MUTANTES RESISTENTES AO FUNGICIDA CLORONEB EM
Aspergillus nidulans (EIDAM) WINTER

NILCE MARIA MARTINEZ ROSSI

ORIENTADOR : JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil

março - 1979

A meus pais

Ao Rossi, Rodrigo e André.

A G R A D E C I M E N T O S

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, e, em especial:

- Ao Prof.Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação segura, estímulo e confiança e também pelos ensinamentos adquiridos no convívio com seu grupo de pesquisas.
- À Profa.Dra. Tânia Maria A.Domingues Zucchi, pela nossa iniciação na pesquisa de microrganismos e, estímulos constantes.
- Ao Prof.Dr. Ernesto Paterniani, pelas facilidades concedidas como Diretor do Instituto de Genética, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo.
- À Profa.Dra. Iris Ferrari, Chefe do Departamento de Genética e Matemática Aplicada à Biologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pelo apoio no início da nossa atividade profissional.

- À Srta. Libertad Maria Nali do Centro de Computação pela ajuda na análise estatística.
- Aos funcionários do Instituto de Genética da ESALQ - USP, pelos serviços prestados.
- À Sra. Seny Ribeiro dos Santos Motta do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pelos auxílios técnicos.
- As Sras. Cleusa Sueli Mazzucatto da Mota e Letícia B. Caetano pelos serviços datilográficos.
- Aos amigos do setor de Genética de Microrganismos da ESALQ - USP, pelas contribuições e sugestões.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro concedido ao Laboratório de Microrganismos do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, através do Plano Integrado de Genética (PIG).

I N D I C E

	página
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Linhagens utilizadas	14
4.1.1. Símbolos dos marcadores genéticos e fe nótipos correspondentes	15
4.2. Soluções e meios de cultura utilizados	16
4.2.1. Solução de vitaminas	16
4.2.2. Hidrolizado de ácido nucleico de leve duras	17
4.2.3. Solução de cloroneb	17
4.2.4. Solução salina	17
4.2.5. Solução de tween	18
4.2.6. Solução de <i>p</i> -fluorofenilalanina (<i>p</i> FA).	18
4.2.7. Solução de benlate.....	18
4.2.8. Suplementos adicionados ao meio mínimo	19
4.2.9. Meio mínimo	19
4.2.10. Meio completo	20
4.2.11. Meio de acetato de amônia	20
4.2.12. Meio de galactose	21
4.2.13. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo	21
4.2.14. Condição de preparo e conservação das soluções e dos meios de cultura utili zados	21

4.3. Inoculação e incubação.....	23
4.4. Purificação das linhagens	23
4.5. Sobrevivência ao cloroneb	23
4.6. Obtenção de mutantes	24
4.7. Curva Dose-Resposta	25
4.8. Técnicas de análise genética	26
4.8.1. Obtenção de heterocários	26
4.8.2. Teste do heterocário	27
4.8.3. Segregação meiótica	28
4.8.4. Isolamento de diplóides	29
4.8.5. Análise mitótica	30
4.8.6. Análise meiótica	32
4.8.7. Teste de alelismo	33
4.8.8. Recombinação mitótica	33
4.8.9. Relação de dominância	34
4.9. Análise de Reversões.....	34
4.9.1. Obtenção de reversões	35
4.9.2. Estabilidade das reversões	35
4.9.3. Natureza das reversões	36
5. RESULTADOS	37
5.1. Sobrevivência ao cloroneb	37
5.2. Obtenção de mutantes a partir da linhagem <i>proAl</i> <i>pabaA6 yA2</i>	39
5.3. Caracterização dos mutantes resistentes	39
5.3.1. Toxidez do cloroneb em linhagens <u>resis</u> tentes e sensíveis	39
5.3.2. Relação de dominância	46
5.4. Análise genética dos mutantes	46
5.4.1. Teste do heterocário	46

5.4.2. Determinação do número de <i>loci</i> envolvi - na resistência	57
5.4.3. Localização das mutações nos grupos de ligação	58
5.4.4. Mapeamento dos <i>loci</i> mutantes nos grupos de ligação	60
5.4.5. Alelismo	60
5.4.6. Posição do marcador em relação ao centrô - mero	64
5.5. Reversões	67
6. DISCUSSÃO	69
6.1. Sobrevivência ao cloroneb	69
6.2. Obtenção e caracterização de mutantes	71
6.3. Análise genética	76
6.4. Reversões	82
7. CONCLUSÕES	87
8. SUMMARY	89
9. LITERATURA CITADA	91

LISTA DE TABELAS

	página
01 Número e porcentagem dos conídios sobreviventes ao cloroneb. Linhagem <i>proA1 pabaA6 yA2..</i>	38
02 Análise de variância da sobrevivência de conídios da linhagem <i>proA1 pabaA6 yA2</i> frente ao cloroneb. Dados apresentados na Tabela 1	38
03 Número e frequência de setores resistentes obtidos em várias concentrações de cloroneb Tempo de incubação: 7 dias	42
04 Diâmetro de colônias (em mm) ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas	43
05 Porcentagem de desenvolvimento das colônias de cada linhagem, calculada a partir dos dados da Tabela 4	44
06 ED ₅₀ de linhagens sensíveis e resistentes estimados a partir dos dados apresentados na Figura 3	46
07 Diâmetro das colônias da linhagem CHL-11 // MSE (em mm) comparadas com o das linhagens	

	MSE e CHL-11 ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação 96 horas	47
08	Diâmetro de colônias da linhagem CHL-12//MSE (em mm) comparados com o das linhagens CHL 12 e MSE ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas	49
09	Diâmetro de colônias da linhagem CHL-13//MSE (em mm) comparados com o das linhagens CHL-13 e MSE ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas...	51
10	Diâmetro de colônias da linhagem CHL-14//MSE (em mm) comparados com o das linhagens CHL-14 e MSE ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas...	53
11	Diâmetro de colônias da linhagem CHL-15//MSE (em mm) comparados com o das linhagens CHL - 15 e MSE ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas	
12	Segregação meiótica de cruzamentos das linhagens resistentes com a linhagem MSE	59

13	Análise mitótica dos segregantes haplóides de CHL-12//MSE, CHL-13//MSE, CHL-14//MSE e CHL- 15//MSE	61
14.	Análise meiótica dos mutantes resistentes ..	61
15	Análise meiótica do mutante CHL-11	62
16	Genótipo dos segregantes haplóides obtidos por haploidização de diplóides, originados por recombinação mitótica de um diplóide heterozigoto para os marcadores <i>gal</i> e <i>chl</i> ..	66

LISTA DE FIGURAS

01	Mapa genético da linhagem MSE	15
02	Setor resistente a partir da linhagem <i>proA1</i> <i>pabaA6</i> <i>yA2</i> em meio completo contendo <u>cloro</u> <u>neb</u> (60 µg/ml) de meio)	41
03	Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos <u>da</u> dos apresentados, na Tabela 5. CHL-11, CHL-12 CHL-13, CHL-14 e CHL-15 são linhagens resis - tentes e MSE, ppy e Ve^+ são sensíveis	45
04	Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos <u>da</u> dos apresentados na Tabela 7	48
05	Curvas Dose-Resposta obtidos a partir dos <u>da</u> dos apresentados na Tabela 8	50
06	Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos <u>da</u> dos apresentados na Tabela 9	52
07	Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos <u>da</u> dos apresentados na Tabela 10	54
08	Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos <u>da</u> dos apresentados na Tabela 11	56
09	Linhagens revertentes inoculadas em placas de Petri contendo meio completo. A. Linhagem CHL-14(Rv) mostrando estabilidade . B. Linha	

	gem CHL-13(Rv) mostrando instabilidade	68
10	Mapa genético parcial do grupo de ligação III do <i>Aspergillus nidulans</i> segundo <i>THRELEALL</i> (1968) e <i>TUYL</i> (1977)	81

C U R R I C U L U M V I T A E

NILCE MARIA MARTINEZ ROSSI, licenciada em Ciências Biológicas pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo em 1972.

Ingressou no Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo em 1976.

Foi bolsista do CNPq no período de março de 1976 a fevereiro de 1978.

Foi Docente Voluntária da disciplina de Genética na Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, de maio de 1977 a maio de 1978.

Foi contratada como Professor Visitante pelo Departamento de Genética e Matemática Aplicada à Biologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em março de 1978, função que ocupa até a presente data.

1. RESUMO

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de caracterizar e analisar geneticamente mutantes de *Aspergillus nidulans* resistentes ao fungicida cloroneb (1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno). Estes mutantes foram obtidos, da linhagem *proA1 pabaA6 yA2*, por setores que emergem de linhagens sensíveis quando em presença deste inibidor, e caracterizados através das respectivas curvas de Dose-Resposta.

As reversões destas mutações foram estudadas visando a caracterização de um sistema indicador da potencialidade de substâncias mutagênicas através do mecanismo de mutação direta e reversa.

Dos resultados obtidos pôde-se concluir que o cloroneb comporta-se como fungistático, inibindo o desenvolvimento das linhagens sensíveis sem afetar a viabilidade. Discutiu-se a possibilidade da utilização deste fungicida na compactação de colônias de fungos como é feito com deoxicolato de sódio.

A análise genética de mutantes resistentes evidenciou uma única mutação, localizada no grupo de ligação III, como responsável pela resistência. Esta mutação comportou-se, em todos os casos, como recessiva quando em diploídes heterozigotos.

Estes mutantes são parcialmente dependentes do cloroneb o que possibilita o isolamento de mutações diretas e reversas. Das reversões obtidas, uma foi caracterizada como reversão verdadeira, outra como supressão e uma terceira não foi caracterizada por se mostrar instável. Discutiu-se a possibilidade desta instabilidade ser devido a uma aberração cromossômica.

2. INTRODUÇÃO

Desde que se verificou a possibilidade de análise genética em fungos homotáticos, o *Aspergillus nidulans* tem sido muito estudado geneticamente por apresentar uma série de vantagens (PONTECORVO *et alii* 1953b). Com esta finalidade foram isolados vários tipos de mutantes que se diferenciam do tipo selvagem em relação a morfologia, requisitos nutricionais, resistência a drogas e outros.

Os mutantes resistentes a agentes inibidores constituem um grupo de interesse tanto acadêmico como aplicado. Eles foram evidenciados não somente em fungos, como também em quase todos os organismos nos quais se tentou controlar ou prevenir o crescimento através de uma substância inibidora. Um exemplo bem marcante, e que vem merecendo um estudo sistemático, é fornecido pelas bactérias resistentes a antibióticos utilizados no combate a doenças infecciosas no homem e nos animais.

Por outro lado, o desenvolvimento de resistên

cia a fungicidas em fungos fitopatogênicos, de ocorrência rara até recentemente, foi bastante aumentada quando os fungicidas sistêmicos começaram a ser utilizados em larga escala. Estes fungicidas atuam principalmente em sítios específicos do metabolismo celular e uma única alteração genética pode resultar num alto grau de resistência.

Entre os fungicidas sistêmicos se encontra o cloroneb (1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno) que é utilizado no controle de fungos fitopatogênicos, e para o qual, várias linhagens de fungos resistentes foram descritas. AZEVEDO *et alii* (1977) isolaram uma linhagem de *Aspergillus nidulans* resistente ao cloroneb e parcialmente dependente do mesmo. Esta dependência possibilita a obtenção de mutações diretas e reversas e portanto a seleção de mutantes em ambas as direções com alto poder de resolução.

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de caracterizar e analisar geneticamente outros mutantes de *Aspergillus nidulans* resistentes ao cloroneb, obtidos por setores que emergem de linhagens sensíveis quando em meio contendo este inibidor.

Além disto, a frequência e a origem das reversões destas mutações foram estabelecidas visando a caracterização do mecanismo de mutação direta e reversa como um sistema para detectar a potencialidade de substâncias mutagênicas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

A resistência a fungicidas por fungos fitopatogênicos, era raramente observada até bem pouco tempo, (TOLEDO 1974) mas já havia sido previsto um aumento no número destes casos, com a utilização cada vez mais frequente de fungicidas específicos (GEORGOPOULOS e ZARACOVITIS 1967 e GEORGOPOULOS 1969). Nas revisões de ASHIDA (1965) com fungicidas metálicos e de GEORGOPOULOS e ZARACOVITIS (1967) com fungicidas orgânicos, não havia sido descrito qualquer caso de resistência com importância fitopatológica.

Atualmente inúmeros casos de resistência a fungicidas sistêmicos estão descritos (TOLEDO 1974, DEKKER 1972, 1976; FEHRMANN 1976 a,b; TUYL 1977). Possivelmente quando um fungicida interfere em muitos sítios do metabolismo do fungo, muitas mutações são necessárias para a obtenção de mutantes resistentes. Isto pode ser uma explicação para o fato de pouca resistência ter sido encontrada para inibidores do tipo múltiplos sítios como, por exemplo, ditiocarbamato e

fungicidas metálicos, em contraste com inibidores do tipo unico sítio (DEKKER 1972). A caracterização dos mecanismos que conferem esta resistência é ainda bastante restrita (FEHRMANN 1976b) pois geralmente é necessário *a priori* o conhecimento do mecanismo de ação destes inibidores (TUYL 1977).

Três mecanismos básicos foram propostos por KAAS SIJPESTEIJIN (1972) para explicar a ação dos fungicidas em geral; inibição da produção de energia (ATP), interferência com os processos biossintéticos ou destruição da estrutura celular por alteração da permeabilidade da membrana celular.

Provavelmente todos os hidrocarbonetos aromáticos tenham um mecanismo de ação único (TILLMAN e SISLER 1973) interferindo com os processos hereditários (TUYL 1977) como foi mostrado pela indução de setores em linhagens diplóides de *Aspergillus nidulans* (GEORGOPOULOS *et alii* 1976). Realmente HOCK e SISLER (1969) haviam verificado que o cloroneb parecia inibir direta ou indiretamente a síntese de DNA no estágio de polimerização dos nucleotídeos em *Rhizoctonia solani*. A incorporação de timidina na fração do DNA da hifa foi inibida de 65 a 90%.

TILLMAN e SISLER (1973) verificaram que o cloroneb não age diretamente na síntese do DNA, mas sim na citocinese, impedindo a duplicação dos esporos de *Ustilago maydis*. Estes autores sugeriram que a inibição da síntese de DNA pelo cloroneb em *Rhizoctonia solani* (HOCK e SISLER 1969)

tenha sido provavelmente também baseada numa ação indireta.

A presente revisão pretende apresentar um resumo da literatura sobre agentes inibidores em *Aspergillus ni*du*lans* e sobre mutantes resistentes a hidrocarbonetos aromáticos nos fungos em geral, que tenham sido analisados geneticamente.

A primeira substância a inibir efetivamente linhagens de *Aspergillus nidulans* foi a acriflavina (ROPER e KÄFER 1957). Estes autores isolaram três mutantes resistentes a acriflavina, sendo que em cada caso a resistência era devida a mutação em um único gene. Em dois deles, os genes para resistência eram semidominantes, alelos e conferiam independentemente alto grau de resistência. O terceiro era recessivo e conferia baixa resistência. Os dois *loci* mutantes foram localizados no mesmo grupo de ligação.

Ensaando vários inibidores de *Aspergillus ni*du*lans*, WARR e ROPER (1965) obtiveram para cada linhagem uma mutação num único gene, conferindo resistência e actidione (*Act1*), *p*-fluorofenilalanina (*pf21*), teoquil (*tel*), iodoacetato (*Iod1*) ou verde de malaquita (*mg1*). *Iod1* era dominante, *Act1* semidominante, *pf21*, *tel* e *mg1* recessivos. O alelo para resistência a *Act1* e o alelo para resistência a *tel* foram localizados no grupo de ligação III.

Outros *loci* que conferem resistência a *p*-fluorofenilalanina foram descritos e mapeados em *Aspergillus ni*du*lans* por SRIVASTAVA e SINHA (1975) e PIOTROWSKA *et ali*

(1976). Estes últimos autores tiveram como objetivo o estudo do transporte de aminoácidos neutros.

Vários trabalhos descritos na literatura utilizam mutantes resistentes a análogos de bases nitrogenadas, aminoácidos e outros requisitos nutricionais para estudo dos processos celulares do *Aspergillus nidulans* como por exemplo: p-fluorofenilalanina (MORPURGO 1962); purina, 8-azaguanina, 2-tioxantina, ácido 2-tiôúrico (DARLINGTON e SCAZZOCCHIO 1967) metilamônio (ARST e COVE 1969); iodoacetato (GEORGOPOULOS e GEORGADIS 1969); fluoropirimidinas (PALMER *et alii* 1975); hidroxamato aspártico (DRAINAS *et alii* 1977).

Genes de origem extranuclear, são citados como responsáveis pela resistência a alguns antibióticos como por exemplo oligomicina (ROWLANDS e TURNER 1973, 1977 e MASON e TURNER 1975) e cloranfenicol (GUNATILLEKE *et alii* - 1975b e MASON e TURNER 1975). Os resultados de MASON e TURNER (1975) sugerem que estas mutações estão localizadas no genoma mitocondrial.

Interações entre resistência e requisito nutricional foram observadas em vários casos. Isto possibilita a seleção de mutantes nos dois sentidos (direta e reversa) e sua consequente utilização como indicador da potencialidade de substâncias mutagênicas (ALDERSON e HARTLEY 1969).

APIRION (1962) isolou mutantes resistentes a fluoroacetato que se tornaram simultaneamente incapazes de

utilizar acetato como única fonte de carbono. Quando estes se tornavam sensíveis a fluoroacetato, por reversão, adquiriam a capacidade de utilização do acetato. Esta mutação em ambos os sentidos, baseada em resistência e auxotrofia, evidenciou um sistema com alto poder de resolução para seleção de mutação direta e reversa (APIRION 1965).

Outro exemplo de sistema de seleção em dois sentidos foi fornecido por alguns mutantes resistentes a *p*-fluorofenilalanina que se tornaram auxotróficos para tirosina (MORPURGO 1962, CALVORI e MORPURGO 1966 e SINHA 1967).

ARMITT *et alii* (1976) descreveram 10 novos loci que afetam o metabolismo do acetato, baseado na resistência ao fluoroacetato e a não utilização de acetato como única fonte de carbono. Sete *loci* mutantes responsáveis pela ausência de enzimas foram mapeados.

Foi descrito por OLIVEIRA (1978) um sistema adequado para a detecção da potencialidade de mutagênicos utilizando linhagens de *Aspergillus nidulans* deficientes para a síntese de lisina que eram resistentes a arginina. Nas revisões de ROPER (1971) e CLUTTERBUCK (1974) são citados vários mutantes resistentes a agentes inibidores em *Aspergillus* *ni-*
dulans.

HASTIE e GEORGOPOULOS (1971) isolaram nove mutantes de *Aspergillus nidulans* resistentes ao fungicida benlate. Os cinco mais resistentes possuíam o gene que conferia

a resistência no grupo de ligação III (*ben1*) e os quatro restantes no grupo de ligação II (*ben2*). Estes genes segregavam independentemente e sem efeitos aditivos. Os dois genes resistentes eram recessivos. Todas estas linhagens mostraram resistência cruzada ao benomil e ao tiobendazol. *TUYL et alii* (1974) e *TUYL* (1975a) descreveram resistência no *locus ben1* e a rara ocorrência de linhagens resistentes ao benomil que eram sensíveis ao tiobendazol, e resistentes ao tiobendazol que eram mais sensíveis ao benomil que a linhagem selvagem.

Três *loci*, mapeados nos grupos de ligação III, VII e VIII, foram identificados como responsáveis pela resistência ao carboxin. A resistência era conferida, em cada linhagem analisada, por uma única mutação em qualquer um destes *loci*. (*GUNATILLEKE et alii* 1975a, *TUYL* 1975b e *TUYL* 1977).

AZEVEDO et alii (1977) obtiveram espontaneamente linhagens resistentes ao vitavax que segregavam como um único gene, dominante, mapeado no grupo de ligação VII.

LACAVA (1977) estudando linhagens de *Aspergillus nidulans* resistentes ao benomil, dodine e plantvax, verificou que a resistência para cada um deles era devida a um único gene. O gene para resistência ao benlate (*ben1*) foi localizado no grupo de ligação VIII, não havendo ligação genética entre ele e o marcador *niboB2*. Os genes para resistência a dodine (*dod1*) e a plantvax (*plal*) localizados no grupo

de ligação VII, também não apresentaram qualquer ligação genética com o marcador *nic88*.

Os hidrocarbonetos aromáticos constituem o grupo de fungicidas orgânicos em que é mais frequente a ocorrência de casos de resistência (TOLEDO 1974), sendo os primeiros fungicidas para os quais se detectou um alto grau de resistência quando usado sistematicamente (DEKKER 1976). Fazem parte deste grupo o tetracloronitrobenzeno (TCNB), pentacloronitrobenzeno (PCNB), difenil, ortofenilfenato de sódio, 2,6-dicloro-4-nitroanilina (dicloran) e 1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno (cloroneb).

Linhagens de *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*, resistentes simultaneamente a TCNB e PCNB foram obtidas por GEORGOPOULOS (1962a). No cruzamento de linhagens resistentes com sensíveis foi verificada segregação Mendeliana na progênie. Este mesmo autor (1962b), cruzando diferentes linhagens resistentes obteve resistentes e sensíveis numa proporção de 2:1, evidenciando a existência de pelo menos 2 genes distintos que atuam independentemente um do outro. Foi também sugerido que estes dois genes estão localizados em diferentes cromossomos ou em diferentes braços do mesmo cromossomo.

Foi determinado por GEORGOPOULOS (1963a,b) a existência de três *loci* genéticos para a resistência ao cloronitrobenzeno em *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. Cada *loci*

continha dois alelos que segregavam independentemente. Observeu-se em vários fungos, assim como em *Hypomyces solani* f. *cucurbitae* que os resistentes ao difenil mostravam-se também resistentes ao cloronitrobenzeno (GEORGOPOULOS e VOMVOYANNI 1965). Mutantes deste fungo obtidos na presença de difenil, revelaram mutações nos loci *cnb1* e *cnb2*, já caracterizados para resistência ao cloronitrobenzeno por GEORGOPOULOS (1963b). A resistência ao difenil desenvolvida por mutação em qualquer loci, fornece resistência ao cloronitrobenzeno (VOMVOYANNI e GEORGOPOULOS 1966).

A existência de resistência cruzada entre fungicidas do grupo dos hidrocarbonetos aromáticos, já havia sido proposto, como uma regra geral, por GEORGOPOULOS e VOMVOYANNI (1965).

Foram isolados por THRELFALL (1968) quatro mutantes de *Aspergillus nidulans* resistentes aos fungicidas PCNB e TCNB. Três destes mutantes resistentes eram alélicos, sendo a resistência conferida por um dos dois loci mapeados no grupo de ligação III. Foi discutida a possibilidade da resistência ser causada mais por uma ineficiência de absorção da droga pelo fungo, que pela sua metabolização.

TILLMAN e SISLER (1971 e 1973) isolaram um mutante de *Ustilago maydis* resistente ao cloroneb. Verificaram que não havia diferença significativa entre o mutante e o selvagem na absorção do fungicida e que em ambos não houve

metabolização da droga. Um único gene foi responsável por esta mutação que proporcionava resistência também ao dicloran, hexaclorobenzeno, naftaleno, *p*-diclorobenzeno, pentaclorobenzeno e fenilfenato de sódio.

AZEVEDO et alii (1977) isolaram um mutante de *Aspergillus nidulans* resistente ao cloroneb (*Ch11*) que segregou como um gene simples, semidominante e que foi mapeado no grupo de ligação IV. Esta mutação propiciava uma dependência parcial à droga.

TUYL (1977) caracterizou e analisou geneticamente mutantes resistentes a vários fungicidas sistêmicos , entre eles o cloroneb. Em todas as dez linhagens resistentes a este fungicida evidenciou-se mutações em um único gene (*Ch1A*) como responsável pela resistência. Este gene foi considerado alelo aquele que conferia resistência ao pentacloro nitrobenzeno (*pcnbA*), descrito por *THRELFALL* (1968) por apresentar completa resistência cruzada entre PCNB e cloroneb, e pela semelhança de posição no mapa genético do grupo de ligação III do *Aspergillus nidulans*. Provavelmente a resistência ao PCNB, cloroneb e outros hidrocarbonetos aromáticos seja definida pelo mesmo fator genético (*TUYL* 1977).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens utilizadas

a. Linhagem Ve^+ . Linhagem selvagem contendo confídios verdes.

b. Linhagem *proA1 pabaA6 yA2* (ppy). Os marcadores genéticos desta linhagem estão localizados no grupo de ligação I.

c. Linhagem MSE ("Master Strain E"). O mapa genético desta linhagem contendo marcadores nos oito grupos de ligação (McCULLY e FORBES 1965) está representado na Figura 1.

Todas estas linhagens são provenientes do Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra e estão estocadas no setor de Genética de Microorganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP. A descrição, origem e localização mais precisa dos marcadores de todos os grupos de ligação podem ser encontrados em CLUTTERBUCK (1974).

GRUPOS DE LIGAÇÃO	MARCADORES GENÉTICOS
I	<i>suA1</i> <i>adE20</i> ————— o ————— <i>yA2</i> <i>adE20</i>
II	<i>wa3</i> ————— o —————
III	<i>galA1</i> ————— o —————
IV	————— o ————— <i>pyroA4</i>
V	————— <i>facA303</i>
VI	<i>sB3</i> —————
VII	————— o ————— <i>nicB8</i>
VIII	————— o ————— <i>riboB2</i>

FIGURA 1 : MAPA GENÉTICO DA LINHAGEM MSE.

Os genótipos determinados pelos marcadores genéticos estão descritos no item 4.1.1. Suas posições, bem como o tamanho dos vários grupos de ligação não estão representados em escala. o = centrômero

4.1.1. Símbolos dos marcadores genéticos e fenótipos correspondentes.

MARCADOR	FENÓTIPO
<i>adE20</i>	Requisito para adenina.
<i>facA303</i>	Incapaz de crescer em meio contendo acetato como única fonte de carbono.
<i>galA1</i>	Incapaz de crescer em meio contendo galactose como única fonte de carbono.
<i>nicB3</i>	Requisito para ácido nicotínico.
<i>pabaA6</i>	Requisito para ácido <i>p</i> -aminobenzóico.
<i>proA1</i>	Requisito para prolina.
<i>pyroA4</i>	Requisito para piridoxina.
<i>riboB2</i>	Requisito para riboflavina.
<i>SB3</i>	Requisito para tiosulfato.
<i>suA1 adE20</i>	Supressor do mutante <i>adE20</i> .
<i>WA3</i>	Conídios brancos.
<i>yA2</i>	Conídios amarelos.

4.2. Soluções e meios de cultura utilizados.

4.2.1. Solução de Vitaminas

Esta solução é constituída de:

Ácido nicotínico 100,0 mg

Ácido <i>p</i> -aminobenzóico.....	10,0 mg
Aneurina.....	50,0 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Água destilada esterilizada.	100,0 mg

4.2.2. Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras

Colocou-se 2 g de ácido nucleico de leveduras em 15 ml de solução 1 N de NaOH e 2 g de ácido nucleico de leveduras em 15 ml de solução 1 N de HCl. As soluções foram aquecidas por 20 minutos em banho-maria, misturadas e o pH ajustado em 6,0. A mistura foi filtrada e o volume completado com água destilada para 40 ml.

4.2.3. Solução de cloroneb

1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno (cloroneb)	3,2 g
- Água destilada esterilizada	100 ml

Esta solução foi preparada com o produto bruto fornecido pela Dupont. Os resultados serão apresentados , levando-se em conta somente o produto ativo que corresponde a 65% do produto bruto.

4.2.4. Solução Salina

Cloreto de sódio 8,5 g
 Água destilada até 1000,0 ml

A solução obtida foi geralmente distribuída em frascos (9 ml por frasco) para facilitar os experimentos em que eram necessárias diluições sucessivas.

4.2.5. Solução de tween

tween 80 0,1 ml
 Água destilada até 100,0 ml

4.2.6. Solução de *p*-fluorofenilalanina (*p*FA)

p-fluorofenilalanina 100,0 mg
 Água destilada esterilizada 10,0 ml

4.2.7. Solução de benlate

Metil-1-(butilcarb moil)2-benzimidazol carbamato (benlate) 100 mg.
 Água destilada esterilizada 100 ml.

Esta solução foi preparada com o produto bruto. Os resultados levam em conta somente o produto ativo que corresponde a 50% do produto bruto.

4.2.8. Suplementos adicionados ao meio mínimo

Preparou-se o estoque de suplemento adicionando-se cada um deles em água destilada esterilizada.

SOLUÇÃO ESTOQUE PARA 100 ml DE ÁGUA		QUANTIDADE ADICIONADA POR PLACA DE PETRI CONTENDO 20 ml DE MEIO DE CULTURA	CONCENTRAÇÃO FINAL NO MEIO DE CULTURA
Ácido nicotínico	10,0mg	0,1 ml	0,50µg/ml
Ácido p-aminobenzoico	5,0mg	0,1 ml	0,25µg/ml
Adenina	500,0mg	0,1 ml	25,00µg/ml
Piridoxina	5,0mg	0,1 ml	0,25µg/ml
Prolina	1,0mg	0,1 ml	50,00µg/ml
Riboflavina	10,0mg	0,1 ml	0,50µg/ml
Tiossulfato de sódio	2,0mg	0,1 ml	100,00µg/ml

4.2.9. Meio mínimo (*PONTECORVO et alii* 1953b)

Este meio de cultura é constituído de:

Nitrato de sódio 6,00 g
Sulfato de magnésio heptahidratado 0,52 g

Cloreto de potássio	0,52 g
Fosfato dihidrogenado de potássio	1,52 g
Sulfato de ferro	10 mg
Sulfato de zinco	10 mg
Glicose	10,00 g
Ágar	15,00 g
Água destilada paraa completar	1000,0 ml

4.2.10. Meio completo (*PONTECORVO et alii* 1953b)

Este meio de cultura é constituído de:

Peptona	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Extrato de leveduras	0,5 g
Solução de vitaminas (preparada conforme descrito no item 4.2.1)	1,0 ml
Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras (preparado conforme des crito no item 4.2.2.)	2,5 ml
Meio mínimo (preparado conforme descrito no item 4.2.9.) para completar	1000,0 ml

4.2.11. Meio de acetato de amônia (*APIRION*, 1962)

Este meio de cultura é constituído de:

Acetato de amônia	12,0	g
Cloreto de sódio	2,0	g
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,5	g
Fosfato dihidrogenado de potássio	3,0	g
Sulfato de ferro	10	mg
Sulfato de zinco	10	mg
Ágar	15,0	g
Água destilada	1000,0	ml

4.2.12. Meio de galactose

Este meio de cultura é preparado da mesma forma que o meio mínimo descrito no item 4.2.9. substituindo-se apenas a glicose por galactose como fonte de carbono.

4.2.13. Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo

Adiciona-se ao meio mínimo líquido (meio mínimo descrito no item 4.2.9., exceto ágar) 2% de meio completo líquido (meio completo descrito no item 4.2.10., exceto ágar).

4.2.14. Condições de preparo e conservação das soluções e dos meios de cultura utilizados.

SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA	QUESITOS CORRESPONDENTES
Solução de vitaminas	B, D, E
Hidrolisado de ácido nucleico de <u>le</u> veduras	D, E
Solução de cloroneb	B, F
Solução salina	A, C
Solução de tween	A, C
Solução de pFA	B, D
Solução de benlate	B, D
Suplementos adicionados ao meio mínimo	B, D, E
Meio mínimo	A, C, G
Meio completo	A, C, G
Meio de Acetato de amônia	A, C, H
Meio de galactose	A, C, G
Meio mínimo mais 2% de meio completo	A, C

Significado dos quesitos acima:

A - Autoclavados a 1 atmosfera de pressão por 15 minutos.

B - Levado a banho-maria por 15 minutos.

C - Conservado à temperatura ambiente.

D - Conservado à 4°C.

E - Conservado sob clorofórmio.

F - Preparado na hora de usar.

G - pH é ajustado a 6,8.

H - pH é ajustado a 6,1.

4.3. Inoculação e incubação

Durante os vários experimentos as linhagens estudadas foram inoculadas por dois processos básicos: semeadura e por ponto. O primeiro consiste em espalhar, com auxílio de uma alça de Drigalski, 0,1 ml de uma suspensão de confídios ou ascósporos em placas de Petri contendo meio de cultura, e o segundo consiste da inoculação em pontos específicos, de placas de Petri contendo meio de cultura, com o auxílio de um fio de níquel-cromo ou de um replicador contendo 26 fios de níquel-cromo (AZEVEDO *et alii* 1976). A temperatura de incubação das linhagens utilizadas foi de 37°C em todos os experimentos.

4.4. Purificação das linhagens

A purificação das linhagens tem por finalidade a obtenção de colônias isoladas. Estas colônias são obtidas por estrias, feitas em meio sólido apropriado com o auxílio de uma alça de níquel-cromo contendo os confídios a serem purificados.

4.5. Sobrevivência ao cloroneb

Confídios de colônias incubadas durante 5 a 7

dias foram transferidos, com auxílio de uma alça de níquel - cromo, para tubos de ensaio contendo 2,5 ml de solução de tween (preparada conforme descrito no item 4.2.5.). A suspensão foi agitada vigorosamente para desagregar suas cadeias e o número de confídios por ml foi estimado com auxílio de um hematímetro.

Após diluições apropriadas em solução salina, inoculou-se por semeadura, 0,1 ml desta suspensão em placas de meio completo contendo cloroneb. Estas placas foram preparadas acrescentando-se ao meio completo uma solução de cloroneb, preparada como descrito no item 4.2.3., de modo a atingir concentrações finais que variaram de 51,9 a 2869,0 $\mu\text{g/ml}$ de meio de cultura.

Foram utilizadas de 4 a 5 repetições para cada tratamento e após 72 horas de incubação, procedeu-se a contagem das colônias. Considerando o número de colônias, as diluições feitas e o volume semeado, estimou-se o número de confídios viáveis por ml da suspensão original. A porcentagem de confídios sobreviventes foi calculada para os diferentes tratamentos sempre em comparação com o controle (meio completo sem cloroneb) considerado como 100% de sobrevivência. Utilizou-se a análise da variância para comparar os resultados, dos diferentes tratamentos.

4.6. Obtenção de mutantes

Em placas de Petri contendo meio completo e cloroneb nas concentrações citadas no item 4.5., inoculou-se confídios em dois pontos equidistantes.

Após 7 dias de incubação, emergiram das colônias sensíveis, setores vigorosos e resistentes. Estes setores foram purificados e estocados em meio completo contendo, 60 µg de cloroneb por ml de meio de cultura. Os setores que foram utilizados nos experimentos subsequentes passaram a ser denominados linhagens CHL-11, CHL-12, CHL-13, CHL-14 e CHL-15.

4.7. Curva Dose-Resposta

O efeito do cloroneb sobre linhagens sensíveis e resistentes foi determinado pela medida do diâmetro das colônias. Confídios foram inoculados por pontos no centro de placas de Petri contendo meio completo e cloroneb em diferentes concentrações, como descrito no item 4.5. Às placas controle não foi adicionado cloroneb. Foram feitas 5 a 6 repetições para cada tratamento e os diâmetros das colônias foram determinados após 96 horas de incubação.

A média dos diâmetros obtidos para cada concentração foi expressa como porcentagem do valor máximo obtido para cada linhagem.

A toxidez relativa foi expressa como porcenta

gem do desenvolvimento na presença da droga ou mais especificamente como ED₅₀, que corresponde a concentração que causa 50% de redução no diâmetro das colônias.

4.8. Técnicas de análise genética

4.8.1. Obtenção de heterocários

A primeira etapa para análise genética consiste na obtenção de heterocários que resultam da inclusão de dois núcleos geneticamente diferentes em um citoplasma comum.

Para obtenção de heterocários utilizou-se o método descrito por *PONTECORVO et alii* (1953b) com pequenas modificações (*AZEVEDO*, 1971). A técnica consiste em colocar confídios de duas linhagens requerendo diferentes fatores de crescimento, em 2,5 ml de meio mínimo líquido mais 2% de meio completo, preparado como descrito no item 4.2.13. O meio completo permite um pequeno desenvolvimento dos confídios possibilitando a anastomose das hifas.

Esta suspensão foi colocada em poços feitos em placas de Petri contendo meio mínimo. Estes poços foram feitos com auxílio de um pequeno tubo de ensaio esterilizado, recortando-se circularmente o meio de cultura. Após 6 a 7 dias de incubação, surgiram setores heterocarióticos, partindo dos vários poços, que podiam se desenvolver em meio mínimo.

4.8.2. Teste do heterocário (JINKS, 1963)

O teste do heterocário tem como objetivo verificar se o caráter em estudo é determinado por fatores nucleares ou citoplasmáticos. Para isto utilizou-se heterocários de cada linhagem resistente com a linhagem MSE, obtidos conforme descrito no item 4.8.1., verificando-se basicamente se o caráter resistência ao cloroneb era transmitido de uma linhagem a outra, era perdido ou permanecia estável após um ciclo de heterocariose.

Com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, os confídios das regiões tipicamente heterocarióticas foram transferidos para tubos de ensaio contendo solução de tween. Após diluições apropriadas, para obtenção de colônias isoladas, semeou-se 0,1 ml desta suspensão em placas de Petri contendo meio completo. As colônias que se desenvolveram após 72 horas de incubação foram inoculadas, uma a uma, em 24 pontos préfixados em placas contendo meio completo e cloroneb (60,0 µg/ml de meio). Uma colônia de cada uma das duas linhagens que deram origem ao heterocário foram também inoculadas como controle, completando assim 26 pontos préfixados.

Após 48 horas de incubação pôde-se verificar se as linhagens originais, resistentes e sensíveis, altera-ram seu comportamento frente a droga após permanecerem em citoplasma comum quando em heterocariose. Se o caráter for de

terminado por fatores citoplasmáticos, os conídios provenientes do heterocário serão exclusivamente sensível ou resistente; se for determinado por fatores nucleares, surgirão os dois tipos, sensíveis e resistentes, associados com coloração e morfologia de cada linhagem.

4.8.3. Segregação meiótica

A base genética da herança do caráter resistência foi determinada cruzando-se cada linhagem resistente ao fungicida com a linhagem padrão MSE e analisando-se posteriormente os ascósporos provenientes dos cleistotécios híbridos (*PONTECORVO et alii* 1953b).

Para obtenção dos cleistotécios, placas contendo meio mínimo, com os poços preenchidos pela suspensão de conídios das duas linhagens utilizadas para o cruzamento, foram vedadas com fita adesiva e incubadas por 8 a 10 dias. Após este período, os maiores cleistotécios foram selecionados sob lupa e rolados em placas contendo meio mínimo, para separá-los dos conídios e células de Hülle aderentes. Cada cleistotécio, assim isolado, foi transferido para um frasco contendo solução salina (3 a 4 ml), onde foram esmagados contra as paredes do frasco com auxílio de uma pipeta. A suspensão de ascósporos resultante foi diluída e semeada em meio completo e em meio completo contendo cloroneb. Após três dias de incubação pôde-se caracterizar a progênie com relação a

resistência. O teste do χ^2 foi utilizado para análise dos resultados.

4.8.4. Isolamento de diplóides

Os diplóides foram isolados segundo o método descrito por *ROPER* (1952). A maioria dos conídios dos setores heterocarióticos, obtidos conforme descrito no item 4.8.1. são haplóides e não conseguem se desenvolver em meio mínimo, pois as linhagens utilizadas para a obtenção dos heterocários são sempre auxotróficas. No entanto, quando em heterocariose, pode ocorrer uma fusão de núcleos haplóides originando núcleos diplóides heterozigotos. Estes originam conídios diplóides que poderão se desenvolver em meio mínimo pois as auxotrofias das linhagens envolvidas nos cruzamentos são complementares. Como o aparecimento destes diplóides prototróficos é bastante raro, transferiu-se uma grande quantidade de conídios dos setores heterocarióticos para uma solução de tween, semeando-se 10^6 a 10^7 conídios por placa de Petri contendo meio mínimo. Após 72 horas de incubação, isolou-se diplóides heterozigotos.

Estes diplóides, além de crescerem em meio mínimo, apresentam o diâmetro dos conídios ligeiramente maior que o dos conídios haplóides que lhe deram origem, auxiliando sua caracterização. A medida dos conídios foi obtida atra

vês de um microscópio equipado com ocular micrométrica, tendo-se como critério medir somente cadeias com cinco conídios. Para preservar as cadeias de conídios as lâminas foram preparadas com lisol diluído (1:10) (*PONTECORVO et alii* 1953a). O resultado obtido para cada diplóide foi sempre comparado com o das linhagens haplóides originais.

Por convenção os componentes de um núcleo diplóide foram representados com o símbolo // entre eles.

4.8.5. Análise mitótica

A análise mitótica foi feita através do ciclo parassexual. Este ciclo constitui uma alternativa de sexo, pois pode ocorrer recombinação genética sem necessidade de um processo sexual com meiose (*PONTECORVO e ROPER* 1952).

Os diplóides obtidos conforme descrito no item anterior, foram haploidizados. Isto se processa através de aneuploidia, com sucessivas perdas de cromossomos até que o estágio haplóide estável seja atingido (*KÄFFER* 1960).

Deste modo, os marcadores genéticos de um mesmo grupo de ligação segregam como uma unidade e os genes multantes em estudo poderão ser relacionados com um grupo de ligação particular, desde que se utilize no cruzamento uma linhagem com marcadores nos oito grupos de ligação.

Para induzir a haploidização dos diplóides u

utilizou-se solução de *p*-fluorofenilalanina (*LHOAS* 1961 e *MORPURGO* 1961) , e solução de benlate (*HASTIE* 1970) nas concentrações de 32 e 1 µg/ml de meio completo respectivamente. Estas drogas favorecem o desenvolvimento das linhagens haplóides em detrimento das diplóides. Os conídios diplóides , foram inoculados em placas contendo meio completo e o agente haploidizante, em quatro pontos equidistantes. Após sete dias de incubação os setores haplóides produzidos foram purificados por estrias em meio completo.

Estes segregantes haplóides (segregantes mitóticos) foram inoculados um a um em 26 pontos préfixados em placa contendo meio completo mais cloroneb (60 µg/ml de meio). Após dois dias de incubação, esta placa serviu como mestra e foi repicada em placas de análise usando-se um replicador contendo 26 fios de níquel-cromo.

Cada placa de análise continha meio completo, meio mínimo suplementado com todos os requisitos nutricio-nais de ambas as linhagens envolvidas no cruzamento, meio mínimo suplementado com todos os requisitos e cloroneb (60µg / ml) e meio mínimo suplementado com todos os requisitos exceto aquele sob análise. Utilizou-se também placas contendo meio de galactose e meio de acetato, sendo ambas suplementadas com todos os requisitos nutricionais.

As leituras das placas de análise foram feitas após 24, 48 e 72 horas de incubação, levando-se em conta

o crescimento ou não das colônias.

4.8.6. Análise meiótica

A análise meiótica dos genes que conferem resistência ao cloroneb foi feita de acordo com *PONTECORVO et alii* (1953b). Cruzou-se os mutantes com a linhagem MSE (que apresenta marcadores em todos os grupos de ligação) e analisou-se os ascósporos provenientes de cleistotécios híbridos, (resistentes e sensíveis), obtidos conforme descrito no item 4.3.3., quanto aos requisitos nutricionais.

Para isto, os ascósporos (segregantes meiôticos) foram transferidos para placas mestras (26 pontos prêfixados) contendo meio completo mais cloroneb (60 µg/ml de meio) e incubados por 48 horas. As placas mestras foram então repicadas para placas de análise, descritas no item anterior, com auxílio do replicador multifio. As leituras foram feitas após 24, 48 e 72 horas, observando-se o crescimento ou não das colônias.

Os valores de ligação genética foram obtidos através da fórmula: $C = \frac{r}{n} \cdot 100$ onde r = número total de recombinantes e n = número total de ascósporos analisados. O desvio padrão foi calculado pela fórmula : $s = \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$ onde p = frequência de recombinantes e n = número total de ascósporos analisados.

4.8.7. Teste de alelismo

O teste de alelismo tem por finalidade verificar se mutações mapeadas no mesmo grupo de ligação são alélicas ou não. A técnica consistiu em cruzar linhagem (duas a duas) que apresentavam mutações no mesmo grupo de ligação. Para obter heterocários balanceados, utilizou-se nos cruzamentos, segregantes meióticos que apresentavam requisitos nutricionais complementares. A análise dos ascósporos provenientes de cleistotécios híbridos obtidos conforme descrito no item 4.3.3., fornece evidências da posição relativa dos diferentes mutantes.

4.8.8. Recombinação mitótica

A posição dos genes para resistência, em relação ao centrômero, foi verificada através de análise genética baseada na recombinação mitótica (*PONTECORVO* 1954 e *PONTECORVO* e *KÄFER*, 1956, 1958).

A técnica consistiu em semear suspensão de confídios de diplóides heterozigotos, obtidos do cruzamento entre linhagens CHL com a MSE, em meio completo contendo cloroneb na concentração de 60 µg por ml de meio de cultura, de modo a obter cerca de 15 colônias por placa.

Após 5 a 6 dias de incubação surgiram destas

colônias setores segregantes, os quais foram purificados em meio mínimo. Somente um setor de cada colônia foi isolado.

Estes diplóides segregantes foram então ensaiados quanto a resistência. Os resistentes foram haploidizados (conforme descrito no item 4.8.5.) e os segregantes haplóides ensaiados para os requisitos nutricionais do grupo de ligação em análise.

4.3.9. Relação de dominância

A expressão das mutações para resistência nos diplóides foi determinada utilizando diplóides heterozigotos entre cada linhagem resistente e a MSE. Curvas de Dose-Resposta foram feitas (como descrito no item 4.7.), em todos os experimentos, para o diplóide e para as linhagens haplóides resistentes e sensíveis que o originaram.

Os dados das curvas se refere a média de quatro repetições para cada concentração. O tempo de incubação foi de 96 horas.

Comparando-se as diferentes curvas pôde-se estabelecer se a mutação era dominante, recessiva ou intermediária.

4.9. Análise de reversões

4.9.1. Obtenção de reversões

As linhagens revertentes foram obtidas espon
taneamente. Para isto as linhagens resistentes obtidas como
descrito no item 4.6. foram inoculadas em dois pontos equi -
distantes em placas de Petri contendo meio completo. Após in
cubação de 5 a 7 dias, setores vigorosos emergiram das colô-
nias inoculadas. Conídios destes setores foram purificados e
ensaiados quanto a resistência.

A frequência de reversão foi estimada pelo nú
mero de setores vigorosos obtidos por colônia inoculada.

4.9.2. Estabilidade das reversões

As reversões obtidas de acordo com o item an
terior foram ensaiadas quanto a estabilidade. Com esta
finalidade cada uma destas linhagens foi inoculada por ponto
no centro de placas de Petri contendo meio completo e inocu
ladas até que o desenvolvimento de cada colônia atingisse as
bordas das placas. Foram realizadas pelo menos cinco repeti-
ções para cada linhagem. Posteriormente procedeu-se a análi
se das placas. Aquelas que apresentavam setores emergindo da
colônia original foram consideradas como reversões instáveis
e as outras com desenvolvimento homogêneo e sem setores, fo
ram consideradas reversões estáveis.

4.9.3. Natureza das reversões

As linhagens revertentes e caracterizadas como estáveis foram analisadas quanto a natureza da reversão ou seja, se era devido a genes supressores ou se devido a reversão verdadeira.

A técnica consistiu em cruzar cada linhagem revertente com a linhagem MSE, que é também sensível ao cloroneb (item 4.8.3.).

Os ascósporos obtidos foram semeados em placas de Petri contendo meio completo e meio completo mais 60 μ g de cloroneb por ml de meio de cultura. Observou-se então os segregantes sensíveis e resistentes ao cloroneb. Quando se trata de uma reversão verdadeira todos os segregantes obtidos deverão ser sensíveis, o mesmo não acontece quando genes supressores estão envolvidos na reversão.

5. RESULTADOS

5.1. Sobrevivência ao cloroneb

Conídios da linhagem *proA1 pabaA6 yA2* de *Aspergillus nidulans*, sensíveis ao fungicida cloroneb, foram semeados em placas de Petri contendo meio completo e cloroneb em concentrações crescentes conforme descrito no item 4.5. Os número e as porcentagens relativas dos conídios sobreviventes para cada tratamento estão sumarizados na Tabela 1.

Observou-se que quanto maior a concentração da droga, mais restrito era o desenvolvimento das colônias e a quantidade de conídios produzidos, alterando consequentemente suas morfologias. Contudo, de acordo com a Tabela 1 a viabilidade dos conídios se manteve praticamente constante nas várias concentrações de cloroneb. Para verificar se estas diferenças observadas na viabilidade eram devidas ou não ao acaso, aplicou-se a análise de variância. Os resultados dessa análise estão sumarizados na Tabela 2.

TABELA 1 - Número e porcentagem dos confídios sobreviventes ao cloroneb. Linhagem *proA1 pabaA6 yA2*.

CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/ml}$)	CONFÍDIOS VIÁVEIS POR ml (MÉDIA DE 4 a 5 REPETIÇÕES)	PORCENTAGEM RELATIVA DE SOBREVIVÊNCIA
0	$1,920 \cdot 10^8$	100,00
51,9	$1,650 \cdot 10^8$	85,94
103,5	$1,750 \cdot 10^8$	91,14
205,9	$2,425 \cdot 10^8$	126,30
407,8	$1,925 \cdot 10^8$	100,26
800,0	$2,300 \cdot 10^8$	119,79
1540,7	$2,050 \cdot 10^8$	106,77

TABELA 2 - Análise de variância da sobrevivência de confídios da linhagem *proA1 pabaA6 yA2* frente ao cloroneb. Dados apresentados na Tabela 1.

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Total	23	$1,168 \cdot 10^{17}$		
Tratamentos	6	$1,887 \cdot 10^{16}$	$3,14500 \cdot 10^{15}$	$0,706525^{n.s.}$
Erro	22	$9,793 \cdot 10^{16}$	$4,45136 \cdot 10^{15}$	

n.s. não significativo

5.2. Obtenção de mutantes a partir da linhagem *proA1 pabaA6 yA2*.

A linhagem *proA1 pabaA6 yA2* foi inoculada por ponto em placas de meio completo contendo cloroneb nas concentrações de 51,9; 103,5; 205,9; 407,8; 300,0; 1540,7 e 2869,0 µg/ml de meio, conforme descrito no item 4.6.

Como esta linhagem é sensível ao cloroneb, seu desenvolvimento foi bastante restrito, em contraste com os setores vigorosos que se desenvolveram a partir dela. Estes setores possuíam grande quantidade de conídios amarelos semelhantes aos da linhagem selvagem quando desenvolvida em meio sem a droga (Figura 2).

A Tabela 3 mostra, para cada concentração de cloroneb, o número de colônias inoculadas, o número de setores resistentes obtidos e a respectiva frequência por colônia.

5.3. Caracterização dos mutantes resistentes

5.3.1. Toxidez do cloroneb em linhagens resistentes e sensíveis.

Após isolamento e purificação de vários setores resistentes, obtidos como descrito no item 4.6., cinco

deles foram selecionados para serem estudados no presente trabalho. Cada um deles foi selecionado de uma concentração diferente de cloroneb. Estes mutantes foram identificados como linhagens CHL-11, CHL-12, CHL-13, CHL-14 e CHL-15 e caracterizados pela curva de Dose-Resposta obtida para cada um deles.

As curvas de Dose-Resposta para as linhagens resistentes e sensíveis, utilizadas como controle, foram construídas como descrito no item 4.7. e baseada nos resultados das Tabelas 4 e 5.

Geralmente as linhagens mais sensíveis apresentam a inclinação da curva Dose-Resposta mais acentuada (TUYL 1977). Baseado neste fato, pode-se estimar a toxidez relativa causada pelo cloroneb, estabelecendo-se a dose efetiva que causa 50% de inibição no diâmetro das colônias de cada linhagem. Estes dados estão representados na Tabela 6.

FIGURA 2 - Setor resistente obtido a partir da linhagem *proA1* *pabaA6* *yA2* em meio completo contendo cloroneb (60 $\mu\text{g/ml}$ de meio).

TABELA 3 - Número e frequência de setores resistentes obtidos em várias concentrações de cloroneb. Tempo de incubação : 7 dias.

CONCENTRAÇÃO DO FUNGICIDA µg/ml	NÚMERO DE COLÔNIAS INOCULADAS	NÚMERO DE SETORES RESISTENTES OBTIDOS	SETORES/ COLÔNIA
0	30	0	0
51,9	89	13	0,146
103,5	83	16	0,193
205,9	84	17	0,202
407,8	83	11	0,132
800,0	76	17	0,224
1540,7	78	1	0,013
2869,0	76	3	0,039

TABELA 4 - Diâmetro de colônias (em milímetro) ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas.

CONCENTRAÇÃO DE CLORONEB		DIÂMETRO MÉDIO DE 5 A 6 REPETIÇÕES								
µg/ml	MSE	PPY	Ve ⁺	CHL-11	CHL-12	CHL-13	CHL-14	CHL-15		
0	54,80±2,17	40,50±2,07	27,00±3,46	16,67±1,21	21,67±1,63	26,71±3,20	27,60±2,70	8,83±0,98		
51,9	18,20±0,84	14,20±1,79	11,80±1,30	34,67±2,80	30,83±1,17	44,33±3,01	51,00±9,85	15,50±2,43		
103,5	9,17±1,17	9,83±0,98	8,83±1,72	31,00±2,83	29,83±1,17	45,33±2,73	47,83±8,86	19,80±2,49		
205,9	6,60±1,52	7,40±1,34	6,50±1,52	33,33±1,63	27,00±2,53	38,20±1,48	43,17±6,85	20,80±2,95		
407,8	5,50±1,38	6,67±0,82	5,57±1,90	31,17±2,14	25,17±1,94	23,30±3,67	43,00±2,68	17,33±1,75		
800,0	4,00±0,63	6,50±1,52	4,00±0,89	32,86±4,74	21,00±1,26	14,43±2,64	37,00±3,27	14,50±2,81		
1540,7	3,28±1,11	4,49±1,27	3,60±0,89	22,00±1,41	15,50±2,59	11,33±1,37	25,86±1,07	13,50±3,25		
2869,0	0	2,71±0,49	2,50±0,53	10,14±2,19	7,43±0,97	8,14±1,07	15,87±2,47	10,28±0,75		

TABELA 5 - Porcentagem de desenvolvimento das colônias de cada linhagem calculada a partir dos dados da Tabela 4.

CONCENTRAÇÃO DE CLORONEB		PORCENTAGEM RELATIVA							
μg/ml	MSE	ppy	Ve ⁺	CHL-11	CHL-12	CHL-13	CHL-14	CHL-15	
0	100,00	100,00	100,00	48,08	70,29	58,92	54,12	42,45	
51,9	33,21	35,06	43,70	100,00	100,00	97,79	100,00	74,52	
103,5	16,73	24,27	32,70	89,41	96,76	100,00	93,78	95,19	
205,9	12,04	18,27	24,07	96,13	87,58	84,27	84,65	100,00	
407,8	10,04	16,47	20,63	89,90	81,64	51,47	84,31	83,32	
800,0	7,30	16,05	14,81	94,78	68,11	31,83	72,55	69,71	
1540,7	5,98	10,94	13,33	63,45	50,27	24,99	50,70	64,90	
2869,0	0	6,69	9,26	29,25	24,10	17,96	31,12	49,42

FIGURA 3 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados apresentados na Tabela 5. CHL-11, CHL-12, CHL-13, CHL-14 e CHL-15 são as linhagens resistentes e MSE, ppy e Ve⁺ são sensíveis. 100% representa o desenvolvimento máximo de cada linhagem.

TABELA 6 - ED₅₀ de linhagens sensíveis e resistentes estimados a partir dos dados apresentados na Figura 3.

LINHAGENS	MSE	ppy	Ve ⁺	CHL-11	CHL-12	CHL-13	CHL-14	CHL-15
ED ₅₀ (µg/ml)	19,32	21,28	33,73	2060,63	1584,89	439,54	1584,89	2864,18

5.3.2. Relação de dominância

Para o estudo de dominância utilizou-se curvas de Dose-Resposta como descrito nos itens 4.7. e 4.8.9. Estas curvas foram traçadas com os dados da média do diâmetro das colônias após 96 horas de incubação. Estes dados e seus gráficos se encontram nas Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11 e nas Figuras 4, 5, 6, 7, e 8 respectivamente.

5.4. Análise genética dos mutantes

5.4.1. Teste de heterocário

O teste de heterocário foi realizado após cruzamento entre cada uma das linhagens resistentes e a MSE conforme descrito no item 4.8.1. e 4.8.2.

TABELA 7 - Diâmetro de colônias da linhagem CHL-11//MSE (em milímetros) comparadas com o das linhagens MSE e CHL-11, ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação : 96 horas.

CONCENTRAÇÃO DE CLORONEB $\mu\text{g/ml}$	LINHAGENS (DIÂMETRO MÉDIO DE 4 REPETIÇÕES)		
	CHL-11//MSE	CHL-11	MSE
0	$59,75 \pm 1,26$	$20,00 \pm 2,16$	$64,00 \pm 1,41$
51,9	$15,50 \pm 0,58$	$71,75 \pm 2,22$	$13,75 \pm 0,50$
103,5	$14,25 \pm 0,96$	$72,00 \pm 0,82$	$13,25 \pm 1,26$
205,9	$11,75 \pm 0,50$	$63,00 \pm 8,12$	$8,75 \pm 2,87$
407,8	$9,50 \pm 1,00$	$52,25 \pm 2,22$	$7,50 \pm 0,58$
800,0	$5,25 \pm 0,50$	$28,50 \pm 1,91$	$2,50 \pm 0,58$
1540,7	$3,75 \pm 0,50$	$19,50 \pm 0,58$	$1,00 \pm 0,82$
2369,0	$3,00 \pm 0,00$	$13,00 \pm 1,15$	0

FIGURA 4 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados apresentados na Tabela 7.

TABELA 8 - Diâmetro de colônias de linhagem CHL-12//MSE (em milímetro) comparados com o das linhagens CHL-12 e MSE ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação : 96 horas.

CONCENTRAÇÃO DE CLORONEB $\mu\text{g/ml}$	LINHAGENS (DIÂMETRO MÉDIO DE 4 REPETIÇÕES)		
	CHL-12//MSE	CHL-12	MSE
0	33,00 $\pm$ 2,64	17,25 $\pm$ 2,22	51,00 $\pm$ 0,82
51,9	9,50 $\pm$ 0,58	19,25 $\pm$ 0,96	19,25 $\pm$ 0,50
103,5	9,25 $\pm$ 0,50	27,75 $\pm$ 0,96	18,25 $\pm$ 0,50
205,9	8,50 $\pm$ 1,29	27,50 $\pm$ 0,58	15,50 $\pm$ 1,91
407,8	6,50 $\pm$ 0,58	26,25 $\pm$ 1,50	10,50 $\pm$ 1,29
800,0	6,75 $\pm$ 0,50	20,50 $\pm$ 0,58	7,00 $\pm$ 1,15
1540,7	5,00 $\pm$ 0,82	14,25 $\pm$ 1,71	6,25 $\pm$ 0,50
2869,0	4,25 $\pm$ 0,50	11,00 $\pm$ 1,15	3,50 $\pm$ 0,58

FIGURA 5 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados apresentados na Tabela 8.

TABELA 9 - Diâmetro de colônias da linhagem CHL-13//MSE (em milímetros) comparados com o das linhagens CHL-13 e MSE ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação : 96 horas.

CONCENTRAÇÃO DE CLORONEB $\mu\text{g/ml}$	LINHAGENS (DIÂMETRO MÉDIO DE 4 REPETIÇÕES)		
	CHL-13//MSE	CHL-13	MSE
0	$58,50 \pm 3,11$	$28,25 \pm 2,98$	$59,00 \pm 2,71$
51,9	$14,50 \pm 1,00$	$61,75 \pm 2,36$	$15,25 \pm 0,50$
103,5	$13,75 \pm 1,26$	$51,25 \pm 5,68$	$13,50 \pm 1,00$
205,9	$9,50 \pm 1,29$	$32,00 \pm 2,45$	$9,50 \pm 0,58$
407,8	$7,50 \pm 1,00$	$29,00 \pm 5,60$	$7,50 \pm 0,58$
800,0	$5,50 \pm 0,58$	$20,00 \pm 0,00$	$5,25 \pm 0,50$
1540,7	$4,50 \pm 1,29$	$11,00 \pm 0,00$	$3,00 \pm 0,00$
2869,0	$2,50 \pm 0,58$	$8,00 \pm 0,82$	$0,50 \pm 0,58$

FIGURA 6 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados apresentados na Tabela 9.

TABELA 10 - Diâmetro de colônias da linhagem CHL-14//MSE (em milímetro) comparados com o das linhagens CHL-14 e MSE ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação : 96 horas.

CONCENTRAÇÃO DE CLORONEB $\mu\text{g/ml}$	LINHAGENS (DIÂMETRO MÉDIO DE 4 REPETIÇÕES)		
	CHL-14//MSE	CHL-14	MSE
0	$46,50 \pm 1,29$	$25,75 \pm 2,22$	$50,00 \pm 0,00$
51,9	$16,50 \pm 0,58$	$55,50 \pm 1,29$	$17,75 \pm 2,06$
103,5	$14,25 \pm 0,50$	$47,50 \pm 2,38$	$15,75 \pm 1,71$
205,9	$11,50 \pm 0,58$	$39,50 \pm 2,38$	$11,75 \pm 0,96$
407,8	$9,00 \pm 0,82$	$33,50 \pm 1,73$	$10,00 \pm 0,00$
800,0	$7,25 \pm 0,96$	$24,00 \pm 2,94$	$3,50 \pm 1,29$
1540,7	$5,00 \pm 0,82$	$17,25 \pm 2,22$	0
2869,0	$3,75 \pm 0,50$	$10,50 \pm 1,29$	0

FIGURA 7 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados apresentados na Tabela 10.

TABELA 11 - Diâmetro de colônias da linhagem CHL-15//MSE (em milímetro) comparados com o das linhagens CHL-15 e MSE ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação : 96 horas..

CONCENTRAÇÃO DE CLORONEB $\mu\text{g/ml}$	LINHAGENS (DIÂMETRO MÉDIO DE 4 REPETIÇÕES)		
	CHL-15//MSE	CHL-15	MSE
0	40,50 $\pm$ 1,00	13,75 $\pm$ 0,50	51,75 $\pm$ 1,50
51,9	13,25 $\pm$ 2,63	18,67 $\pm$ 2,31	18,00 $\pm$ 1,00
103,5	13,25 $\pm$ 1,71	23,00 $\pm$ 1,41	16,33 $\pm$ 0,58
205,9	9,50 $\pm$ 0,58	30,00 $\pm$ 1,63	11,50 $\pm$ 1,00
407,8	7,50 $\pm$ 1,00	36,25 $\pm$ 0,96	9,50 $\pm$ 1,00
800,0	5,75 $\pm$ 0,96	32,25 $\pm$ 0,50	5,75 $\pm$ 0,50
1540,7	5,25 $\pm$ 1,26	16,50 $\pm$ 0,58	3,50 $\pm$ 0,58
2869,0	2,25 $\pm$ 0,50	12,00 $\pm$ 0,82	0

FIGURA 8 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados apresentados na Tabela 11.

Os descendentes heterocarióticos entre CHL-11 e MSE quando semeados em meio completo eram de dois tipos : colônias brancas com morfologia normal e colônias não brancas, com morfologia alterada (resistente e dependente do fungicida).

Estes descendentes, bem como as linhagens CHL-11 e MSE foram inoculadas em placas de Petri contendo meio completo e cloroneb. Após 48 horas de incubação verificou-se que somente as colônias resistentes e as colônias da linhagem CHL-11 haviam se desenvolvido. As colônias brancas, bem como a MSE não conseguiram se desenvolver. Embora os núcleos das duas linhagens tenham permanecido em citoplasma comum quando em heterocariose, não se alteraram, indicando resistência de origem nuclear.

Os resultados obtidos com as outras linhagens resistentes foi exatamente o mesmo. Portanto nenhum mutante estudado apresentou indício de resistência de origem citoplasmática.

5.4.2. Determinação do número de *loci* envolvidos na resistência.

O número de *loci* envolvidos na resistência de cada uma das linhagens mutantes foi determinado através dos resultados da segregação meiótica como descrito no item 4.

8.3.

Os ascósporos provenientes do cruzamento de cada linhagem resistente com a linhagem MSE foram classificados em dois grupos: sensíveis e resistentes. Os resultados da segregação meiótica estão sumarizados na Tabela 12. Estes dados foram analisados estatisticamente pelo teste χ^2 , ensaiado sempre para a proporção 1:1. Em todos os casos a diferença numérica entre os dois grupos não se mostrou significativa, indicando um padrão de herança Mendeliana simples.

Os genes responsáveis pela resistência das linhagens CHL-11, CHL-12, CHL-13, CHL-14 e CHL-15, passaram a ser denominados *Ch111*, *Ch112*, *Ch113*, *Ch114* e *Ch115*, respectivamente.

5.4.3. Localização das mutações nos grupos de ligação

O gene responsável pela resistência, em cada linhagem, foi localizado em seu grupo de ligação através do estudo dos segregantes haplóides obtidos de diplóide heterozigoto entre cada mutante e a linhagem MSE, conforme descrito no item 4.8.5.

A análise mitótica dos segregantes haplóides obtidos após cruzamento entre as linhagens CHL-12, CHL-13, CHL-14 e CHL-15 com a linhagem MSE, foram agrupados numa única tabela, pois os dados isoladamente indicavam o grupo de ligação III como o portador da mutação (Tabela 13). A análi

TABELA 12 - Segregação meiótica de cruzamentos das linhagens resistentes com a linhagem MSE.

CRUZAMENTOS	SEGREGANTES		TOTAL	χ^2	SIGNIFICÂNCIA
	SENSÍVEIS	RESISTENTES			
CHL-11 X MSE	173	152	325	1,357	n.s.
CHL-12 X MSE	1200	1211	2411	0,050	n.s.
CHL-13 X MSE	297	293	590	0,027	n.s.
CHL-14 X MSE	220	203	423	0,683	n.s.
CHL-15 X MSE	382	410	792	0,986	n.s.

χ^2 - Ensaio para segregação 1:1

n.s. - Não significativo

se mitótica dos segregantes haplóides do cruzamento entre CHL-11 X MSE não estão incluídos na Tabela 13 pela particularidade de seus resultados. De quatro cruzamentos realizados entre estas duas linhagens todos os segregantes se mostraram sensíveis ao cloroneb e não apresentaram evidências de localização em um grupo de ligação definido.

5.4.4. Mapeamento dos *loci* mutantes nos grupos de ligação.

O mapeamento dos *loci* que conferem resistência ao cloroneb foi estabelecido através da análise meiótica conforme descrito no item 4.8.6.

Os resultados da ligação genética entre o marcador *chl* de cada linhagem resistente e o marcador *gal* , presente no grupo de ligação III, se encontram sumarizados na Tabela 14.

Como não ficou determinado o grupo de ligação responsável pela resistência na linhagem CHL-11, foi sumarizado na Tabela 15 os valores da ligação entre o marcador CHL-11 e todos os marcadores de ambas as linhagens.

5.4.5. Alelismo

Para verificar se os genes da resistência

TABELA 13 - Análise mitótica dos segregantes haplóides de CHL-12//MSE, CHL-13//MSE, CHL-14//MSE e CHL-15//MSE.

GRUPOS DE LIGAÇÃO	MARCADORES	CHL-12		CHL-13		CHL-14		CHL-15	
		R	S	R	S	R	S	R	S
I	<i>pro⁺ paba⁺</i>	1	8	2	14	3	15	0	7
	<i>pro paba</i>	2	4	1	7	1	5	0	11
II	<i>w</i>	0	0	0	1	0	0	0	3
	<i>w⁺</i>	3	12	3	20	4	20	0	15*
III	<i>gal⁺</i>	3	1	3	0	4	1	0	0
	<i>gal</i>	0	11	0	21	0	19	0	18
IV	<i>pyro⁺</i>	1	5	1	8	4	11	0	7
	<i>pyro</i>	2	7	2	13	0	9	0	11
V	<i>fac⁺</i>	2	7	3	13	3	9	0	15
	<i>fac</i>	1	5	0	8	1	11	0	3
VI	<i>s⁺</i>	1	3	2	13	1	8	0	9
	<i>s</i>	2	9	1	8	3	12	0	9
VII	<i>nic⁺</i>	1	5	2	16	1	7	0	11
	<i>nic</i>	2	7	1	5	3	13	0	7
VIII	<i>ribo⁺</i>	2	4	3	13	2	6	0	13
	<i>ribo</i>	1	8	0	8	2	14	0	5

Gene para resistência localizado no grupo de ligação III

* Em virtude do diplóide ser amarelo, houve seleção visual de setores brancos em detrimento dos amarelos.

TABELA 14 - Análise meiótica dos mutantes resistentes

CRUZAMENTO	GRUPO DE LIGAÇÃO	MARCADOR GENÉTICO	NÚMERO DE ASCÓSPOROS ANALISADOS	LIGAÇÃO GENÉTICA (%)	S (%)
CHL-11 X MSE	III	<i>gal</i>	169	55,50	3,67
CHL-12 X MSE	III	<i>gal</i>	152	30,92	3,75
CHL-13 X MSE	III	<i>gal</i>	148	30,40	3,78
CHL-14 X MSE	III	<i>gal</i>	127	33,07	4,17
CHL-15 X MSE	III	<i>gal</i>	327	30,68	2,55

TABELA 15 - Análise meiótica do mutante CHL-11

MARCADORES	SEGREGANTES		TIPOS		C	S(%)
	SENSÍVEIS	RESISTENTES	P	R		
<i>pro</i> ⁺	59	36	84	85	50,29	3,85
<i>pro</i>	49	25				
<i>paba</i> ⁺	65	32	94	75	44,38	3,82
<i>paba</i>	43	29				
<i>w</i> ⁺	54	38	92	77	45,56	3,83
<i>w</i>	54	23				
<i>gal</i> ⁺	39	40	109	60	35,50	3,67
<i>gal</i>	69	21				
<i>pyro</i> ⁺	62	36	82	87	51,48	3,84
<i>pyro</i>	46	25				
<i>fac</i> ⁺	54	40	94	75	44,38	3,82
<i>fac</i>	54	21				
<i>s</i> ⁺	68	30	70	99	58,58	3,79
<i>s</i>	40	31				
<i>nic</i> ⁺	55	38	91	78	46,15	3,83
<i>nic</i>	53	23				
<i>ribo</i> ⁺	71	38	75	94	55,62	3,82
<i>ribo</i>	37	23				

P = Paternais; R = Recombinantes; C = Valor da ligação.

mapeados no grupo de ligação III, eram ou não alelos, utilizou-se o teste de alelismo conforme procedimento descrito no item 4.8.7. Com esta finalidade vários cruzamentos foram realizados todos envolvendo segregantes meiôticos resistentes ao cloroneb:

- a. Segregante A de CHL-11 X MSE (*pabaA1*, *sB3*, *yA2*) X segregante A de CHL-13 X MSE (*riboB2*, *wA3*).
- b. Segregante A de CHL-14 X MSE (*proA1*, *pabaA6*, *galA1*, *lacA303* *sB3*, *riboB2* e *wA3*) X segregante B de CHL-13 X MSE (*nicB8*, *yA2*).
- c. Segregante A de CHL-12 X MSE (*pyroA4*, *riboB2*, *wA3*) X segregante B de CHL-11 X MSE (*nicB8*, *yA2*).

Analizou-se, com relação a resistência, 137 ascósporos do cruzamento descrito no item a, 88 do cruzamento descrito no item b e 122 do cruzamento descrito no item c, todos provenientes de cleistotécios híbridos. No total foram analisados 347 ascósporos sendo que todos apresentavam, resistência ao cloroneb, indicando alelismo ou ligação muito estreita entre os genes *chl11*, *chl12*, *chl13* e *chl14*.

5.4.6. Posição do marcador em relação ao centrômero

A posição do gene para resistência ao cloro

neb em relação ao centrômero foi determinada pela análise de recombinação mitótica como descrito no item 4.8.8.-

Doze dos diplóides segregantes isolados, provenientes do diplóide CHL-13//MSE, apresentavam resistência ao cloroneb, portando então genótipos homozigotos recessivo para a resistência, já que o caráter resistência mostrou ser recessivo, conforme apresentado na Figura 6. Todos esses diplóides foram capazes de crescer em galactose como única fonte de carbono.

Após haploidização destes segregantes 36 setores haplóides foram ensaiados em relação ao marcador *gal*, que se encontra no mesmo grupo de ligação de *chl*. Vinte e seis destes haplóides foram *gal*⁺ e dez *gal* (Tabela 16).

Estes resultados evidenciam uma posição distal em relação ao centrômero, isto é o marcador *gal* situado entre o centrômero e o marcador *chl*.

TABELA 16 - Genótipo dos segregantes haplóides obtidos por haploidização de diplóides originados por recombinação mitótica de um diplóide heterozigoto para os marcadores *gal* e *chl*.

DIPLÓIDES ISOLADOS	HAPLÓIDES OBTIDOS	GENÓTIPO DOS HAPLÓIDES	
		<i>gal</i> ⁺	<i>gal</i>
1	1	0	1
2	2	2	0
3	4	4	0
4	3	2	1
5	4	3	1
6	3	3	0
7	3	3	0
8	4	4	0
9	1	0	1
10	5	3	2
11	1	1	0
12	5	1	4
		26	10

5.5. Reversões

Três linhagens revertentes, obtidas das linhagens CHL-13, CHL-14 e CHL-15, conforme descrito no item 4.9.1, foram analisadas em relação as suas estabilidades como descrito no item 4.9.2.

A linhagem CHL-13 (Rv) foi inoculada no centro de nove placas contendo meio completo e em todas elas surgiram setores amarelos e marrons como mostra a Figura 9 B, indicando instabilidade da linhagem. Devido a este fato ela não foi analisada geneticamente. A frequência de reversão desta linhagem foi de 0,053 setores revertentes por colônia inoculada.

CHL-14 (Rv) e CHL-15 (Rv) mostraram-se estáveis e com desenvolvimento homogêneo em todas as placas (Figura 9A).

Na análise da natureza das reversões das linhagens estáveis, CHL-14 (Rv) evidenciou-se como uma reversão verdadeira, pois todos os 179 segregantes meióticos provenientes de cleistotécios híbridos do cruzamento CHL-14 (Rv) X MSE eram sensíveis ao cloroneb. Os segregantes meióticos, provenientes de cleistotécios híbridos, do cruzamento CHL-15(Rv) X MSE eram de dois tipos: sensíveis e resistentes ao cloroneb. Dos 169 ascósporos analisados 117 eram sensíveis e 52 resistentes, o que não desvia significativamente da proporção 3:1,

quando aplicado o χ^2 . Isto indica a presença de um gene supressor que impede a manifestação do gene *chl* na linhagem CHL-15 (Rv).

FIGURA 9 - Linhagens revertentes inoculadas em placas de Petri contendo meio completo.

A. Linhagem CHL-14(Rv) mostrando estabilidade.

B. Linhagem CHL-13(Rv) mostrando instabilidade.

6. DISCUSSÃO

6.1. Sobrevivência ao cloroneb

Quando confídios da linhagem *proA1 pabaA6 yA2* foram semeados em meio completo contendo diferentes concentrações de cloroneb (Tabelas 1 e 2), não houve diferença significativa no número de sobreviventes encontrado nas várias concentrações ensaiadas, mas o desenvolvimento das colônias foi mais restrito quanto maior a concentração do agente inibidor no meio. Isto sugere que até cerca de 1540 µg de cloroneb por ml de meio de cultura, este inibidor se comporta como fungistático para esta linhagem. Este efeito do cloroneb já havia sido verificado por DARRAG e SINCLAIR (1969) em estudos realizados com *Rhizoctonia solani*. THRELFALL (1968) também verificou em *Aspergillus nidulans* ação fungistática de TCNB e PCNB, que são como o cloroneb, hidrocarbonetos aromáticos. GEORGOPOULOS e ZARACOVITIS (1967) já haviam anteriormente sugerido uma ação fungistática para todos os componen-

tes deste grupo.

Por outro lado, *AZEVEDO et alii* (1977) estudando a sobrevivência frente ao cloroneb, da linhagem *biAl*, *methGl* de *Aspergillus nidulans*, verificaram um efeito inibitório mais acentuado deste agente, sendo que menos de 1% dos conídios inoculados formaram colônias na concentração de 500 µg de cloroneb por ml de meio de cultura. Uma explicação para estes resultados divergentes pode ser devido as diferenças existentes entre as linhagens utilizadas, podendo haver uma interação entre os diferentes marcadores genéticos em uma delas. Este é o caso por exemplo do efeito pleiotrópico herdável verificado em linhagens de *Aspergillus nidulans* resistentes ao PCNB que apresentam simultaneamente alterações na síntese de componentes da parede celular (*THRELFALL* 1972). Uma outra hipótese seriam as possíveis diferenças existentes entre os dois estoques de fungicidas utilizados.

Quanto a redução do diâmetro das colônias, na presença de cloroneb, esta pode ser comparada com o efeito produzido por certos detergentes aniônicos, como o dodecil sulfato de sódio ou o deoxicolato de sódio, que restringem o crescimento radial dos fungos sem afetar aparentemente a viabilidade ou a diferenciação dos mesmos (*MACKINTOSH e PRITCHARD* 1963). Estes autores utilizaram-se das técnicas da réplica com veludo (*LEDERBERG e LEDERBERG* 1952) normalmente empregada para bactérias e aplicaram-na em fungos filamentosos. Para isto algumas modificações foram introduzidas, entre

elas a compactação das colônias por estas substâncias , e o veludo umidecido para a transferência de um grande número de colônias preservando suas individualidades. *DORN* e *RIVERA* , (1966) utilizaram-se destas substâncias para obtenção de microcolônias de *Aspergillus nidulans* em meio líquido. O objetivo foi estudar a cinética do crescimento do fungo através de colônias individuais e sincronizadas.

A utilização do cloroneb para ensaios desta natureza, embora pareça ser viável, requer estudos complementares principalmente quanto ao seu modo de ação.

6.2. Obtenção e caracterização de mutantes

Os mutantes resistentes ao cloroneb foram obtidos conforme descrito nos itens 4.6 e 5.2 , isto é, por setores resistentes que se desenvolvem a partir de linhagens sensíveis (Figura 2). Esta técnica foi escolhida porque o cloroneb, apresentando ação fungistática, impedia que um grande número de conídios sensíveis fosse semeado por placa. Quando a técnica da semeadura foi utilizada, verificou-se que o pequeno desenvolvimento de cada conídio dificultava ou impossibilitava a visualização dos resistentes.

A Tabela 3 apresenta a frequência de setores resistentes obtidos por colônia, nas várias concentrações de cloroneb ensaiadas. Este resultado indica que até

cerca de 800 µg de cloroneb por ml de meio de cultura, a frequência de setores resistentes é semelhante, diminuindo com doses superiores. Isto poderia sugerir que existem concentrações do fungicida que propiciam o aparecimento de setores resistentes. Mas ao aumentarmos a concentração do cloroneb o desenvolvimento das colônias se torna mais restrito possivelmente devido a um menor número de divisões celulares, diminuindo portanto a possibilidade de haver mutações. Realmente um possível modo de ação do cloroneb em *Ustilago maydis* é a inibição da divisão celular, impedindo a duplicação dos esporos (TILLMAN e SISLER 1973).

TUYL (1977) obteve espontaneamente cerca de 11 mutantes resistentes ao cloroneb em 10^7 conídios. Esta frequência aumentava mais de 10 vezes quando os conídios sensíveis eram submetidos a luz Ultra-Violeta e mais de 100 vezes quando sofriam ação do nitrosoguanidina. Portanto a frequência de emergência de resistentes pode variar amplamente dependendo do fungicida, do fungo, de agentes mutagênicos utilizados e mesmo com as condições experimentais (DEKKER 1976), sendo praticamente impossível comparar os resultados de frequência de mutantes obtidos por duas técnicas diferentes, como é este caso. O comportamento dos mutantes resistentes frente ao cloroneb, foi caracterizado pela curva de Dose-Resposta obtida para cada um deles e comparada com as respectivas curvas de linhagens sensíveis como a MSE, *proA1*

pabaA6 yA2 e Ve^+ (Figura 3).

Estas curvas foram construídas levando-se em conta o diâmetro das colônias das diferentes linhagens, em várias concentrações do cloroneb (Tabelas 4 e 5) e caracterizaram as cinco linhagens resistentes como parcialmente dependentes do fungicida.

A dependência de agentes inibidores, apresentada por linhagens resistentes, já foi descrita em vários organismos, inclusive o *Aspergillus nidulans*. Este fenômeno adquire uma importância maior quando se trata de bactérias que se tornam dependentes de certos antibióticos, como a estreptomicina (ALEXANDER e LEIDY 1947; MILLER e BONHOFF 1947; YEGIAN e BUDD 1948). Em *Neurospora crassa* foi descrita uma linhagem resistente e dependente da sulfonamida (EMERSON, 1947) e em *Penicillium chrysogenum* um dependente de acenafte no (CURTIS et alii 1961) sugerindo que em ambos os fungos estas drogas são utilizadas como metabólito (AZEVEDO et alii 1977). Mutantes de *Phytophthora infestans* mostraram-se simultaneamente resistentes e dependentes de estreptomicina (SHATTOCK e SHAW 1975).

Linhagens de *Sclerotium rolfsii*, resistentes ao PCNB, não se desenvolvem bem se uma certa quantidade deste inibidor não é adicionado ao meio (GEORGIOPOULOS 1964). Em culturas líquidas a quantidade de micélio produzido pela linhagem resistente na presença de PCNB excede não somente

o crescimento da mesma linhagem no controle, mas também a produção de micélio pela respectiva linhagem sensível desenvolvida sem o inibidor. Observou-se também que quando a linhagem torna-se novamente sensível, o requerimento parcial da droga desaparece. (GEORGOPOULOS e ZARACOVITIS 1967), o que também foi verificado no presente trabalho.

Mutantes de *Aspergillus niger* e *Penicillium expansum*, resistentes ao cloroneb, esporulam muito pouco em meio completo sem o inibidor (TUYL 1977), requerendo o fungicida para uma completa esporulação. Este mesmo autor não encontrou menor esporulação em linhagens de *Aspergillus nidulans* resistentes ao cloroneb, quando em meio sem o mesmo.

Isto contraria a dependência parcial do fungicida pelo *Aspergillus nidulans*, encontrada no presente trabalho e também nos trabalhos de THRELFALL (1968) para o PCNB e de AZEVEDO *et alii* (1977) para o cloroneb. Estes últimos autores sugerem inclusive que esta dependência possa ser utilizada como um bom método de seleção de mutações diretas e reversas.

A toxidez relativa causada pelo cloroneb nas várias linhagens pode também ser estimada através de curvas de Dose-Resposta, pois, quanto mais sensível for a linhagem mais brusca será a inclinação da curva (TUYL 1977).

Um modo de estimar esta inclinação é através do ED₅₀, dose efetiva que causa 50% de inibição no diâmetro

das colônias (Tabela 6). O ED₅₀ para as linhagens sensíveis, variou de 19 a 33 µg de cloroneb por ml de cultura, enquanto que o das linhagens resistentes foram sempre acima de 1500 µg por ml, o que é bastante semelhante aos resultados obtidos por TUYL (1977) para a resistência ao cloroneb em *Aspergillus nidulans*. A linhagem CHL-13 apresentou ED₅₀ próximo de 440 µg por ml, o que difere dos resultados anteriores, evidenciando uma menor dependência ou uma maior toxidez do fungicida para esta linhagem.

Um outro modo de caracterização das linhagens resistentes foi através da relação de dominância. Para este estudo utilizou-se também curvas de Dose-Resposta comparando-se agora as curvas apresentadas pelos diplóides heterozigotos para a resistência ao cloroneb e as duas linhagens haplóides que lhes deram origem (uma sensível outra resistente). Os resultados para as várias linhagens se encontram nas Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11 e nas Figuras 4, 5, 6, 7, e 8.

Embora o perfil das curvas apresentadas pelos diferentes heterozigotos não fosse exatamente o mesmo, ficou evidente que eles se comportam como a linhagem haplóide sensível (MSE), indicando que o gene para a resistência ao cloroneb (*chl*) é recessivo em todas as linhagens. Além disto estes diplóides não mostraram dependência do fungicida, pois os mesmos esporulam normalmente em meio mínimo.

Mutações para resistência em *Aspergillus ni*

dulans com caráter recessivo já se encontram descritas na literatura, como por exemplo para acriflavina (ROPER e KÄFER 1957), para *p*-fluorofenilalanina, teoquil ou verde malaquita (WARR e ROPER 1965) para cloronitrobenzeno (THRELFALL 1968) e para benlate (HASTIE e GEORGOPOULOS 1971).

Com relação a resistência ao cloroneb em *Aspergillus nidulans*, AZEVEDO *et alii* (1977) concluíram que este caráter era semi dominante e TUYL (1977) verificou que o grau de dominância diminuía com o aumento da concentração do fungicida, concluindo que as mutações para resistência ao cloroneb tinham praticamente condição recessiva.

6.3. Análise Genética

Após o resultado do teste do heterocário, descrito no item 5.4.1., indicando que a resistência ao cloroneb tinha origem nuclear, verificou-se que um único *locus* é responsável por esta resistência em todas as linhagens ensaiadas (Tabela 12). Um único *locus* para resistência ao cloroneb também foi caracterizado em outras linhagens de *Aspergillus nidulans* (AZEVEDO *et alii* 1977, TUYL 1977).

Os genes *chl12*, *chl13*, *chl14*, *chl15* foram localizados, através de análise mitótica, no grupo de ligação III de suas respectivas linhagens, conforme apresentado na Tabela 13. Embora todos os segregantes analisados do cruzamento

CHL-15 com MSE fossem sensíveis ao cloroneb, nenhum deles conseguiu se desenvolver em meio com galactose como única fonte de carbono, indicando ligação entre os marcadores *galA1* e *chl15*, o que sugere que estes genes estão localizados no mesmo cromossomo. Os resultados obtidos no presente trabalho são concordantes com os de *THRELFALL* (1968) para resistência aos cloronitrobenzeno e os de *TUYL* (1977) para resistência ao cloroneb.

Estes resultados são discordantes daqueles obtidos por *AZEVEDO et alii* (1977), com outra linhagem de *Aspergillus nidulans*, que localizaram o gene para resistência cloroneb no grupo de ligação IV, sem ligação genética com o marcador ensaiado (*pyroA4*).

Em quatro cruzamentos realizados entre CHL-11 e MSE não foram obtidos segregantes resistentes, e os sensíveis não apresentaram este caráter associado a qualquer marcador genético analisado. Não foi possível portanto localizar o gene *chl11* da linhagem CHL-11 em qualquer dos grupos de ligação.

Uma outra característica desta linhagem, é o fato dela produzir setores em meio completo contendo cloroneb, sendo portanto uma linhagem que apresenta instabilidade durante as divisões mitóticas. O fenômeno da instabilidade, em *Aspergillus nidulans* ocorre em linhagens que apresentam aberrações cromossômicas, como os aneuplóides (*KÄFER* 1961) ou

mesmo diplóides, que também se constituem em aberrações numéricas neste fungo que é normalmente haplóide (*PONTECORVO et alii*, 1953b). Casos de herança citoplasmática (*JINKS* 1963) também são responsáveis por instabilidade não somente em *Aspergillus nidulans* como em outros fungos.

O tipo de instabilidade que ocorre nesta linhagem se assemelha, pelo menos ao nível de observação, ao que ocorre em linhagens que apresentam duplicações cromossômicas. *BAINBRIDGE* e *ROPER* (1966) foram os primeiros a observar esse tipo de instabilidade em *Aspergillus nidulans*, o que foi mais tarde confirmado e melhor estudado por *NGA* e *ROPER* (1968) e *AZEVEDO* e *ROPER* (1970). Essa instabilidade, que é característica de linhagens com duplicação cromossômica em *Aspergillus nidulans*, ocorre devido a deleções do material em duplicata e também devido a novas duplicações em tandem nas regiões envolvidas na duplicação. Assim um excesso de material genético poderia ser uma explicação para a instabilidade verificada na linhagem CHL-11. Um outro argumento que suporta esta hipótese é que este tipo de linhagem, com excesso de material genético, leva desvantagem em meio contendo pFA para haploidização, produzindo segregantes que não apresentam material extra, conforme observaram *AZEVEDO* e *ROPER* (1970). Pode-se supor então, que o gene *chl11* esteja localizado numa região cromossômica com material genético em excesso, possivelmente uma duplicação, localizada no grupo

de ligação III. Quando em meio contendo pFA somente segregantes sensíveis, e portanto não duplicados, são recuperados. No entanto, somente um estudo detalhado dos setores emergentes desta linhagem é que poderia fornecer evidências para a comprovação ou não desta hipótese.

Pela análise meiótica das cinco linhagens resistentes, o único marcador analisado que apresentou uma fraca ligação com o marcador *chl*, foi o *galA1*, com uma distância média de 32 unidades de recombinação entre eles (Tabela 14).

O marcador *chl11*, que não foi localizado por análise mitótica, apresentou uma fraca ligação genética com o marcador *galA1* e nenhuma ligação com os marcadores dos outros grupos de ligação (Tabela 15).

O ensaio de alelismo foi conduzido com o objetivo de se definir qual o número de *loci* responsável pela resistência ao cloroneb. Os genes *chl11*, *chl12*, *chl13* e *chl14* são alelos ou apresentam forte ligação, evidenciando um único locus para a resistência ao cloroneb. A posição mais precisa deste *locus*, determinada através da técnica de recombinação mitótica (PONTECORVO 1954 e PONTECORVO e KÄFER 1956, 1958), é distal ao marcador *galA1*. Linhagens diplóides que carregam alelo para resistência em condição heterozigota, daria por segregação vegetativa, tipos resistentes haplóides e diplóides homozigotos, que são preferencialmente selecionados em meio com clo

roneb. O uso desta técnica para seleção automática de segregantes vegetativos fornece um instrumento adicional para análise através do ciclo parassexual.

Sendo a recombinação mitótica um fenômeno bastante raro, supõe-se que apenas uma permuta mitótica tenha ocorrido na segregação dos diplóides. Se *chl* estivesse na posição proximal em relação ao centrômero, todos os segregantes haplóides resistentes conseguiram sobreviver em meio contendo galactose como única fonte de carbono. Caso *chl* estivesse na posição distal, os segregantes haplóides seriam de dois tipos quanto a utilização da galactose (gal^+ ou gal). Os resultados obtidos e apresentados na Tabela 16 evidenciam este último caso, isto é, o marcador *galA1* está situado entre o centrômero e o marcador *chl*.

Comparando estes resultados com a localização de genes para resistência ao cloronitrobenzeno descritos no grupo de ligação III, verificamos que *THRELFALL* (1968) localizou dois *loci* como responsáveis por esta resistência. *TUYL* (1977) obteve um único gene para resistência ao cloroneb *chlA*, sugerindo um alelismo entre este gene e o *pcbA*, um dos dois *loci* mapeados por *THRELFALL* (1968). A localização deste *locus* está representada na Figura 10 conforme os dados de ambos os autores.

FIGURA 10 - Mapa genético parcial do grupo de ligação III do *Aspergillus nidulans* segundo *THRELFALL*^{*} (1968) e *TUYL*^{**} (1977). Os marcadores genéticos não estão representados em escala. 0 = centrômero.

O outro *locus* para resistência ao cloronitrobenzeno, detectado por *THRELFALL* (1968), se encontra próximo do primeiro e entre os marcadores *methH* e *galA1* conforme resultado do cruzamento de três pontos realizados por este autor. Embora este *locus* não tenha uma localização mais definida, ele poderia ser alelo ao encontrado no presente trabalho. A confirmação desta hipótese poderia ocorrer por ensaios de alelismo entre linhagens portadoras dos genes *tenb1* e o *chl*, e pelo estudo da ligação genética entre estes marcadores e outros existentes nas proximidades, como por exemplo *argB* ou *methH*.

Se confirmada a existência de dois *loci*, não

está correta a sugestão de *TUYL* (1977) de que um único fator genético seja responsável pela resistência aos hidrocarbonetos aromáticos em *Aspergillus nidulans*, o que já foi contrariado também por *AZEVEDO et alii* (1977) com a localização de um outro *locus* responsável pela resistência ao cloroneb no grupo de ligação IV.

6.4. Reversões

Das linhagens revertentes, obtidas conforme descrito no item 4.9.1., uma mostrou-se instável e duas mostraram-se estáveis quando em meio completo sem o cloroneb (Figura 9).

A linhagem instável CHL-13(Rv) não foi analisada geneticamente, pela complexidade inerente das instabilidades, mas as causas de algumas linhagens apresentarem esta particularidade já foram discutidas no item 6.3. Nesse item foi sugerido que a instabilidade da linhagem CHL-1 tenha sido causado por material genético em excesso, possivelmente, uma duplicação cromossômica. A mesma explicação pode ser utilizada para a instabilidade da linhagem CHL-13Rv, sendo que a reversão pode ter surgido simultaneamente com a duplicação cromossômica ou mesmo ter se originado dela.

A reversão da linhagem CHL-14 (estável) foi caracterizada como reversão verdadeira, isto é, o gene que

foi mutado para a resistência ao cloroneb é o mesmo que sofreu mutação tornando a linhagem sensível. A reversão da linhagem CHL-15, também estável, foi determinada por um *locus* supressor do marcador *chl*-15, ainda não mapeado.

O fenômeno da supressão gênica é amplamente conhecido nos mais diversos organismos, e principalmente em microrganismos. *Loci* supressores em mutantes auxotróficos de *Aspergillus nidulans* são frequentemente descritos, por exemplo, para a reversão dos marcadores metionina (SIDDIQI 1962, LILLY 1965, GAJEWSKI e LITWINSKA 1968, AYLING 1969, PUTRAMENT *et alii* 1970 e PASZEWSKI e GRABSKI 1973), ácido nicotínico (MIRANDA FILHO e AZEVEDO 1974), ácido para aminobenzóico (PONTECORVO 1963) entre outros.

Os *loci* supressores de mutantes morfológicos em *Aspergillus nidulans* são relativamente pouco explorados. AZEVEDO (1971) estudando linhagens deterioradas, detectou um setor melhorado de coloração verde. Através de análise genética mostrou ter havido uma translocação não recíproca, ocasionando uma deleção num dos grupos de ligação que originou a supressão parcial do determinante de deterioração. Estes resultados foram confirmados por MENEZES e AZEVEDO (1978) verificando, que a maioria das reversões analisadas era devido a genes supressores nas linhagens deterioradas.

Poucas supressões foram descritas como responsáveis por reversões em mutantes resistentes. APIRION ,

(1965) isolou linhagens de *Aspergillus nidulans* incapazes de sobreviverem em meio contendo acetato como única fonte de carbono e simultaneamente resistentes ao fluoro-acetato. No estudo das reversões destas linhagens, algumas delas reverteram simultaneamente para ambos os marcadores, tornando-se capazes de se desenvolverem em meio contendo acetato como única fonte de carbono e sensíveis ao fluoro-acetato. Dois destes mutantes revertentes eram devido a mutação num *locus* supressor. Supressão de "sensibilidade" foi descrita por OLIVEIRA (1978) que obteve nove diferentes *loci* supressores, em 15 reversões analisadas, como responsáveis pela resistência a arginina em linhagens *lis⁺* de *Aspergillus nidulans*. A autora verificou também a possibilidade da utilização deste sistema para a detecção da potencialidade de mutagênicos químicos e físicos.

A frequência de reversão, descrita no item 5.5., foi estimada com o objetivo de verificar se este sistema de mutação direta e reversa pode ser também utilizado em ensaios da potencialidade de mutagênicos físicos e químicos. Esta frequência foi de aproximadamente a metade do valor médio obtido para mutações diretas (sensível para resistente) apresentada na Tabela 3, o que não descarta a possibilidade de sua utilização.

Métodos de seleção de mutações diretas e reversas são frequentemente descritos em *Aspergillus nidulans*.

MORPURGO (1962) descreveu um sistema que envolveu a produção de mutantes resistentes a *p*-fluorofenilalanina parcialmente defectivos na síntese de tirosina. Os mutantes reversos eram selecionados em meio contendo aminotirosina e ácido fenilantranílico que aumentam a necessidade de tirosina destas linhagens, inibindo-as completamente. Este sistema foi utilizado com sucesso por CALVORI e MORPURGO (1966) e SINHA (1967).

Entre os sistemas de mutação direta e reversa utilizados para detectar mutagênicos, o mais utilizado é o da reversão do gene *methG*¹. Este sistema foi desenvolvido por SIDDIQI (1962) e LILLY (1965) e utilizado por muitos outros autores (ALDERSON e CLARK 1966; ALDERSON e SCAZZOCCHIO 1967; GAJEWSKI e LITWINSKA 1968; AYLING 1969; PUTRAMENT *et alii* 1970; KLINCZUK 1970; SCOTT *et alii* 1973; PASZEWSKI e GRABSKI 1973).

Outro sistema descrito baseia-se na mudança da pigmentação conidial em meio contendo 2-tioxantina. Geralmente neste meio os conídios do *Aspergillus nidulans* são amarelos, salvo os possíveis mutantes que permanecem verde pela falta da enzima xantina desidrogenase. Os revertentes são selecionados no mesmo meio por seleção visual de conídios amarelos. (DARLINGTON e SCAZZOCCHIO 1967; ALDERSON e SCAZZOCCHIO 1967; ALDERSON e HARTLEY 1969).

Outros métodos de seleção de mutações diretas e reversas em *Aspergillus nidulans* se encontram descriti

tos nas revisões de *ROPER*(1971), *CLUTTERBUCK* (1974) e *LEGATOR* (1976).

O presente sistema, para ser acrescentado estes, deverá ser ensaiado inicialmente com agentes físicos e químicos já bem caracterizados quanto a mutagenicidade.

7. CONCLUSÕES

a) O fungicida cloroneb comporta-se como fungistático, inibindo parcialmente o desenvolvimento das colônias, sem afetar a viabilidade. Em vista deste fato foi sugerido a utilização deste fungicida para a compactação de colônias de fungos como vem sendo feito com o deoxicolato de sódio.

b) A frequência de obtenção de mutantes resistentes, por formação de setores, não pareceu ser afetada pela concentração do agente inibidor e em todas as linhagens ensaiadas a resistência ao cloroneb era devida a uma única mutação que comportava-se como recessiva quando em diplóides heterozigotos. O *locus* responsável pela resistência foi mapeado no grupo de ligação III a uma distância média de 32 unidades de recombinação do marcador *galA1*.

c) Os cinco mutantes resistentes ao cloroneb estudados no presente trabalho, são parcialmente dependentes do fungicida, possibilitando o isolamento de mutações dire

tas e reversas. Foi sugerida a utilização deste sistema na detecção da potencialidade de agentes mutagênicos.

d) Das três reversões obtidas, uma foi caracterizada como reversão verdadeira, outra como supressão, e a terceira não foi caracterizada por mostrar-se bastante instável, sugerindo-se a possibilidade desta instabilidade ser devida a duplicação cromossômica.

8. SUMMARY

The objective of this research was to characterize and genetically analyze *Aspergillus nidulans* mutants which are resistant to the fungicide chloroneb (1,4-dichloro-2,5-dimethoxybenzene). These mutants were obtained from the *proA1 pabaA6 yA2* strain by means of the sectors which emerge from sensitive strains in the presence of the inhibitor, and characterized by the respective dose-response curves.

The revertants were studied with the objective of developing an indicator system for mutagenic substances through forward and reverse mutation.

On the basis of the present results, we may conclude that chloroneb behaves as a fungistatic agent by inhibiting the development of sensitive strains without affecting their viability. The possibility is discussed of utilizing this fungicide for compacting fungi colonies, as already done with sodium deoxicholate.

Genetic analysis indicated that a single mu

tation in linkage group III is responsible for resistance to chloroneb. The mutation always behaved as a recessive trait in heterozygous diploids. The mutants are partially chloroneb dependent, which makes it possible to isolate forward and reverse mutations. Of the reversions obtained, one was characterized as a true reversion, one as a suppression, while a third one was not characterized due to instability. The possibility that this instability is due to a chromosome aberration is discussed.

9. LITERATURA CITADA

ALDERSON, T. e A.M.CLARK, 1966. Interlocus specificity for chemical mutagens in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London 210:593-595.

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.SCAZZOCCHIO, 1967. A system for the study of interlocus specificity for both forward and reverse mutation in at least eight gene loci in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 5:567-577.

ALEXANDER, H.D. e G.LEIDY, 1947. Mode of action of streptomycin on type b *H.influenzae*. I. Origin of resistant organisms. *Journal Experimental Medicine*, 85:329-338.

APIRION, D., 1962. A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice versa in micro-orga-

nisms. *Nature*, London, 195:959-961.

APIRION, D., 1965. The two-way selection of mutants and revertants in respect of acetate utilization and resistance to fluoroacetate in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research* 6:317-329.

ARMITT, S.; W. McCULLOUGH e C.F. ROBERTS, 1976. Analysis of acetate non-utilizing (*acu*) mutants in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 92(2):262-282.

ARST, H.N. e D.J. COVE, 1969. Methylammonium resistance in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 98:1284-1293.

ASHIDA, J., 1965. Adaptation of fungi to metal toxicants. *Annual Review of Phytopathology*, 3:153-174.

AYLING, P.D., 1969. Methionine suppressors in *Aspergillus nidulans*: their genetics and behaviour in heterocaryous and diploids. *Genetical Research*, 14:275-289.

AZEVEDO, J.L., 1971. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. England, University of Sheffield, 240 p. (Ph.D. Thesis).

AZEVEDO, J.L.; A. OLIVEIRA e A.J. ROCHA CAMPOS, 1976. Replicador multiplo para transferência de esporos de fungos filamentosos. *Summa Phytopathologica*, 2:237-241.

- AZEVEDO, J.L. e J.A.ROPER, 1970. Mitotic non-conformity in *Aspergillus* : sucessive and transposable genetic changes. *Genetical Research*, 16:79-93.
- AZEVEDO, J.L.; E.P.SANTANA e R.BONATELLI JR., 1977. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 48:163-172.
- 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.
- CALVORI, C. e G. MORPURGO, 1966. Analysis of induced mutations in *Aspergillus nidulans*. I. UV- and HNO_2 -induced mutation. *Mutation Research*, 3:145-151.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1974. *Aspergillus nidulans*. In : King, R.C. ed. *Handbook of Genetics*, Phenum Press, New York, vol.I : 447-510.
- CURTIS, R.W.; J.F.STAUFFER e M.P.BACKUS, 1961. Acenaphthene requiring strain of *Penicillium chrysogenum*. *American Journal Botany*, 43:549-600.
- DARLINGTON, A.J. e C.SCAZZOCCHIO, 1967. Use of analogues and the substrate sensitivity of mutants in analogues of purine uptake an breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 93:937-940.

- DARRAG, I.E.M. e J.B. SINCLAIR, 1969. Evidence for systemic protection against *Rhizoctonia solani* with chloroneb in cotton seedlings. *Phytopatology*, 59:1102-1105.
- DEKKER, J., 1972. Resistance. In: Marsh R.W. (ed), *Systemic fungicides*. Longman, London p. 156-174.
- DEKKER, J., 1976. Acquired resistance to fungicides. *Annual Review Phytopathology*, 14:405-428.
- DORN, G. e W.RIVERA, 1966. Kinetics of fungal growth and phosphatase formation in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 92(6):1618-1622.
- DRAINAS, C.; J.R.KINGHORN e J.A. PATEMAN, 1977. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 98(2): 493-501.
- EMERSON, S., 1947. Growth response of a sulfonamide-requiring mutant strain of *Neurospora*. *Journal of Bacteriology* 54: 195-207.
- FEHRMANN, H., 1976a. Systemische fungizide-ein Überblick. I. Zur Wirkungsweise praxisüblicher substanzen. *Phytopathologische Zeitschrift*, 86:67-89.
- FEHRMANN, H., 1976b. Systemische fungizide-ein Überblick. II. Fungizid-resistenz phytopathogenes Pilze. *Phytopathologische*

Zeitschrift, 86:144-185.

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

GEORGOPOULOS, S.G., 1962a. Genetic nature of tolerance to *Hypomyces solani* f. *cucurbitae* to penta-and tetrachloronitrobenzene. *Nature*, London , 194:148-149.

GEORGOPOULOS, S.G., 1962b. Genetic control to tolerance to tetra and penta chloronitrobenzene in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. *Nature*, London , 196:359-360.

GEORGOPOULOS, S.G., 1963a. Pathogenicity of chlorinated nitrobenzene - tolerant strains of *Hypomyces solani* f. *cucurbitae* race 1. *Phytopathology*, 53:1081-1085.

GEORGOPOULOS, S.G., 1963b. Tolerance to chlorinated nitrobenzenes in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae* and its mode of inheritance. *Phytopathology*, 53:1086-1093.

GEORGOPOULOS, S.G., 1964. Chlorinated nitrobenzene tolerance in *Sclerotium rolfsii*. *Ann.Inst.Phytopathol. Benaki,N.S.*, 6: 156-159.

GEORGOPOULOS, S.G., 1969. The problem of fungicide resistance. *Bioscience* 19(11):971-973.

- GEORGOPOULOS, S.G. e E.GEORGADIS, 1969. Iodoacetate resistance and radiosensitization of conidia of *Aspergillus nidulans*. *Radiation Botany*, 9:69-73.
- 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 processes. *Phytopathology*, 66:217-220.
- GEORGOPOULOS, S.G. e V.E. VOMVOYANNI, 1965. Differential sensitivity of diphenyl-sensitive and diphenyl tolerant strains of fungi to chlorinated nitrobenzenes and to some diphenyl derivatives. *Canadian Journal of Botany*, 43:765-775.
- GEORGOPOULOS, S.G. e C.ZARACOVITIS, 1967. Tolerance of fungi to organic fungicides. *Annual Review of Phytopathology*, 5: 109-130.
- GUNATILLEKE, I.A.U.N.; H.N. ARST e C. SCAZZOCCHIO, 1975a. Three genes determine the carboxin-sensitivity of mitochondrial succinate oxidation in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 26:297-305.
- GUNATILLEKE, I.A.U.N.; G.SCAZZOCCHIO e H.N.ARST, 1975b. Cytoplasmic and nuclear mutations to chloramphenicol resistance in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General*

Genetics, 137:269-276.

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

HASTIE, A.C. e S.G.GEORGOPOULOS, 1971. Mutational resistance to fungitoxic benzimidazole derivatives in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 67:371-373.

HOCH, W.K. e H.D. SISLER, 1969. Specificity and mechanism of antifungal action of chloroneb. *Phytopathology*, 59:627-632.

JINKS, J.L., 1963. Cytoplasmatic inheritance in fungi. In: Burdette, W.J. (ed). *Methodology in basic Genetics*, Holden day, San Francisco, California, p. 325-354.

KAAS SIJPESTEIJN, 1972. Effects on fungal pathogens. In : Marsh R.W. (ed), *Systemic fungicides*. Longmann London, p. 132-155.

KÄFER, E., 1960. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London 186:619-620.

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

- KLIMCZUK, J., 1970. Spontaneous and induced reversions of *methl* mutant of *Aspergillus nidulans*. *Genetica Polonica*, 22:313-319.
- LACAVA, P.M., 1977. Resistência genética a fungicidas em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 88 p. (Tese de Livre-Docência).
- LEDERBERG, J. e LEDERBERG, E.M., 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*, 63:399.
- LEGATOR, M.S., 1976. First annual course in the principles and practices 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.
- LILLY, L.J., 1965. An investigation of suitability of the suppressors of *methl* in *Aspergillus nidulans* for the study of induced and spontaneous mutation. *Mutation Research*, 2: 192-195.
- MACKINTOSH, M.E. e R.H. PRITCHARD, 1963. The production and replica plating of micro-colonies of *Aspergillus nidulans*.

Genetical Research, 4:320-322.

MASON, J.R. e TURNER, G., 1975. Transmission and recombination of extranuclear genes during sexual crosses in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 143:93-99.

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.

MENEZES, E.M. e J.L. AZEVEDO, 1978. Reversion in variants from a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics* 164(3):255-258.

MILLER, C.F. e M. BONHOFF, 1947. The development of streptomycin resistant variants of meningococcus. *Science*, 105:620-621.

MIRANDA FILHO, J.B. e J.L. AZEVEDO, 1974. Nicotinic acid suppressors in *Aspergillus nidulans*. *Experientia*, 30(4): 356-358.

MORPURGO, G., 1961. Somatic segregation induced by *p*-fluorophenylalanine. *Aspergillus Newsletter*, 2:10.

MORPURGO, G., 1962. 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.

- NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1968. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 58:193-209.
- OLIVEIRA, L.M.M.B., 1978. Resistência à arginina em linhagens deficientes para a síntese de lisina em *Aspergillus nidulans* Piracicaba, ESALQ/USP, 116 p. (Dissertação de Mestrado).
- PALMER, L.M.; C. SCAZZOCCHIO e D.J. COVE, 1975. Pyrimidine biosynthesis in *Aspergillus nidulans* : isolation and characterization of mutants resistant to fluoropyrimidines. *Molecular General Genetics*, 140:165-174.
- PASZEWSKI, A. e J. GRABSKI, 1973. β -cystathionease and O-acetylhomoserine sulphhydrylase as the enzymes of alternative methionine biosynthetic pathways in *Aspergillus nidulans*. *Acta Biochimica Polonica*, 20:159-168.
- PIOTROWSKA, M.; P.P.STEPIEN; E. BARTIK e E. ZAKRZEWSKA, 1976. Basic and neutral amino acid transport in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 92:89-92.
- PONTECORVO, G., 1954. Mitotic recombination in the genetic systems of filamentous fungi. *Caryologia* 6(supp): 192-200.
- PONTECORVO, G., 1963. Microbial genetics : retrospect and prospect. *Proceedings of the Royal Society (série B)*, 158:1-23.

- PONTECORVO, G. e E. KÄFER, 1956. Mapping the chromosomes by means of mitotic recombination. *Proceedings the Royal Phys. Society Edinburgh*, 25:16-20.
- PONTECORVO, G. e E. KÄFER, 1958. Genetic analysis based on mitotic recombination. *Advances in Genetics*, 9:71-104.
- PONTECORVO, G. e J.A. ROPER, 1952. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 6, VII.
- PONTECORVO, G.; J.A. ROPER e E. FORBES, 1953a. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, 8:198-210.
- PONTECORVO, G.; J.A. ROPER ; L.M. HEMMONS ; K.D. Mac DONALD e A.W.J. BUFTON, 1953b. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.
- 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.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8:14-15.
- ROPER, J.A., 1971. *Aspergillus*. In: Hollaender A. ed., *Chemical*

- mutagens*. Plenum Press. New York, vol. 11 : 343-365.
- ROPER, J.A.; e E. KÄFER, 1957. Acriflavine-resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 16: 660-667.
- ROWLANDS, R.T. e G. TURNER, 1973. Nuclear and extranuclear inheritance of oligomycin resistance in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 126:201-216.
- ROWLANDS, R.T. e G. TURNER, 1977. Nuclear-extra-nuclear interaction affecting oligomycin resistance in *Aspergillus nidulans*. *Molecular General Genetics*, 154:311-318.
- SCOTT, B.R.; T. ALDERSON e D.G. PAPWORTH, 1973. The effect of plating densities on the retrieval of methionine suppressors mutations after ultraviolet or gamma irradiation of *Aspergillus*. *Journal of General Microbiology*, 75:235-239.
- SHATTOCK, R.C. e D.S. SHAW, 1975. Mutants of *Phytophthora infestans* resistant to, and dependent upon, antibiotics. *Transaction British Mycological Society*, 64(1):29-41.
- SIDDIQI, O.H., 1962. Mutagenic action of nitrous acid on *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 3:303-314.
- SINHA, V., 1967. Aromatic amino acid biosynthesis and p-fluoro phenylalanine resistance in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 10:261-272.

- SRIVASTAVA, S. e U. SINHA, 1975. Six new loci controlling resistance to *p*-fluorophenylalanine in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 25:29-38.
- THRELFALL, R.J., 1968. The genetics and biochemistry of *Aspergillus nidulans* resistant to chlorinated nitrobenzenes. *Journal of General Microbiology*, 52:35-44.
- THRELFALL, R.J., 1972. Effect of pentachloronitrobenzene (PCNB) and other chemicals on sensitive and PCNB-resistant strains of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 71:173-180.
- TILLMAN, R.W. e H.D. SISLER, 1971. A chloroneb-resistant strain of *Ustilago maydis*. *Phytopathology* 61: 914.
- TILLMAN, R.W. e H.D. SISLER, 1973. Effect of chloroneb on the growth and metabolism of *Ustilago maydis*. *Phytopathology* 63:219-225.
- TOLEDO, A.C.D., 1974. Resistência a fungicidas. *O Biológico* XL:163-170.
- TUYL, J.M. van, 1975a. Acquired resistance to carboxin in *Aspergillus nidulans*. *Netherland Journal of Plant Pathology* 81:122-123.
- TUYL, J.M. van, 1975b. Genetic aspects of acquired resistance to benomyl and thiabendazole in a number of fungi. *Med.Fac.*

- Landbouww. Rijksuniv. Gent*, 40:691-697.
- TUYL, J.M. van, 1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. *Nederland Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen*, 136 p.
- TUYL, J.M. van; L.C. DAVIDSE e J. DEKKER, 1974. Lack of cross resistance to benomyl and tiabendazole in some strains of *Aspergillus nidulans*. *Netherland Journal of Plant Pathology* 80:165-168.
- VOMVOYANNI, 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.
- YEGIAN, D. e V.BUDD, 1948. A variant of *Mycobacterium ramae* requiring streptomycin for growth. *Journal of Bacteriology*, 55:459-461.