrações crescentes de cloroneb.

Concentrações de cloroneb ($\mu\text{g/ml/de MC}$)	Linhagens				
	<i>CLV-32.5</i>	<i>CLV-32.5//MSE</i>	<i>CLV-8.2</i>	<i>CLV-8.2//MSE</i>	<i>MSE</i>
	Diâmetros em milímetros				
0	18,00	40,00	25,50	45,00	45,00
3,26	40,00	40,00	35,00	45,00	41,50
32,50	40,00	21,00	39,00	23,50	27,00
65,00	40,00	20,00	37,30	17,50	25,00
97,50	35,00	17,00	40,50	20,00	23,00
130,00	36,00	20,00	35,00	20,50	20,00
162,50	36,00	20,00	37,00	14,00	16,00
260,00	25,00	15,00	28,20	12,00	11,00

Figura 5 - Comportamento das linhagens *CLV-4.8* ($\blacktriangle \dots \blacktriangle$), *CLV-4.8//MSE* ($\bullet \text{---} \bullet$) e *MSE* ($\blacksquare \text{----} \blacksquare$) em concentrações crescentes de cloroneb. Figura baseada nos dados contidos na Tabela 26.

Figura 6 - Comportamento das linhagens *CLV-8.15* (▲....▲), *CLV-8.15/MSE* (●—●) e *MSE* (■----■) em concentrações crescentes de cloroneb. Figura baseada nos dados contidos na Tabela 26.

Figura 7 - Comportamento das linhagens *CLV-8.2* (▲....▲), *CLV-8.2//MSE* (●—●) e *MSE* (■----■) em concentrações crescentes de cloroneb. Figura baseada nos dados contidos na Tabela 27.

Figura 8 - Comportamento das linhagens CLV-32.5 (▲.....▲), CLV-32.5//MSE (●—●) e MSE (■ ---- ■) em concentrações crescentes de cloroneb. Figura baseada nos dados contidos na Tabela 27.

5.10. Influência de outros genes na sensibilidade ao cloroneb

Procedendo de acordo com o descrito no item 4.16., foram isolados 52 setores e após purificação verificou-se quais os genes marcadores para auxotrofia e fonte de carbono existentes em cada variante morfológico. Desses, foram selecionados oito, que apresentavam diferença em pelo menos dois genes marcadores, apresentando, portanto, genomas diferentes.

O comportamento de cada um destes oito produtos de haploidização da linhagem *CLV-8.2//MSE*, nos diferentes meios de cultura, pode ser visto na Tabela 28.

TABELA 28 - Comportamento dos produtos de haploidização da linhagem *CLV-8.2//MSE*, em diferentes meios de cultura.

Li- nha- gens	MM +T [*]	MM +T -pro	MM +T -paba	MM + T -ade	MM + T -nic	MM + T -pyro	MM + T -s	MM + T -ribo	MA + T	MG + T
1	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
4	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
7	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
8	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-

T^{*} = pro + paba + ade + nic + pyro + s + ribo

Foram feitos inóculos de conídios destas oito diferentes linhagens, em placas contendo MC e crescentes concentrações de cloroneb, de acordo com o descrito no item 4.15.

Os resultados encontram-se dispostos na Tabela 29 e nesta pode-se verificar que as diferentes linhagens apresentam um comportamento semelhante nos diferentes meios, indicando a não participação de outros genes na manifestação do caráter sensibilidade ao cloroneb.

TABELA 29 - Comportamento dos produtos da haploidização de linhagem *CLV-8.2//MSE* em concentrações crescentes de cloroneb.

Concentrações de cloroneb ($\mu\text{g/ml}$ de MC)	Linhagens e diâmetros das colônias em milímetros							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0	43	44	44	43	45	43	44	45
3,26	40	40	39	40	41	40	41	41
32,50	27	25	26	26	26	26	26	25
65,00	25	24	25	24	24	25	25	24
97,50	22	22	23	22	22	23	23	22
130,00	19	19	20	20	18	20	19	20
162,50	15	15	15	16	15	14	15	16
260,00	11	10	11	10	10	11	10	11

6. DISCUSSÃO

6.1. Possível utilização da linhagem *CHL-13* na detecção de mutagênicos

Com os dois mutagênicos físicos ensaiados (raios gama e luz ultra-violeta), a linhagem resistente ao cloroneb (*CHL-13*) em meio sem esta droga produziu setores em quantidade superior ao que ocorre na mesma linhagem sem irradiação (Tabela 4). De fato, um aumento de 2,4 vezes ocorreu no caso da radiação gama e 2,1 vezes no caso da ultra-violeta, em doses escolhidas de tal modo a propiciar 5% de sobrevivência dos conídios irradiados (Tabelas 2 e 3 e Figuras 2 e 3). Aliás, com relação à radiação gama, a linhagem *CHL-13* mostrou-se mais resistente que outras linhagens de *A. nidulans* já submetidas ao tratamento com esse agente físico. OKINO et alii (1978) obtiveram maior mortalidade com raios gama em li

nhagem *biA₁*; *methG₁* do fungo. Pode-se, então, pensar que o marcador genético *chl* da linhagem *CHL-13* tenha algum efeito protetor contra os raios gama, embora mais estudos, em diferentes "backgrounds" genéticos, tenham que ser realizados para verificar a veracidade ou não dessa afirmação.

O sistema para detecção de mutagênicos, empregando a linhagem *CHL-13*, tem algumas limitações como, por exemplo, não proporcionar aumentos dramáticos no número de setores uma vez que o aparecimento de setores, especialmente os que se originam logo no início do desenvolvimento da colônia, impedem a emergência de outros setores. Embora com essa limitação de ordem quantitativa, o método tem seu valor de natureza qualitativa e é vantajoso do ponto de vista da qualidade de sua aplicação. Além disso, como os mutantes resistentes ao cloroneb são dependentes da droga e é nisso que se baseia o teste, na seleção de setores com vários graus de dependência do cloroneb, ele permite uma obtenção, também, de mutantes resistentes a partir de setores sensíveis, desde que esses sejam colocados novamente em meio com cloroneb. Essa técnica, a semelhança de outras já utilizadas em *A.nidulans* (APIRION, 1962, 1965; ALDERSON e SCAZZOCHIO, 1967, e CALVORI e MORPURGO 1966), permite um estudo das mutações diretas e reversas em um único locus gênico em *A. nidulas*.

Além de mutagênicos físicos, o método pode-se prestar ao uso de mutagênicos químicos como, aliás, discuti-

do por ELISBÃO (1980). Além disso, a linhagem *CHL-13* é utili
zável para detecção de mutagênicos pois o caráter parece não
sofrer influência nem de outros *loci*, nem de fatores extranu
cleares como visto neste trabalho.

6.2. Análise dos setores emergentes da linhagem *CHL-13* submetida a várias doses de radiação gama ou luz ul- tra-violeta

As Tabelas 5 e 6 mostram que, mesmo em doses
menores que as que propiciam 5% de sobrevivência, pode ha-
ver aumento na frequência de setores no caso dos raios gama.
Com luz ultra-violeta, a técnica de microcolônias propicia
sempre um aumento na frequência de setores em comparação com
o controle.

Os setores obtidos foram tentativamente colo-
cados em grupos, tanto com relação à luz ultra-violeta como
com relação aos obtidos por radiação gama. As Tabelas 7 e 8
mostram a grande variabilidade que pode ser encontrada em am
bos os casos. Embora a classificação possa ser considerada
um tanto quanto subjetiva, 15 grupos foram obtidos com rela-
ção aos raios gama e 29 com relação à luz ultra-violeta. As
Tabelas 9, 10 e 11 mostram a enorme variabilidade obtida den-
tre os setores. Uma vez que seria extremamente laboriosa a

análise de todos os tipos obtidos, foi necessária a introdução de análise estatística para reduzir o número de setores que poderiam ser, em seguida, submetidos a uma análise genética (Tabelas 12 a 18). Finalizou-se, assim, com um número razoável de setores (Tabela 19) para análise.

6.3. Análise genética dos setores

Na atual pesquisa, nas oito linhagens submetidas ao teste do heterocário (JINKS, 1963) nada transpareceu que indicasse uma herança que não fosse exclusivamente devido a genes nucleares, na resistência ou sensibilidade ao cloroneb em *Aspergillus nidulans* (Tabela 20).

Usando a mesma metodologia preconizada por ROPER (1952) e claramente descrita por FORBES (1959), com o auxílio de diferentes linhagens e diferentes substâncias haploidizantes, a localização do *locus* para resistência ou sensibilidade ao cloroneb foi feita no grupo de ligação III, por TUYL (1977) e por MARTINEZ ROSSI (1979).

PACHECO SANT'ANA (1974) localizou o citado *locus* no grupo de ligação IV, o mesmo acontecendo com AZEVEDO, PACHECO SANT'ANA e BONATELLI (1977).

Estes pesquisadores não conseguiram encontrar ligação meiótica entre tal *locus* e os *loci* *biA*₁ e *methG*₁ si-

tuados no mesmo grupo de ligação daquele e PACHECO SANT'ANA (1974) não realizou análise meiótica.

Baseado nas considerações acima e no teste de alelismo realizado por ELISBÃO (1980) entre uma linhagem resistente ao cloroneb por ele obtida cujo *locus* para resistência ao cloroneb se encontrava no grupo de ligação III, e a *Clo*₁ (PACHECO SANT'ANA, 1974) originando produtos pós-meióticos tão somente resistentes, é passível de sugestão a hipótese especulativa de que na realidade só exista um *locus* para resistência ou sensibilidade ao cloroneb, localizado no grupo de ligação III.

Com referência à linhagem *CHL-11*, resistente e parcialmente dependente de cloroneb (MARTINEZ ROSSI, 1979), da qual o *locus* para resistência ou sensibilidade ao cloroneb não foi localizado em nenhum dos grupos de ligação, foi admitido pela pesquisadora que tal ocorreu pela não obtenção de setores resistentes ao cloroneb quando do uso da *p*-fluor-fenilalanina.

Para a não ocorrência de setores resistentes ao cloroneb, pode ser admitida a hipótese de que tal fato é devido ao menor valor adaptativo dos setores resistentes quando na ausência de cloroneb, pois o mesmo foi observado quando do uso do benlate (Ver item 5.10.), que possibilitou a obtenção de 52 colônias provenientes dos produtos de haploidização da linhagem *CLV-8.2/MSE*, todos sensíveis ao *clo*

roneb. Por este motivo, quando da localização do *locus* para resistência ou sensibilidade ao cloroneb na presente pesquisa foram utilizados dois tipos de haploidizantes: o benlate que possibilitou o surgimento de setores sensíveis e por produzir menor frequência de recombinação mitótica (KAPPAS, 1978) e o cloroneb, conforme descrito no item 4.14.3.

Ao serem verificadas as curvas da dose-resposta obtidas por MARTINEZ ROSSI (1979), foi constatado que a linhagem *CHL-11* apresentava uma maior dependência de cloroneb em relação às outras linhagens, pois se em MC a colônia apresentava um diâmetro de aproximadamente 20 mm, quando do uso do cloroneb (51,9 µg/ml) a colônia apresentava um diâmetro de aproximadamente 72 mm, após 96 horas de incubação.

Verificou-se, ainda, uma característica interessante com referência à linhagem *CHL-11*, pois foi em uma concentração de cloroneb de 205,9 µg/ml que a colônia desta linhagem apresentou o diâmetro de um número de vezes maior do que o diâmetro da linhagem sensível (MSE), em relação as demais concentrações, razão pela qual pode-se considerar que o uso daquela concentração (205,9 µg/ml), provavelmente, possibilitaria a localização do *locus* para resistência ou sensibilidade ao cloroneb, no seu grupo de ligação.

O passo mais importante, que deve preceder a toda análise genética, talvez seja este, isto é, a determinação através das curvas de dose-resposta da concentração de

cloroneb que permita que as colônias resistentes se apresentem bem distintas das linhagens sensíveis e vice-versa, quando da análise dos produtos de haploidização ou dos produtos pós-meióticos.

Pelas Figuras 5, 6, 7, 8, relativas aos variantes morfológicos resistentes e parcialmente dependentes de cloroneb, pode-se verificar que uma concentração de cloroneb em torno de 130 µg/ml de MC já permitiu uma boa distinção entre a linhagem haplóide sensível (MSE) e o respectivo variante morfológico resistente.

TUYL (1977) realizou análise meiótica utilizando a linhagem *CHL-8* por ele obtida e verificou que quatro *loci* referentes à resistência a fungicidas, localizados no grupo de ligação III, estavam ligados. Pelo mapa de ligação apresentado pelo pesquisador o *locus* para resistência ou sensibilidade ao imazalil (*imaG*) foi colocado a duas unidades do mapa do *locus* do gene marcador *phenA₁*, no mesmo braço cromossômico que este e em posição distal em relação ao centrômero.

Ao considerar que o gene *chlA* para resistência ao cloroneb estava situado a 35 unidades do mapa de *imaG* (neste caso o *imaG* colocado no mesmo braço cromossômico que o gene *chlA*, não no braço em que se encontra o gene *phenA₁*, afirmou TUYL (1977) que esta localização do gene *chlA* estava de acordo com o suposto alelismo com o gene *penb* e que

THRELFALL (1968) mapeou este gene a 15 unidades de *argB* e as 17 unidades de *galA*₁.

THRELFALL (1968), porém, não mapeou o *locus penb*₁, pois foi por ele realizado um único teste de três pontos entre as linhagens *bi*₁; *tenb*₁ e *y*₂; *meth*₁; *gal*₁ *nic*₈; *ribo*₂ a respeito do qual somente se fez uma afirmativa: que o gene *tenb*₁ estava situado entre *meth*₂ e *gal*₁.

Com referência ao *penb*₁ o mesmo pesquisador afirmou que este *locus* estava ligado ao *arg*₂ e situado entre este *locus* e o centrômero, situação esta verificada através de análise mitótica.

Esta localização do gene *penb* insinua um possível alelismo com o gene para resistência ao cloroneb, pois MARTINEZ ROSSI (1979) localizou este gene em posição distal ao centrômero, levando em consideração o *locus galA*₁.

Pelo exposto acima, pode-se esquematizar um segmento que represente parte do grupo de ligação III, como segue:

Análise meióticas realizadas por MARTINEZ ROSSI (1979) levando em consideração as cinco linhagens resistentes e parcialmente dependentes de cloroneb (*CHL-12*,

CHL-13, *CHL-14* e *CHL-15*) que forneceram uma distância média de 32 unidades do mapa entre os loci *chl* e *galA*₁, e a distância média obtida na presente pesquisa (Tabela 25) de aproximadamente 35 unidades entre os loci *chl* e *galA*₁, pode-se admitir que a distância entre os loci *chl* e *galA*₁ situa-se entre 30 e 36 unidades do mapa.

Levando em consideração estes últimos dados e o segmento do grupo de ligação III correspondente ao intervalo entre *meth*₂ e o centrômero (CLUTTERBUCK, 1974 - incompleto) verifica-se que existe uma certa coerência no esquema abaixo:

Um aumento do número de produtos pós-meióti-
cos analisados, provavelmente, aproximará o intervalo entre *chl* e *galA*₁ para 30 unidades do mapa.

Com referência ao gene *chl*₁₁ (MARTINEZ ROSSI, 1979), que não foi localizado em seu grupo de ligação e que pela análise meiótica apresentou uma fraca ligação com o marcador *galA*₁, considerou a pesquisadora que tal acontecia por ser a linhagem *CHL-11* instável e estar esta instabilidade provavelmente relacionada com aberrações cromossômicas, fato

semelhante ao observado por BAINGRIDGE e ROPER (1966) e posteriormente por NGA e ROPER (1968) e AZEVEDO E ROPER (1970).

A instabilidade da linhagem *CHL-11* não justifica a dificuldade encontrada, pois a linhagem *CHL-13* também é instável, assim como as linhagens dela provenientes por ação de agentes mutagênicos, como foi verificado na presente pesquisa (Ver item 5.6.).

A verdadeira razão desta dificuldade talvez encontre uma explicação no uso da concentração conveniente de cloroneb, para a distinção dos produtos pós-meióticos resistentes à droga, dos sensíveis, como foi visto anteriormente.

6.4. Relação de dominância

THRELFALL (1968) admitiu a impossibilidade de medir o diâmetro das colônias de diplóides heterozigotos devido a emergência de setores, quando estas colônias cresciam em MC contendo concentrações crescentes de PCNB, porém, afirmou que o caráter resistência ao PCNB era recessivo.

Através das curvas de dose-resposta obtidas para a linhagem diplóide e haplóides que lhe deram origem, AZEVEDO, PACHECO SANT'ANA e BONATELLI (1977) admitiram que o caráter resistência ao cloroneb era semi dominante, fenômeno

semelhante ao observado por ROPER E KÄFER (1957) com relação à acriflavina e por WARR e ROPER (1965), com referência actidione.

Quando dos primeiros ensaios para verificar a relação de dominância referente a quatro das oito linhagens selecionadas para análise genética na presente pesquisa, foram encontrados vários graus de resistência, inclusive semi-dominância, pois as medidas dos diâmetros das colônias foram feitas visualizando as mesmas pela parte inferior das placas que as continham. As extremidades dos diâmetros obtidos correspondiam aos limites dos setores resistentes emergentes das colônias diplóides, não das colônias diplóides. Quando foi utilizado o método descrito no item 4.15., isto é, o diâmetro é igual a duas vezes o raio, este considerado como a distância entre o centro geométrico e a borda livre da colônia diplóide (local em que não ocorreu emissão de setores), a análise das curvas de dose-resposta mostrou que na realidade o gene para resistência ao cloroneb comportava-se em todos os casos como recessivo (Figuras 5, 6, 7 e 8).

Estes resultados coincidem com os obtidos para as linhagens *CHL-11*, *CHL-12*, *CHL-13*, *CHL-14* e *CHL-15*, por MARTINEZ ROSSI (1979), e os de TUYL (1977), tendo este usado a porcentagem de dominância como critério para quantificar o grau de dominância para a resistência dos vários fungicidas por ele estudado em *Aspergillus nidulans* e afirmado que

o grau de dominância em relação à resistência àqueles fungicidas podia variar de totalmente recessivo, no caso de mutantes resistentes ao cloroneb, a completa dominância, para alguns mutantes resistentes à ciclohexamida.

Os resultados encontrados por ELISBÃO (1980), dos quais constam diferentes graus de dominância para a resistência ao cloroneb, justificam-se pela possibilidade de mutação em outros sítios, com resultados diferentes.

7. CONCLUSÕES

1. A linhagem *CHL-13* se presta qualitativamente para detecção de mutagênicos físicos.

2. O *locus* para resistência ao cloroneb em *A. nidulans* está, como já confirmado por outros autores, no grupo de ligação III.

3. Setores emergentes de colônias resistentes ao cloroneb têm diferentes graus de dependência e resistência o que torna o sistema extremamente útil para estudos de mutação direta e reversa no mesmo *locus* e de genes modificadores dessas características.

8. SUMMARY

The utilization of *Aspergillus nidulans* strains for the detection of substances that produce point mutation, have received little attention. This study verifies the possibility of using a strain which is resistant and partially dependent on chloroneb. Six resistant and two sensitive strains were selected statistically for genetic analysis. From there 201 sectors were obtained using the method of sector emersion. These presented perfect delineation, emerged from colonies of strain *CHL-13* and were obtained by radiating microcolonies with gama ray and ultra-violet radiation.

Allelism tests have shown that only one *locus* was involved; the heterokaryon test proved that extra-nuclear factors were not influencing the resistance or sensitivity of the strain to chloroneb; mitotic analyses showed that the *locus* was in linkage group III; meiotic

analyses indicated that the *locus* for resistance or sensitivity to chloroneb was situated approximately 30 recombination units from *locus galA₁*; and finally it was verified after using eight different post-haploidie sensitive products, that genes at other *loci* did not influence the sensitivity of the strain to chloroneb.

9. LITERATURA CITADA

- ALDERSON, T., 1969. Spontaneous and induced reversion of ICR -170-induced xanthine dehydrogenase mutants of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 8:521-529.
- ALDERSON, T. e A. M. CLARK, 1966. Interlocus specificity for spontaneous and induced forward mutation at several gene *loci* in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 8: 255-264.
- ALDERSON, T. e M. J. HARTLEY, 1969. Specificity for spontaneous and induced forward mutation at several gene *loci* in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 8:255-264.
- ALDERSON, T. e C. SCAZZOCHIO, 1967. A system for the study of interlocus specificity for both forward reverse mutation in at least eight gene *loci* in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 5:567-577.
- AMES, B. N., J. McCANN e E. YAMASAKI, 1975. Methods for

- detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome test. *Mutation Research*, 31:347-364.
- APIRION, D., 1962. A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice versa in micro-organisms. *Nature*, London, 195:959-961.
- ARLETT, C. F., 1966. The influence of the cytoplasm on mutation in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 3: 410-419.
- AZEVEDO, J. L., 1973. Heterocariose e análise meiótica em *Aspergillus nidulans*. In: AZEVEDO, J. L. e S. O. P. COSTA (eds). *Exercícios Práticos de Genética*. Cia. Ed. Nacional e Ed. da Universidade de São Paulo, São Paulo. p. 177.
- AZEVEDO, J. L. e J. A. ROPPER, 1970. Mitotic non conformity in *Aspergillus*; successive transposable genetic changes. *Genetical Research*, 16:79-93.
- AZEVEDO, J. L., A. OLIVEIRA e A. J. ROCHA CAMPOS, 1976. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. *Summa Phytopathologica*, 2:237-241.
- AZEVEDO, J. L., E. PACHECO SANT'ANA e R. BONATELLI, 1977. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1-4-oxantin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 48: 163-172.
- AYLING, P. D., 1969. Methionine suppressors in *Aspergillus nidulans* their genetics and behaviour in heterokaryons and

- diploids. *Genetical Research*, 14:275-289.
- BALL, C., e J. A. ROPER, 1966. Studies on the inhibition and mutation of *Aspergillus nidulans* by acridines. *Genetical Research*, 7:207-221.
- BARACHO, I. R., R. VENCOVSKY e J. L. AZEVEDO, 1970. Correlations between size and hibrid or selfed state of cleistotecia in *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, 54:109-116.
- BAINBRIDGE, B. W. e J. A. ROPER, 1966. Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 42:417-424.
- BIGNAMI, M., G. MORPURGO, R. PAGLIANI, A. CARERE, G. CONTI e G. DI GIUSSEPE, 1974. Non-disjunction and crossing-over induced by pharmaceutical drugs in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 26:159-170.
- BIGNAMI, M., F. AULUCINO, A. VELCICH, A. CARERE e G. MORPURGO, 1977. Mutagenic and recombinogenic action of pesticides in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 46:395-402.
- CALVORI, C. e C. MORPURGO, 1966. Analysis of induced mutation in *Aspergillus nidulans*. I. UV: and HNO_2 -induced mutation. *Mutation Research*, 3:145-151.
- CRACKOWER, S. H. R., 1972. The effects of griseofulvin on mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Canadian Journal of*

Microbiology, 18:683-687.

CLUTTERBUCK, A. J., 1974. *Aspergillus nidulans*. In: KING, R. C. (ed). *Handbook of genetics*. New York and London, Plenum Press, p. 447-510.

DARLINGTON, A. J. e C. SCAZZOCHIO, 1967. Use of analogues and substrat sensitivity of mutants in analogues of purine uptake an breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 93:937-940.

DE BERTOLDI, M., R. BARALE e M. GIOVANNETTI, 1978. Mutagenicity of pesticides evalueted by means of gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 53:174-175.

DE BERTOLDI, M., M. GRISELLI e R. BARALE, 1979. Improved genetic systems in *Aspergillus nidulans* for testing mutagens. *Mutation Research*, 64:120-121.

DE SERRES, J. F., 1972. The detection of mutation with non mamalyan systems. In: SUTTON, H. E. e T. M. HARRIS (eds). *Mutation Effects of Enviromental Contaminants*, New York and London, Academic Press, p. 41-45.

DUARTE, F. A. M., 1968. Efeitos mutagênicos de alguns ésteres de ácidos inorgânicos em *Aspergillus nidulans*. Brasília, U. B., 73 p. (Tese de Doutorado).

DUARTE, F. A. M., 1971. Genetic and allied effects of certain esters of inorganic acids in *Aspergillus nidulans*.

Experientia, 27:960-967.

DUARTE, F. A. M., 1972. Efeitos mutagênicos de alguns ésteres de ácidos inorgânicos em *Aspergillus nidulans*.

(EIDAM) WINTER. *Ciência e Cultura* (São Paulo), 24:42-52.

ELISBÃO, T., 1980. Mutagenicidade no locus responsável pela resistência ao fungicida cloroneb em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 137 p. (Tese de Doutorado).

GAJEWSKI, W. e J. LITWINSKA, 1968. Methionine loci and their suppressors in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 102:210-220.

GEORGOPOULOS, S. G., A. KAPPAS e A. C. HASTIE, 1976. Induced sectoring in diploid *Aspergillus nidulans* as a criterion of fungitoxicity by interference with hereditary process. *Phytopathology*, 66:217-220.

GEORGOPOULOS, S. G., C. ZAFIRATOS e E. GEORGADIS, 1967. Membrane function and tolerance to aromatic hidrocarbon fungitoxicants in conidia of *Fusarium solani*. *Physiol. Plant.*, 20:373-381.

HARTLEY, M. J., 1970. The frequency of reverse mutation at the YDH loci of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*: 10:175-183.

HASTIE, A. C., 1970. Benlate induced instability of *Aspergillus diploids*. *Nature*, 226:771.

HOLLAENDER, A. (ed), 1971-1976. *Chemical mutagens*. Vols.

- 1-4, Plenum, New York.
- HOLLSTEIN, M., J. McCANN, F. A. ANGELOSANTO e W. W. NICHOLS, 1979. Short-term test for carcinogens and mutagens. *Mutation Research*, 65:133-226.
- JINKS, J. L., 1963. Cytoplasmatic inheritance in fungi. In: BURDETTE, W. J. (ed). *Methodology in basic Genetics*, Holdenday, San Francisco, California, p. 325-354.
- KÄFER, E., 1961. The process of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46: 1581-1609.
- KAPPAS, A., 1977. Genetic effects of fungicides through metabolic activation in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 46:224.
- KAPPAS, A., 1978. On the mechanisms of induced somatic recombinations by certain fungicides in *Aspergillus nidulans*. *Phytopathology*, 51:189-197.
- KAPPAS, A., S. GEORGOPOULOS e A. HASTIE, 1974. On the genetic activity of benzimidazole and thiophanate fungicides on diploid *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 26:17-27.
- KLINCZUK, J. O., 1970. Spontaneous and induced reversion of *meth₁* mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genética Polonica*, 11:313-319.
- KOLMARK, G., 1953. Differential response to mutagens as

studies by the "*Neurospora* Reverse Mutation Test."

Heredities; 39:270-276.

LEGATOR, M. S., 1976. First anual course in the principles and pratices of genetic toxicology. Galveston, Texas. University of Texas Medical Branch.

LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with p-fluorophenylalanine. *Nature*, London, 190:744.

LHOAS, P., 1968. Crowth rate and haploidization of *Aspergillus niger* on medium containing p-fluorophenylalanine. *Genetical Research*, 12:305-315.

LILLY, J. LORNA, 1963. "A possible technique for the simultaneos measurement of forward mutation rate in several cistrons". *Aspergillus News Letter*, 4:8.

LILLY, L. J., 1965. An investigation of suitability of the supressors of *meth*₁ in *Aspergillus nidulans* for the study of induced and spontaneous mutation. *Mutation Research*, 2:192-195.

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

MACRIS, B. e S. G. GEORGOPOULOS, 1969. Reduced hexosamine content of fungal cell wall due to the fungicide

- pentachloronitrobenzene. *Phytopathology*, 59:879-880.
- MARTINEZ ROSSI, N. M. 1979. Mutantes resistentes ao fungicida cloroneb em *Aspergillus nidulans* (EIDAM) WINTER. Piracicaba, ESALQ/USP, 104 p. (Dissertação de Mestrado).
- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregation induced by *p*-fluorophenylalanine. *Aspergillus Newsletter*, 2:10.
- MORPURGO, G., 1962a. A new method of estimating forward mutation in fungi resistance to 8-azaguanine and *p*-fluorophenylalanine. *Scientific Reports Instituto Superiore di Santia*, 2:9-12.
- MORPURGO, G., 1962b. Quantitative measurement of induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Scientific Reports Instituto Superiore di Santia*, 2:324-329.
- MORPURGO, G., 1963. Induction of mitotic crossing over in *Aspergillus nidulans* by bifunctional alkylating agents. *Genetics*, 48:1259-1263.
- MURTHY, M. S. S., 1979. Induction of gene conversion in diploid yeast by chemicals: correlation with mutagenic action and its relevance in genotoxicity screening. *Mutation Research*, 64:1-17.
- NGA, B. H. e J. A. ROPER, 1968. Quantitative intracromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 58:193-209.

- OKINO, L. A., J. C. SILVA, A. L. L. DOS SANTOS, C. L. MESSIAS e J. L. AZEVEDO, 1978. Determinação da sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* e duas espécies de *Aspergillus* à radiação gama. *O SOLO*, 2:32-36.
- OLIVEIRA, L. M. B., 1978. Resistência à arginina em linhagens deficientes para síntese de lisina em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 116 p. (Dissertação de Mestrado).
- PACHECO SANT'ANA, E., 1974. Alteração na frequência de recombinação mitótica e mutantes resistentes a fungicidas em *Aspergillus nidulans* (EIDAM) WINTER. Piracicaba, ESALQ/UPS, 63 p. (Dissertação de Mestrado).
- PONTECORVO, G., J. A. ROPER, L. M. HEMMONS, K. D. Mac DONALD e A. W. J. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.
- PASZENSKY, A. e J. GRABSKY, 1973. β -cystathionease and O-acetyl-homoserine sulphydrylase as the enzyme of alternative methionine biosynthetic pathways in *Aspergillus nidulans*. *Acta Biochimica Polonica*, 20:159-168.
- PUTRAMENT, A., J. GUZEWSKA e D. PIENIAZEK, 1970. Further characteristics of methionine mutants and their suppressors in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 109:209-218.

- ROBERTS, C. F., 1959. A replica plating technique for the isolation of nutritionally exating mutants of filamentous fungus (*Aspergillus nidulans*). *The Journal of General Microbiology*, 20:540-548.
- ROPER, J., 1971. *Aspergillus*. In: HOLLAENDER, A. (ed). *Chemical Mutagens*. New York, Plenum Press, p. 343-363.
- ROPER, J. A. e E. KÄFER, 1957. Acriflavin resistant mutant in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 16:660-667.
- ROPER, J. A., 1952. Production of heterozigous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8:14-15.
- ROSATO, Y. B., 1973. Efeitos do etil-metanosulfonato e acriflavina na instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 74 p. (Tese de Mestrado).
- ROSATO, Y. B. e J. L. AZEVEDO, 1978. Acriflavine and ethyl methanesulfonate induced mutants of *Aspergillus nidulans* strains with chromosome duplication. *Revista Brasileira de Genética*, 4:247-263.
- SCOTT, B. R., T. ALDERSON e D. G. PAWORTH, 1973. The effect of plating densities on the retrieval of methionine supressors mutation after ultraviolet or gamma irradiation of *Aspergillus*. *Journal of General Microbiology*, 75:235-239.
- SHANFIELD, B. e E. KÄFER, 1971. Chemical induction of

- mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 67:209-219.
- SIDDIQI, O. H., 1962a. Mutagenic action of mitrous acid on *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 3:303-314.
- SIDDIQI, O. H., 1962b. The fine struture of the *paba*₁ region in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 3:69-89.
- SINHA, V., 1970. Competition between leucine and phenylalanine and its relation to *p*-fluorophenylalanine resistant mutations in *Aspergillus nidulans*. *Arch. Mikrobiol.*, 72:308-317.
- STEEL, R. G. D. e J. H. TORRIE, 1960. Principles and procedures of statistics. New York, Mc Graw-Hill Book Company, Inc. 481 p.
- THRELFALL, R. J., 1968. The genetics and biochemistry of mutants of *Aspergillus nidulans* resistant to chlorinated nitrobenzenes. *Journal of General Microbiology*, 71:173-180.
- THRELFALL, R. J., 1972. Effect of pentachlonitrobenzene (PCNB) and other chemicals on sensitive, and PCNB resistant strains of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 71:173-180.

- TUYL, J. M. Van, 1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. *Nederland Mededelingen Landbouwhogeshool Wageningen*, 136 p.
- VAN ARKEL, G. A., 1963. Sodium arsenate as an inducer of somatic reduction. *Aspergillus Newsletter*, 4:9.
- VONVOYANNI, V. E. e S. G. GEORGOPOULOS, 1966. Dosage response relationships in diphenyl tolerance of *Hypomyces*. *Phytopathology*, 56:1330-1331.
- WARR, J. R. e J. A. ROPER, 1965. Resistance to various inhibitors in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 40:273-281.
- WEBER, D. J. e J. M. OGAWA, 1965. The mode of action of oxanthiin systemic fungicides. V. Effect of electrontransport system of *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiol. Plant.*, 110:628-632.
- ZIMMERMAN, F. K., 1971. Induction of mitotic gene conversion by mutagens. *Mutation Research*, 11:327-337.