

MUTAÇÕES MITOCONDRIAIS COMO CAUSA
DE ATENUAÇÃO DE VIRULÊNCIA EM *Cryphonectria*
parasitica

CLAUDIA BARROS MONTEIRO-VITORELLO
- Bióloga -

ORIENTADOR: Dra. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

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

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro de 1994

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no Microbiology Department, Michigan State University, sob orientação do Dr. Helmut Bertrand em colaboração com Dr. Dennis Fulbright, Department of Botany and Plant Pathology, East Lansing, Michigan, Estados Unidos da América.

Agradeço com muito carinho as pessoas que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

- A minha orientadora Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner, pelo incentivo e confiança durante o desenvolvimento do trabalho;
- Dr. Helmut Bertrand, pela orientação perfeita e confiança em meu trabalho;
- Dr. Dennis Fulbright, pelo primeiro contato e aceitação para trabalhar em seu laboratório;
- A minha amiga de sempre Adriana C. Longo,
- A Dra. Julia Bell e ao técnico Brian Shaw por toda ajuda durante o trabalho;
- Aos amigos Kathy Namy, George Hausner, Susana Hubert, Sara Carrsara, Christina Howellch, Tak Ko, Quing que trabalham no lab do Dr. Bertrand; David Huber, Chris Smart e Al Ravenscroft, do Lab do Dr. Fulbright;
- Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudos tipo "sandwich" através do RHAÉ.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. "Chestnut blight" e hipovirulência.....	4
2.2. <i>Cryphonectria parasitica</i>	7
2.3. DsRNA e hipovirulência em <i>C. parasitica</i>	9
2.4. Hipovirulência e dsRNA em outros fungos.....	15
2.5. Mitocôndrias e a via alternativa.....	20
2.6. Senescência em fungos filamentosos.....	28
2.7. Supressividade e senescência.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. Linhagens utilizadas.....	37
3.2. Meios de culturas e condições de crescimento.....	39
3.3. Extração de dsRNA.....	40
3.3.1. Preparação das amostras.....	40
3.3.2. Preparação da coluna de celulose.....	41
3.3.3. Extração de dsRNA.....	41
3.4. Cultura de colônias monospóricas.....	42
3.5. Determinação do peso fresco.....	43
3.6. Teste de virulência.....	43

3.6.1. Maças.....	43
3.6.2. Ramos de castanheiras dormentes.....	44
3.6.3. Casca de castanheiras.....	44
3.6.4. Árvores de castanheiras.....	45
3.7. Obtenção de mutantes resistente ao benomyl.....	45
3.8. Teste do heterocário.....	45
3.9. Cruzamento sexual.....	46
3.10. Obtenção de mutantes mitocondriais.....	47
3.11. Ensaio de respiração.....	47
3.12. Extração de DNA para PCR.....	49
3.13. PCR.....	49
3.14. Isolamento de mitocôndrias.....	50
3.15. Determinação de atividades enzimáticas.....	51
3.15.1. Citocromo oxidase.....	51
3.15.2. Succinato oxidase.....	52
3.15.3. NADH desidrogenase.....	52
3.16. Espectro dos citocromos <i>a, b, c</i>	53
3.17. Extração de DNA mitocondrial.....	54
3.18. Análise do DNA mitocondrial.....	55
3.19. Detecção de fenoloxidasas.....	55
3.20. Análise das subunidades de ribossomos mitocondriais.....	56
3.21. Extração de rRNA mitocondrial.....	56
3.22. Extração de rRNA citosólico.....	58

3.23. Northern blot e hibridização de RNA.....	58
4. RESULTADOS.....	58
4.1. Escolha da linhagem para o trabalho.....	58
4.2. Obtenção de mutantes respiratórios.....	59
4.3. Teste de virulência.....	70
4.4. Análise genética.....	73
4.4.1. Teste do heterocário.....	73
4.4.2. Cruzamentos sexuais.....	90
4.5. Análise dos fragmentos de restrição do DNA mitocondrial.....	96
4.6. Investigando as causas da mutação.....	98
4.6.1. Ensaios enzimáticos.....	98
4.6.2. Espectro dos citocromos mitocondriais.....	100
4.6.3. Análise dos ribossomos mitocondriais.....	104
4.6.4. Análise de fenol oxidases.....	107
4.7. Instabilidade dos mutantes citoplasmáticos.....	110
4.8. Nomenclatura dos mutantes respiratórios em <i>C.</i> <i>parasitica</i>	116
4.9. Instabilidade em linhagens virulentas.....	118
5. DISCUSSÃO.....	125
5.1. Obtenção de mutantes respiratórios.....	125
5.2. Mutações citoplasmáticas como fonte de hipovirulência.....	126
5.3. Mutações nucleares que afetam a respiração.....	130

5.4. Fenoloxidasas VS hipovirulência e via alternativa.....	132
5.5. Instabilidade em linhagens virulentas.....	133
6. CONCLUSÕES.....	134
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136
APÊNDICE.....	150

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
1. Cadeia ramificada do sistema ramificado de transporte de elétrons.....	27
2. Extração de dsRNA das linhagens GH2, Ep155, CL25, Cl25ss9, CL1-16, CL1-16-17, FC9, ARN.....	59
3. Padrão de respiração dos mutantes derivados de Ep155.....	62
4. Fenótipo das colônias e ensaios de virulência da linhagem Ep155, e mutantes respiratórios.....	66
5. Colônias das linhagem EpBEN3 convertidas em hipovirulentas pelos mutantes 135.9 e 135.12.....	75
6. Fragmentos <i>EcoRI</i> de restrição do mtDNA da progênie dos cruzamentos recíprocos entre o mutante 135.9 e a linhagem 80-2c.....	95
7. Fragmentos <i>EcoRI</i> de restrição do mtDNA da progênie dos cruzamentos recíprocos entre o mutante 135.12 e a linhagem Ep339.....	96
8. Fragmentos <i>EcoRI</i> de restrição do mtDNA dos mutantes respiratórios derivados da linhagem Ep155.....	97
9. Espectro de absorção de luz dos citocromos mitocondriais das linhagens 80-2c, Ep155, 135.9, 180.17, 181.3, 193.1.	103

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
10. A. Análise eletroforética dos rRNAs mitocondriais; B. Autoradiografia apresentando hibridização com o plasmídeo pHPR4a; da linhagem Ep155 e mutantes respiratórios.....	106
11. Respostas dos mutantes respiratórios a reação de atividade da enzima lacase.....	109
12. Morfologia deteriorada das colônias do mutante respiratório 135.12.....	111
13. Padrão de restrição das enzimas <i>HpaII</i> e <i>BglIII</i> dos mutantes respiratórios.....	112
14. Produtos derivados de PCR, utilizando as diferentes combinações de primers.....	115
15. Colônias derivadas de uma única colônia do variante CL1-16.3.....	120
16. Espectro de absorção de luz dos citocromos Ep155, CL1-16, CL1-16-17.....	125

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela</i>	<i>Página</i>
1. Linhagens de <i>C. parasitica</i> utilizadas neste trabalho.....	34
2. Percentagem de respiração pela cadeia de citocromos e via alternativa após a adição dos inibidores KCN e SHAM.....	63
3. Percentagem de respiração pela via alternativa de colônias monospóricas isoladas dos mutantes respiratórios.....	64
4. Taxa de crescimento dos diferentes mutantes respiratórios e Ep155 em meio de cultura completo.....	69
5. Peso seco do micélio das linhagens Ep155, Ep338 e dos mutantes respiratórios.....	70
6. Comparação dos diferentes testes de virulência dos mutantes respiratórios e linhagem Ep155.....	72
7. Fenótipo quanto a resistência ao benomyl e respiração pela via alternativa das colônias isoladas a partir da zona de contato entre o mutante 135.9 e EpBEN3.....	76
8. Percentagem de respiração pela via alternativa em dois experimentos, de EpBEN3, 135.9, 135.9B3.....	77
9. Percentagem de respiração pela via alternativa de EpBEN3, 135.9, 135.9A1.....	78
10. Fenótipo quanto a resistência ao benomyl e respiração pela via alternativa das colônias isoladas a partir da zona de contato entre o mutante 135.12 e EpBEN3.....	79
11. Percentagem de respiração pela via alternativa de EpBEN3, 135.12, 135.12A2.....	80

<i>Tabela</i>	<i>Página</i>
12. Fenótipo quanto a resitência ao benomyl e respiração pela via alternativa das colônias isoladas a partir da zona de contato entre o mutante 193.1 e EpBEN3.....	82
13. Percentagem de respiração pela via alternativa de EpBEN3, 193.1, 193.1D2.....	83
14. Percentagem de respiração pela via alternativa de EpBEN3, 181.3 e colônias monospóricas derivadas da zona de contato entre eles.....	84
15. Percentagem de respiração pela via alternativa de EpBEN3, 180.17 e colônias monospóricas derivadas da zona de contato entre eles.....	85
16. Taxa de crescimento de EpBEN3, 135.12, 135.9 e convertentes 135.9A1, 135.9B3, 135.12A2.....	88
17. Teste de virulência das linhagens convertidas.....	89
18a. Número de colônias analisadas dos cruzentos recíprocos entre os mutantes e as linhagens 80-2c e Ep339.....	93
18b. Análise de χ^2 do número de colônias analisadas dos cruzamentos recíprocos entre os mutantes e as linhagens 80-2c e Ep155.....	94
19. Relação da atividades das enzimas: citocromo oxidase, NADH desidrogenase, succinate desidrogenase.....	99
20. Relação das quantidades de citocromos <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i>	102
21. Relação entre as subunidades maiores e menores dos ribossomos mitocondriais.....	105

<i>Tabela</i>	<i>Página</i>
22. Características dos mutantes respiratórios	117
23. Teste de virulência realizado em árvores de castanheiras em Ep155, CL1-16 e CL1-16.3	121
24. Teste de virulência realizado em maçãs	122
25. Percentagem de respiração pela via alternativa de isolados virulentos instáveis	124

APÊNDICE

<i>Tabela</i>	<i>Página</i>
1. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre as linhagens Ep339 e Ep155.....	151
2. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre as linhagens Ep339 e Ep155.....	153
3. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante 181.3.....	154
4. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante 180.17.....	155
5. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante 180.17.....	156
6. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante 193.1.....	157
7. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante 53.14.....	158
8. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante 53.14.....	159

Tabela

Página

9. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante 135.9.....160

10. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante 135.12.....161

11. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante 135.12.....162

12. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre as linhagens 80-2c e Ep155.....163

13. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre as linhagens 80-2c e Ep155.....164

14. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante 180.17.....165

15. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante 180.17.....166

16. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante 183.1.....167

Tabela

Página

17. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante 183.1.....	168
18. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante 193.1.....	169
19. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante 193.1.....	170
20. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante 135.9.....	171
21. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante 135.9.....	172
22. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante 135.12.....	173

MUTAÇÕES MITOCONDRIAIS COMO CAUSA DE ATENUAÇÃO DE
VIRULÊNCIA EM *Cryphonectria parasitica*

Autora: Cláudia Barros Monteiro Vitorello

Orientadora: Dra. Aline Pizzirani-Kleiner

RESUMO

Alguns fungos fitopatogênicos apresentam virulência reduzida transmissível citoplasmaticamente devido a infecção de micovírus. Mais recentemente, hipovirulência citoplasmaticamente transmissível vem sendo associada a mutações em genes mitocondriais. Com o objetivo de demonstrar que hipovirulência devido a mutações mitocondriais em *C. parasitica* podem ser obtidas experimentalmente, mutantes foram induzidos através de tratamento com brometo de etídio e luz ultra-violeta. A estratégia de seleção utilizada foi baseada em crescimento lento e indução de respiração pela via resistente ao cianeto, sensível ao ácido salicilhidroxâmico. Duas mutações de origem citoplasmática foram isoladas, *mit1* e *mit2*, como determinado pela capacidade de transmitir hipovirulência através de fusão de hifas e cruzamentos

sexuais, sendo herdada maternamente. A transferência de hipovirulência através de fusão de hifas pode ser explicada pelo caráter de supressividade de mitocôndrias que apresentam mutações que provocam deficiência em respiração. Característica esta encontrada em eventos de senescência como os descritos para *Neurospora*, *Podospora* e *Aspergillus*. A mutação *mit1*, provoca redução em citocromo *a* e *mit1* e *mit2*, provocam instabilidade no DNA mitocondrial. Mutantes respiratórios nucleares foram também obtidos com as estratégias citadas acima e divididos em duas classes, crescimento lento e crescimento normal. As duas mutações que permitem o crescimento normal (*cyt1* e *cyt2*) e conseqüentemente virulência como o tipo selvagem, foram caracterizadas como apresentando processamento de rRNA mitocondrial anormal, provocando deficiências em citocromos *a* e *b*. As mutações *res1* e *cya1* provocam crescimento lento, e conseqüentemente hipovirulência, *cya1* apresenta níveis variáveis de citocromo *a*, no entanto as causas em ambas mutações permanecem indefinidas. Linhagens instáveis em relação a virulência foram analisadas e mostraram evidências de que instabilidade pode estar associada a mutações mitocondriais.

MITOCHONDRIAL MUTATIONS AS CAUSE OF VIRULENCE
ATTENUATION IN *Cryphonectria parasitica*

Author: Cláudia Barros Monteiro-Vitorello

Adviser: Dr. Aline A. Pizzirani-Kleiner

SUMMARY

Some phytopathogenic fungi present cytoplasmically-transmissible hypovirulence (reduced virulence) due to a infection of mycovirus. Recently, cytoplasmic-transmissible hypovirulence has been associated with mitochondrial gene mutations. With the purpose of demonstrating that hypovirulence due to mitochondrial mutations can be experimentally obtained in *C. parasitica*, mutants were induced through treatment with ethidium bromide and UV-light. Selection was based on reduced growth and induction of alternative pathway. Two cytoplasmic mutants, *mit1* and *mit2*, were isolated as determined by their capacity of hypovirulence transmission through hyphal fusion and maternally-transmission in sexual crosses. The *mit1* mutation causes reduction in cytochrome a content, and both, *mit1* and *mit2*, cause

instability in the mitochondrial chromosome. Nuclear respiratory mutants were also obtained using the strategies described above and divided in two classes: slow and normal growth (*cyt1* and *cyt2*) and, consequently virulence as found in wild type were characterized as showing abnormal mitochondrial rRNA splicing, causing cytochrome *a* and *b* deficiencies. The *res1* and *cya1* mutations cause slow growth, and consequently hypovirulence, *cya1* show variable amounts of cytochrome *a*, but the primary cause of both mutations remain unknown. Unstable strains in relation to virulence were analyzed and showed evidences that instability can be associated with mitochondrial mutations.

1. INTRODUÇÃO

Cryphonectria parasitica é um dos fungos filamentosos que infecta castanheiras americanas (*Castanea dentata*) provocando a morte dessas árvores. Controle natural da doença tem sido observado em áreas onde ocorrem formas citoplasmaticamente transmissíveis de hipovirulência (virulência reduzida). Essa hipovirulência é causada pela infecção de vírus de RNA de dupla fita (dsRNA) e está associada a morfologia alterada e crescimento reduzido do fungo (NUSS, 1992). Entretanto, algumas linhagens atenuadas isoladas a partir de árvores que mostram sinais de recuperação, apresentam uma forma citoplasmaticamente transmissível de hipovirulência, mas não contém dsRNA (FULBRIGHT, 1985).

Diferentemente da hipovirulência causada por vírus, alguns isolados com virulência reduzida expressam constitutivamente altos níveis de respiração resistente ao cianeto (CN), sensível ao ácido salicilhidroxâmico (SHAM) (via alternativa) (MAHANTI et al., 1993). Tais isolados crescem mais lentamente, geram menos conídios e formam colônias anormais. Nestes isolados, a atenuação da virulência pode estar associada com disfunções mitocondriais semelhantes

às encontradas em mutantes citoplasmáticos de *Neurospora* e outros fungos onde estas disfunções foram bem caracterizadas (GRIFFITHS, 1992). Nestes casos, o fenótipo de crescimento lento e processos degenerativos estão associados com defeitos respiratórios que resultam de mutações em genes mitocondriais. Esses processos degenerativos são causados por uma reposição gradual do cromossomo mitocondrial normal com formas anormais desse cromossomo durante o crescimento vegetativo e reprodução. O processo que causa essa reposição não está ainda bem definido e tem sido chamado de "supressividade" devido a sua associação com o desaparecimento de fatores citoplasmáticos do tipo selvagem em zigotos gerados em cruzamentos entre células normais e mutantes *petite* em leveduras (revisado por PISKUR, 1994).

Supressividade está associada não somente com rearranjos no DNA mitocondrial, mas também com defeitos respiratórios que são causados por mutações de ponto, ou pela integração de plasmídios lineares ou circulares no cromossomo mitocondrial (revisado em BERTRAND, 1986; BERTRAND & GRIFFITHS, 1989). Existem ainda casos de genes nucleares que estão envolvidos na geração de deleções no DNA mitocondrial (SEIDEL-ROGOL *et al.*, 1989). Fenômeno semelhante poderia estar envolvido na atenuação da virulência em *Cryphonectria parasitica* e em outros fungos fitopatogênicos após um período de propagação assexual em laboratório (revisado em NAIKI & COOK, 1983).

Para explorar o possível envolvimento de mitocôndrias na geração de hipovirulência, mutações que causam defeitos respiratórios foram induzidas em uma linhagem virulenta de *Cryphonectria parasitica*, e selecionadas por estratégias semelhantes às utilizadas em *Neurospora*. Os resultados obtidos neste trabalho podem ser de importância no entendimento de mecanismos de virulência em fungos fitopatogênicos e possivelmente na sua utilização como uma nova estratégia para o controle biológico de doenças causadas por fungos.

Os objetivos desse trabalho foram então:

1. Induzir mutações citoplasmáticas em uma linhagem virulenta de *C. parasitica*;
2. Verificar se mutações citoplasmáticas podem determinar hipovirulência transmitida citoplasmaticamente;
3. Analisar as causas das mutações obtidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. "CHESTNUT BLIGHT" E HIPOVIRULÊNCIA

A queima da castanheira é uma das doenças causada pelo fungo filamentoso *Cryphonectria parasitica* que em 40 anos destruiu as castanheiras americanas (*Castanea dentata*), um exemplo clássico de destruição do hospedeiro por um patógeno. A extensão do dano e o interesse gerado foi tal que a questão chegou a ser tema de artigo da revista "National Geographic" (COCHRAN, 1990). O fungo infecta a árvore através de feridas, os esporos dão origem ao micélio que invade a casca dos galhos e tronco e o câmbio vascular. O câncer formado resulta na morte do hospedeiro. A doença foi descoberta nos Estados Unidos, em 1904, em árvores existentes no "Bronx Zoological Park", em New York, tendo o patógeno sido introduzido através de castanheiras trazidas do Oriente, as quais apresentavam resistência ao fungo. Nos quarenta anos seguintes, a floresta de castanheiras que dominava 25% dos estados do nordeste americano ficou reduzida a poucos sobreviventes, numa destruição sem precedentes (ROANE *et al.*, 1986; NUSS, 1992). Os principais hospedeiros dessa espécie de fungo são as

castanheiras americana, européia (*C. sativa*), chinesa (*C. mollissima*), e japonesa (*C. crenata*), entretanto, todas as espécies de *Castanea* são suscetíveis, além de *Quercus virginiana*, *Q. stellata*, e possivelmente outras espécies de aveias.

Em 1938 a doença foi descoberta na Europa, no norte da Itália. No começo pareceu tão devastadora como na América do Norte, mas quinze anos mais tarde, BIRAGHI, descreveu que na mesma região do aparecimento da doença, as árvores apresentavam sinais de recuperação ainda que infectadas pelo fungo. Foi a descoberta da hipovirulência (HV), que sendo citoplasmaticamente transmissível resultava na atenuação do patógeno, permitindo que as árvores sobrevivessem (revisado por ANAGNOSTAKIS, 1987). A essa altura a doença já se espalhava pela França, Suíça, Iugoslávia, Espanha, Turquia, Grécia, Hungria e URSS.

Somente em 1977, DAY et al. apresentaram a primeira evidência de que HV era causada por um vírus de RNA de dupla fita (dsRNA). Na Europa, o efeito do dsRNA foi rapidamente visível em árvores sobrevivendo a infecção do fungo. Já na América a descoberta de dsRNA não provocou o impacto esperado (ANAGNOSTAKIS, 1982; McDONALD & FULBRIGHT, 1991). O vírus de dsRNA é transmitido através de fusão de hifas entre linhagens vegetativamente compatíveis. As linhagens americanas de *Cryphonectria parasitica* apresentam diversidade em grupos de

incompatibilidade vegetativa dificultando a disseminação do vírus e conseqüentemente a recuperação da floresta de castanheiras. Além disso, o dsRNA não é transmitido a progênie em cruzamentos sexuais, contribuindo para falta de disseminação do vírus (ANAGNOSTAKIS, 1977).

Hipovirulência também tem sido atribuída a determinantes nucleares. Algumas linhagens contendo dsRNA apresentam segregação em conídios para colônias com e sem dsRNA. Algumas das colônias sem dsRNA não formam micélio aéreo e os conídios surgem diretamente do micélio vegetativo ao invés de em picnídio, como é típico para a espécie. ANAGNOSTAKIS (1984) cruzando tais isolados com o parental masculino, encontrou segregação para um único gene nuclear, sugerindo a possibilidade de integração de material genético citoplasmático dentro do genoma nuclear.

Em 1985, FULBRIGHT descreveu a existência de árvores sobrevivendo a infecção de *C. parasitica* no norte de Michigan, e isolados desse fungo não apresentavam dsRNA. Esses isolados mostravam níveis elevados de respiração pela via resistente ao cianeto (CN) e sensível ao ácido salicilhidroxâmico (SHAM), apontando para mutações no DNA mitocôndrial (MAHANTI *et al.*, 1993). Esse novo tipo de atenuação da virulência é transmitido através de fusão de hifas e através de cruzamento sexual, sendo herdado maternamente. Na linhagem CL25, 80% dos conídios são virulentos e apresentam níveis normais de

respiração resistente ao cianeto (CL25ss4). Os demais 20% são hipovirulentos (CL25ss9), continuam a segregar 4:5 para virulência e apresentam altos níveis de respiração resistente ao cianeto.

A hipovirulência mediada por vírus apresenta potencial para o controle biológico, e foi extremamente eficiente na Europa, onde existem programas de inoculação artificial de linhagens portadoras do vírus. Na América, no entanto, tentativas da introdução do vírus europeu e mesmo a descoberta de vírus nativo, não foram suficientes para interromper a destruição das árvores. Nesse contexto se insere o estudo de uma segunda alternativa para o controle da doença, onde o vírus não está envolvido. Não só para "chestnut blight", mas para outros fungos que não apresentam a ocorrência natural de hipovirulência.

2.2. *Cryphonectria parasitica*

Inicialmente, *Cryphonectria parasitica* pertencia ao gênero *Endothia*, que foi dividido em dois gêneros separados em duas diferentes famílias (Valsaceae e Gnomocieae), baseado na configuração e textura de estroma e a septação e o formato dos ascosporos. Refere-se a esta espécie como *Cryphonectria (=Endothia) parasitica* (Murr.) Barr (MICALES & STIPES, 1987). É um fungo filamentosos, ascomiceto, homotálico, mas com

preferência a fecundação cruzada. Linhagens normais quando crescidas em meio de cultivo (PDA - DIFCO, batata, dextrose, agar) a 20°C sob um fotoperíodo de 16 horas, colonizam o meio em 5-7 dias, produzindo micélio aéreo branco-creme em abundância, com conídios laranja de formato ovalado, e anéis concêntricos relacionados ao fotoperíodo. Linhagens virulentas apresentam a capacidade de esporular sexualmente e assexualmente. Conídios desse fungo são quase sempre uninucleados, onde diplóides podem ser encontrados a partir da indução de heterocários, sugerindo a existência de um ciclo parassexual (PUHALA & ANAGNOSTAKIS, 1971). Conídios são dispersos durante o verão e outono através da chuva, vento, insetos, pássaros e pequenos mamíferos. Peritécios são formados durante o outono, embebidos na base do estroma que estão dispersos ao longo do cancro. São arredondados, com longos tubos que terminam na superfície do estroma em um ostíolo. Os ascosporos são em média 8,6 x 4,5 μm , e formados em ascos com 8 células. Os peritécios podem também ser obtidos em laboratório, utilizando-se segmentos de ramo de castanheiras autoclavados e colocados sobre a superfície de placa de Petri contendo agar-água (ANAGNOSTAKIS, 1979).

Incompatibilidade vegetativa foi descrita por ANAGNOSTAKIS (1977). Quando linhagens de *C. parasitica* são pareadas em meio de cultivo (PDA) no escuro, uma linha ou zona de barreira forma-se entre elas. Em alguns casos, ao longo

dessa linha formam-se uma densa camada de conídios, sendo que nessa zona de barragem encontram-se células mortas onde a anastomose resultou em uma reação letal. Foi determinado que incompatibilidade é uma característica heterogênica, controlada por pelo menos sete loci, com dois alelos para cada locus. Linhagens são compatíveis vegetativamente somente se elas apresentam os mesmos alelos para um determinado gene (ANAGNOSTAKIS, 1982). NEWHOUSE & McDONALD (1991) analisando a ultraestrutura da fusão de hifas, observaram que existe uma continuidade citoplasmática, com microtúbulos e mitocôndrias passando através da abertura formada entre linhagens compatíveis. Anastomose entre linhagens incompatíveis desencadeia um colapso celular e degeneração citoplasmática. Entretanto, existem graus de incompatibilidade vegetativa, onde fusões de hifas podem ocorrer, permitindo transferência de citoplasma em pequenas proporções, dependendo da quantidade de genes diferentes envolvidos na reação entre duas linhagens incompatíveis (ANAGNOSTAKIS, 1983; ANAGNOSTAKIS *et al.*, 1986).

Várias outras plantas são infectadas por diferentes espécies do gênero *Cryphonectria*, incluindo carvalhos, cravos e eucaliptos. *C. cubensis*, encontrada em florestas tropicais é responsável por danos em eucaliptos brasileiros nas regiões de Aracruz no Espírito Santo e Viçosa em Minas Gerais (ROANE *et al.*, 1986).

2.3. DsRNA E HIPOVIRULÊNCIA EM *C. parasitica*

Após as primeiras observações de BIRAGHI (1950) na Itália sobre a presença de hipovirulência, cientistas franceses descobriram que culturas isoladas das árvores com sinais de recuperação apresentavam uma morfologia variante da normalmente encontrada (revisado por NUSS, 1992; ROANE *et al.*, 1986; ANAGNOSTAKIS, 1987). Tais isolados apresentavam pigmentação e esporulação reduzidas, e quando inoculados em castanheiras novamente, produziam uma lesão pequena e superficial. GREUTE & BERTHELAY-SAURET mostraram ser possível a conversão de linhagens virulentas em hipovirulentas, pareando os dois tipos em meio de cultura. Mais tarde, VAN ALFEN *et al.* (1975) usando a mesma técnica, demonstraram que a conversão era resultado de determinantes citoplasmáticos transferidos através de fusão de hifas. MOFFIT & LISTER (1975) apresentaram evidências, utilizando testes sorológicos, que dsRNA estava associado com os determinantes citoplasmáticos de hipovirulência. Subsequentemente, DAY *et al.* (1977) e DODDS (1980) em gel de eletroforese identificaram as bandas de dsRNA. Em 1984, FULBRIGHT demonstrou que usando ciclohexamida poderia eliminar o dsRNA de linhagens hipovirulentas, restaurando seu estado normal de virulência.

Os vírus de dsRNA encontrados em *C. parasitica* não apresentam capsídio e estão associados a vesículas membranosas

(DODDS, 1980; HANSEN, et.al., 1985). Estas vesículas são similares em tamanho e composição as encontradas em linhagens virulentas, mas sem a presença de dsRNA. Dentro dessas vesículas estão polissacarídeos compostos dos mesmos açúcares da parede celular do fungo, sugerindo sua função na síntese da parede celular. Vesículas de linhagens hipovirulentas apresentam RNA polimerases em abundância (VAN ALFEN, 1988). Uma vez que esse vírus é desprovido de capsídeo, somente pode ser transmitido através de fusão de hifas entre linhagens compatíveis. Por um mecanismo ainda não conhecido, existe exclusão do vírus em cruzamentos sexuais, isto é, colônias formadas a partir de ascósporos não apresentam dsRNA. Analisando linhagens hipovirulentas de diferentes localidades, concluiu-se que existe considerável variação quanto a concentração, número e tamanho de dsRNA. A variação no grau de hipovirulência e as características associadas a presença de dsRNA, tais como pigmentação e esporulação reduzidas, são diferentes para diferentes dsRNA. As características exibidas por uma linhagem hipovirulenta é independente do "background nuclear", uma vez que diferentes linhagens apresentam características similares após anastomose (ELLISTON, 1985).

Pouco se sabe a respeito do papel do dsRNA no citoplasma do fungo e, conseqüentemente, a causa da hipovirulência. Sabe-se que linhagens hipovirulentas apresentam uma redução na produção de oxalato. O oxalato reduz

o pH a um nível que causa injúria as células do hospedeiro. A atividade enzimática da oxaloacetato acetilhidrolase (E.C.3.7.1.1), enzima que converte oxaloacetado em oxalato e acetato mostrou-se quatro vezes maior em extratos de linhagens virulentas do que de linhagens hipovirulentas (HAVIR & ANAGNOSTAKIS, 1983; 1985).

RIGLING, et al. (1989) demonstraram que outra enzima apresenta redução em sua atividade. Linhagens suíças hipovirulentas apresentam menor atividade de uma fenol oxidase do tipo lacase, em comparação com o tipo selvagem. O papel da lacase não está claramente definido, acredita-se no seu envolvimento em degradação de lignina, formação de corpo de frutificação e pigmentação (THURSTON, 1994). Linhagens virulentas seriam capazes de interferir com o processo de lignificação iniciado pela planta como uma resposta a infecção, ou ainda, lacases poderiam participar na penetração do micélio através das zonas lignificadas. Estudos tem sido feitos para indentificar o papel da lacase em *C. parasitica* através da clonagem do gene e estudos de regulação (CHOI et al., 1992; RIGLING & VAN ALFEN, 1991). Cutinase é outra enzima que apresenta diferentes níveis em linhagens virulentas e hipovirulentas (VARLEY et al., 1992). Acredita-se que as cutinases sejam importantes para a penetração do fungo e o estabelecimento da doença.

Parece existir uma controvérsia a respeito do

verdadeiro papel do vírus quanto a hipovirulência. Alguns autores acreditam que os fenótipos alterados em linhagens que contêm dsRNA sejam devidos a efeitos específicos do vírus sobre o fungo e não devido a uma debilitação geral causada pela presença física do vírus. POWEL & VAN ALFEN (1987 a; b) mostraram evidências de que existe um acúmulo de um mRNA (RNA mensageiro) específico em linhagens virulentas, não encontrado em linhagens hipovirulentas. Linhagens hipovirulentas não apresentam em gel de poliacrilamida uma banda correspondendo a um polipeptídeo de 24 kda presente nas linhagens virulentas. A função desta proteína não foi determinada, mas acredita-se que sua ausência seja a causa da hipovirulência. ZHANG et al. (1993) foram responsáveis pela clonagem do gene *Vir2* que codifica tal proteína. Em experimentos de transformação e recombinação homóloga do gene *Vir2*, com sua sequência interrompida, os autores conseguiram a expressão de algumas características encontradas em linhagens hipovirulentas, como redução na quantidade de conídios e formação de corpos de frutificação estéreis. Entretanto, hipovirulência não foi uma das características encontradas.

Vários autores têm estudado a estrutura dos diferentes vírus de dsRNA encontrados em *C. parasitica*, os quais foram classificados como pertencentes ao gênero *Hypovirus* (TARTAGLIA et al., 1986; HILLMAN, et al., 1992;

SHAPIRA *et al.*, 1991; CHOI & NUSS, 1992). Alguns têm sido clonados e sequenciados, sendo que os resultados mais interessantes foram obtidos por CHOI & NUSS (1992). A linhagem Ep713 apresenta três tipos de vírus, que foram designados L-dsRNA, M-dsRNA e S-dsRNA, de acordo com o seu peso molecular, sendo L-dsRNA o maior segmento e S-dsRNA o menor. Os autores clonaram e sequenciaram o L-dsRNA, construindo um DNA complementar a sua sequência (cDNA), que foi usado para transformar uma linhagem isogênica que não continha dsRNA, Ep155. Após a integração desta sequência de DNA no genoma nuclear desta linhagem, Ep155 passou a exibir todas as características que acompanham a presença do vírus, incluindo hipovirulência. As vantagens desse sistema foram marcantes, uma vez que o cDNA integrado no cromossomo nuclear passou a gerar transcritos correspondentes ao L-dsRNA, que podiam ser transmitidos através de fusão de hifas para outras linhagens compatíveis. Além disso eram transmitidos para todos os conídios e através de cruzamento sexual, o que não acontecia durante a infecção viral. A atenuação da virulência através de engenharia genética, utilizando-se o mesmo cDNA, também foi conseguida em espécies relacionadas, como *C. cubensis*, *C. havanensis*, *C. radicalis* e *Endothia gyrossa* causadores de doenças em eucaliptos e carvalhos, que não são hospedeiros naturais de dsRNA, (BAOSCHAN, *et al.*, 1994).

Recentemente, POLASHOCK & HILLMAN (1994) detectaram

a presença de dsRNA em mitocôndrias de *Cryphonectria parasitica*, isolado de linhagens com moderada virulência em New Jersey.

2.4. HIPOVIRULÊNCIA E dsRNA EM OUTROS FUNGOS

Vírus de dsRNA têm sido identificados em uma série de fungos, entretanto em muitos sem papel definido, em forma latente. Nessa classe estão exemplos como *Agaricus bisporus*, *Puccinia ssp* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Alguns vírus de dsRNA são responsáveis por efeitos "killer", como em *Saccharomyces cerevisiae* e *Ustilago maydis* (revisão em KOLTIN & LEIBOWITZ, 1988). E outros associados a hipovirulência, onde além de *C. parasitica*, estão *Ophiostoma ulmi*, *Gaeumannomyces graminis* e *Helminthosporium victorie*. O dsRNA presente em *O. ulmi*, agente causal da doença do elmo ("Dutch elm disease"), é bastante similar ao encontrado em *C. parasitica* sendo desprovido de capsídeo.

Ophiostoma ulmi consistia de uma única espécie dividida em dois subgrupos, uma forma dita agressiva e outra não-agressiva. Recentemente elas foram reconhecidas como duas espécies diferentes (BRASIER et al., 1994). *O. ulmi* corresponde a forma não-agressiva, responsável por epidemias na Europa e América do Norte durante a primeira metade deste século, enquanto *O. novo-ulmi*, descrita mais recentemente,

pertence ao grupo de agressivas causando a corrente epidemia de "dutch elm disease".

A princípio acreditava-se que o declínio da doença em 1940, fosse devido a presença de fatores citoplasmáticos de ocorrência natural, e em analogia com *C. parasitica*, dsRNA fosse a causa deste declínio. Entretanto, em 1982, PUSEY & WILSON detectaram dsRNA em ambas as formas de *O. ulmi*, descartando a hipótese de que a simples presença de dsRNA era o único fator responsável pela redução da virulência. BRASIER (1983) demonstrou ser possível através de fusão de hifas a transferência de fatores citoplasmáticos que provocavam hipovirulência. As culturas hipovirulentas apresentavam morfologia anormal com frequentes setores e após o pareamento com linhagens virulentas vegetativamente compatíveis, essas adquiriam a morfologia anormal. A transmissão através de conídios era irregular, variando o grau de debilitação, enquanto que as progênes de cruzamentos sexuais pareciam ser livres dos fatores que determinavam a hipovirulência. Esses fatores tem sido designados fatores-d e a reação que transfere a hipovirulência de reação d (d="disease") (BRASIER, 1986).

ROGERS et al. (1986 e 1988) notaram que a transferência de morfologia anormal estava sempre relacionada com a transferência de múltiplos segmentos de dsRNA, e que isolados com morfologia normal não apresentavam mais do que quatro segmentos de dsRNA. Os autores sugeriram que o efeito

deletério deveria estar associado com específicos segmentos de dsRNA. A linhagem hipovirulenta mais estudada contém o fator d^2 , onde a maioria dos dsRNAs presente são purificados em preparações de mitocôndrias, e estas apresentam níveis reduzidos de citocromo aa_3 , quando comparados com o tipo selvagem (ROGERS *et al.*, 1987). Experimentos foram conduzidos para determinar se junto com o dsRNA, mitocôndrias eram também transmitidas durante a fusão de hifas (CHARTER *et al.*, 1993). Os autores utilizaram linhagens doadora e recipiente que apresentavam mtDNA distinguível por seus fragmentos de restrição (RFLP). A linhagem recipiente infectada pelo vírus apresentava o mesmo padrão de restrição de antes da infecção. Entretanto, um DNA plasmidial de aproximadamente 2,2 kb foi detectado na linhagem infectada, que não estava presente na forma normal do mesmo isolado. Plasmídios semelhantes foram encontrados na linhagem doadora, sendo que estes variavam de 0,8 a 4,1 kb. Os autores acreditam que o plasmídio, assim como o mtDNA não foi transmitido através de fusão de hifas, mas a infecção de fatores d^2 provocou a geração deste plasmídio na linhagem infectada. Até o momento esses são os resultados encontrados para *O. ulmi*, sendo que muito ainda falta a ser explicado a respeito da interação entre mitocôndria, dsRNA e hipovirulência.

Os dois exemplos citados a seguir são fungos infectados por vírus que formam capsídio, e apresentam relação

com redução em virulência. LINDBERG (1951) fez o primeiro relato em *Helminthosporium victoriae* de uma doença transmitida citoplasmaticamente. A doença reduzia o crescimento e provocava morfologia anormal de colônia, como consequência o fungo apresentava virulência atenuada (LINDBERG, 1960). Em 1979, GHABRIAL *et al.* associaram a doença a um vírus de dsRNA. *H. victoriae* é o fungo responsável pela queima victorina em aveia. O fungo produz uma toxina chamada victorina, que determina a patogenicidade. Isolados hipovirulentos produzem pouco ou não produzem este peptídeo. Colônias de isolados infectados com dsRNA apresentam crescimento retardado, frequentes setores, pouca esporulação, ausência de micélio aéreo e lise generalizada. Colônias monospóricas destes isolados, apresentam morfologia variada, incluindo colônias de aparência normal, moderadamente deteriorada e totalmente deteriorada, como esperado para determinantes citoplasmáticos. A presença de dois vírus, sorológica e eletroforeticamente diferentes, designados por seus coeficientes de sedimentação (190S e 145S) são a causa da hipovirulência. O vírus 190S contém um único RNA de dupla fita com peso molecular de $1,5 \times 10^6$ ou 4,5 kb. O vírus 145S contém 4 espécies de dsRNA, com pesos moleculares de 2,4; 2,2; 2,1 e 2,0 $\times 10^6$ (SANDERLIN & GHABRIEL, 1976). O vírus 190S tem sido melhor caracterizado pela sua facilidade de isolamento, este pertence a família Totiviridae, com uma única molécula de dsRNA e duas proteínas

principais responsáveis pela formação do capsídio (GHABRIAL, 1988 e GHABRIAL *et al.*, 1987).

Como nos demais casos, *Gaeumannomyces graminis*, responsável pela doença "podridão do pé" em trigo, cevada e arroz, quando muito tempo em cultura tende a perder a habilidade de causar doença (NAIKI & COOK, 1983; BUCK, 1986). Os vírus de dsRNA que foram encontrados neste fungo apresentam grande variedade dificultando o seu estudo. Vinte e dois tipos de vírus foram classificados em quatro diferentes grupos baseando-se em propriedades físicas e sorológicas das partículas, número e tamanho de dsRNA e espécies de polipeptídeos do capsídio. Esses vírus são geralmente transmitidos com alta frequência em conídios, através de fusão de hifas entre linhagens vegetativamente compatíveis e diferentemente dos demais podem ser transmitidos através de cruzamento sexual (McFADDEN *et al.*, 1983).

2.5. MITOCÔNDRIAS E A VIA ALTERNATIVA

Mitocôndrias são organelas semiautônomas que possuem DNA, o qual codifica informações diferentes das do núcleo. Todos os genomas mitocondriais conhecidos contêm em comum genes que codificam para alguns dos componentes da cadeia respiratória. Estes são: subunidades I, II e III da enzima citocromo *c* oxidase (COI - III), subunidade 6 da enzima ATPase e uma apoproteína do citocromo *b*. Alguns genomas também apresentam genes que codificam subunidades da enzima NADH desidrogenase. A segunda categoria de genes codificados pelo cromossomo mitocondrial consiste dos RNA estruturais. Todos os genomas examinados contêm os genes das subunidades maior e menor do RNA ribossomal (rRNA) e pelo menos 22 RNA transferidores (tRNA).

A maioria das espécies de fungo não apresentam um RNA 5S encontrado em eucariotos e, de maneira geral, os ribossomos mitocondriais apresentam menores coeficientes de sedimentação (19S e 25S). Diferentemente de procariotos, a subunidade maior de ribossomos em *Neurospora* apresenta um intron de 2500 nucleotídeos. Outras categorias de introns podem ainda ser encontrados, incluindo introns opcionais. Em alguns casos mais específicos, podem apresentar quadros de leitura para fatores chamados maturases que são essenciais para o processamento do RNA (GROSSMAN & HUDSPETH, 1985).

Mitocôndrias são responsáveis pela produção de energia (metabolismo oxidativo) na célula. É composta de uma membrana externa permeável a moléculas menores de 10 kDa e uma membrana interna, impermeável e altamente especializada. As enzimas da cadeia respiratória estão embebidas na membrana interna, enquanto que as enzimas do ciclo de Krebs estão na matriz mitocondrial. O metabolismo oxidativo é basicamente alimentado por ácidos graxos e piruvato produzido durante a glicólise. Acetil-CoA são seletivamente transportadas para dentro da matriz mitocondrial onde entram no ciclo de Krebs. Os principais produtos desse ciclo são CO_2 , que é liberado da célula; NADH, o qual é o principal fonte de elétrons para a cadeia respiratória e FADH_2 , também fonte de elétrons.

A cadeia respiratória é composta basicamente por 4 complexos, que estão associados a membrana interna da mitocôndria (Figura 1). Esses podem ser dissociados da membrana em sua forma ativa utilizando-se detergentes moderados como deoxicolato. Os dois primeiros complexos estão relacionados a entrada de elétrons na cadeia respiratória e são eles: complexo NADH-desidrogenase, que aceita elétrons do NADH e os transfere para ubiquinona (CoQ). Ubiquinona é uma proteína pequena embebida na membrana interna que transfere elétrons para o complexo b-c₁. Complexo succinato-CoQ, que contém a enzima succinato desidrogenase, também transfere elétrons para CoQ. O complexo b-c₁, é composto de várias

cadeias polipeptídicas que formam os citocromos b e c_1 , que recebem elétrons da CoQ e os transfere para uma enzima periférica a membrana, o citocromo c e subseqüentemente doa elétrons para o complexo citocromo oxidase. O complexo citocromo oxidase (citocromo aa_3), aceita elétrons do citocromo c e os transfere para o O_2 (oxigênio molecular).

Das quarenta proteínas envolvidas na cadeia respiratória, poucas são codificadas por genes mitocondriais, entre elas citocromo oxidase e citocromo b . O que torna importante o estudo dos citocromos como fonte de mutações mitocôndriais. Citocromos constituem uma família de proteínas que estão relacionadas pela presença de uma ligação a um grupo heme, onde o átomo de ferro pode mudar de uma forma férrica (FeIII) para ferrosa (FeII), sempre que aceita um elétron. Essa redução permite a proteína absorver luz visível, alterando sua coloração, detectável por espectrofotometria. A absorção apresenta 3 picos, chamados α , β e γ , sendo que o comprimento de onda no intervalo de α varia consideravelmente para os três tipos de citocromos (a, b e c).

A cadeia respiratória pode ser inibida por substâncias como cianeto e azida que se ligam fortemente ao complexo citocromo oxidase bloqueando o transporte de elétrons. Outros elementos tais como, o antibiótico antimicina A, que age a nível de complexo $b-c_1$, rotenona ou amital que agem no complexo NADH desidrogenase, também podem inibir a

cadeia respiratória. Inibidores da síntese proteica ou da transcrição do DNA em mitocôndrias, como cloranfenicol ou brometo de etídio, respectivamente, são também responsáveis pela inibição da cadeia respiratória.

Após a ubiquinona, a cadeia de elétrons ramifica-se e apresenta uma via alternativa (revisado por STOREY, 1976), que é induzida sempre que a cadeia respiratória está bloqueada. É conhecida como via resistente ao cianeto e pode ser inibida pelo ácido salicilhidroxâmico (Figura 1). Essa via somente está presente em plantas, fungos, algas e algumas bactérias. Nesta via, energia não é conservada na forma de ATP quando os elétrons atravessam por ela, a energia potencial do sistema é perdida em forma de calor. Tem sido extensivamente estudada em *Neurospora crassa*, onde pode ser induzida em determinadas condições de crescimento, incluindo a adição de inibidores de citocromos e da síntese proteica em mitocôndrias, ou mutações mitocôndriais (LAMBOWITZ & SLAYMAN, 1971). Esta via alternativa não está presente em *Saccharomyces cerevisiae*, e é encontrada em forma constitutiva em *Candida albicans* (SHEPHERD et al., 1978) e *Histoplasma capsulatum* (MARESCA et al., 1979).

A função desta via não está clara na maioria dos organismos, uma vez que não está ligada a formação do gradiente de prótons na membrana mitocondrial que permite a formação de ATP. Espécies de plantas termogênicas da família

Araceae, utilizam a produção de calor para volatilizar componentes que atraem insetos, assim facilitando a polinização (MEEUSE, 1975). *Stemphylium loti*, um patógeno de plantas cianogênicas, que produzem cianeto em resposta a infecção, utiliza a via alternativa para resistir a altas concentrações de cianeto e produzir uma enzima formamida hidrolase que converte cianeto a formamida não tóxica (RISSLER & MILLAR, 1977). Tem sido ainda sugerido que na maioria das plantas e fungos, a via alternativa seria um meio de descartar excesso de carboidratos, permitindo que o ciclo de Krebs continue operando, conseqüentemente gerando esqueletos de carbono para outros processos metabólicos (PALMER, 1976).

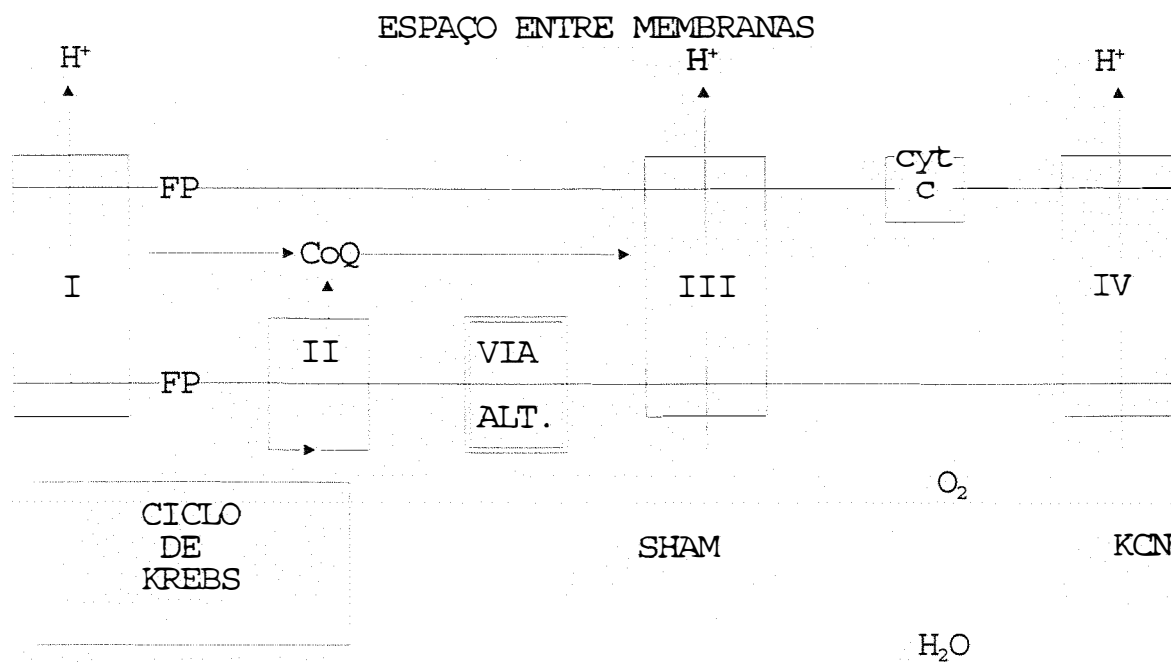
O tratamento de células com cloranfenicol para induzir a via alternativa em *Neurospora crassa*, tem mostrado que os genes que codificam para a oxidase alternativa são nucleares e que síntese proteica em ribossomos do citosol são necessárias para a produção da via alternativa (LAMBOWITZ & SLAYMAN, 1972; EDWARDS et al., 1974). BERTRAND et al. (1983) selecionaram mutantes que são incapazes de induzir a via alternativa, utilizando as mesmas condições onde esta é induzida pelo tipo selvagem. Os mutantes isolados pertenceram a dois grupos de complementação (*aod-1* e *aod-2*) e segregaram em cruzamentos sexuais 1:1 para resistência e sensibilidade a antimicina. Todos apresentaram complementos normais de citocromos, quando as células foram crescidas na ausência de

inibidores e a adição de cloranfenicol ou brometo de etídio ao meio de cultura causava deficiência em citocromos *a* e *b*, exatamente como o tipo selvagem, claramente demonstrando o não envolvimento de genes mitocondriais na atividade da via alternativa. Um dos mutantes *aod-1* e quatro *aod-2* não apresentaram um polipeptídeo acumulado no tipo selvagem. Baseado-se nesses fatos, os autores apresentaram a hipótese de que *aod-1* era o gene estrutural para a oxidase alternativa e o gene *aod-2* codificava um componente que é necessário para a sua expressão. Esses resultados foram mais tarde consistentes com a identificação imunológica da oxidase alternativa (LAMBOWITZ *et al.*, 1989; ELTHON *et al.*, 1989).

O papel da oxidase alternativa, sua regulação e interação com a mitocôndria, ainda não está esclarecido, apesar da oxidase ter sido parcialmente purificada (ELTHON & McINTOSH, 1986; BONNER *et al.*, 1986; MINAGAWA *et al.*, 1990) e clonada (SAKAJO *et al.*, 1991) em alguns organismos. FRESE & STAHL (1992) apresentaram um modelo onde uma lacase desempenharia o papel da oxidase alternativa em *Podospora anserina*. O aparecimento da via alternativa neste fungo está associado com a indução de fenoloxidasas do tipo lacase. O mutante mitocondrial *ex1*, o qual somente usa a via alternativa, expressa altas quantidades de lacase e morre quando inibidores de fenoloxidasas são adicionados ao meio de cultura. Em contraste, o mutante *in vivo*, deficiente em

fenoloxidase, que não apresenta o processo de senescência, e somente utiliza a via sensível ao cianeto não é afetado pela presença de inibidores de fenoloxidases.

MEMBRANA EXTERNA



MATRIZ MITOCONDRIAL

Figura 1. Cadeia ramificada do sistema de transporte de elétrons. I, II, III e IV representam os complexos NADH desidrogenase, Succinato-CoQ, b-c₁, citocromo oxidase, respectivamente. Via alt. representa via alternativa. FP representam flavoproteínas.

2.6. SENESCÊNCIA EM FUNGOS FILAMENTOSOS

O termo senescência descreve um conjunto de processos degenerativos que eventualmente resultam na morte de um organismo. Em fungos filamentosos, este fenômeno ocorre em culturas que são mantidas em contínua propagação vegetativa e culmina com a morte da ponta das hifas nas culturas em crescimento (revisado por BERTRAND, 1983; GRIFFITHS, 1992). Nas diferentes espécies de fungo onde o fenômeno vem sendo extensivamente estudado, senescência acompanha deficiência em citocromos *aa*, e/ou *b* (McDOUGALL & PITTENGER, 1966; BERTRAND & PITTENGER, 1969, 1972; BELCOUR *et al.*, 1982), em alguns casos, deficiências em RNA ribossômicos mitocôndriais, e a indução da via alternativa (RIECK *et al.*, 1982; SEIDEL-ROGOL *et al.*, 1989).

O determinante genético para senescência é herdado maternalmente (MARCOU, 1961; BERTRAND, 1983), no entanto existem casos de esterilidade feminina, onde o processo degenerativo não é herdado na progênie de cruzamentos entre machos senescentes e fêmeas normais. Entretanto, fertilidade pode ser observada, sendo atribuída a um citoplasma que contém um mosaico entre mitocôndrias normais e deficientes, onde o protoperitécio formado nestes cruzamentos contém suficiente citoplasma normal para funcionar normalmente, enquanto que o citoplasma contendo a maior proporção de fatores que provocam

a senescência são inférteis (McDOUGALL & PITTINGER, 1966). Em *Podospora* quando linhagens senescentes são cruzadas como fêmea, a progênie pode ser ou toda senescente ou toda normal, mas nunca senescência é encontrada quando a linhagem normal é cruzada como o parental feminino (MARCOU, 1961), sendo válida a mesma explicação anterior.

Senescência é transmitida através de fusão de hifas, que se dá livremente entre linhagens compatíveis (DEBETS et al., 1994; GRIFFITHS, 1992). Em *Neurospora* pode-se forçar a formação de heterocários, utilizando-se mutantes auxotróficos, transferindo-se plasmídios responsáveis por senescência, inclusive entre diferentes espécies (GRIFFITHS, et al., 1990).

Senescência pode ser atribuída a genes nucleares, são os chamados mutantes *morte natural* (*nd - natural death*) em *Neurospora* (SHENG, 1950). Neste caso, a predisposição a senescência é controlada por um gene recessivo nuclear, e se assemelha a senescência transmitida citoplasmaticamente no que diz respeito a acumulação de mitocôndrias que contém DNA anormal, deficiência em citocromos *aa*, *b* e subunidade menor dos ribossomos mitocôndriais (SEIDEL-ROGOL et al., 1989).

Alterações no conteúdo de DNA mitocondrial geralmente acarreta no fenótipo de respiração deficiente, caracterizado pela indução da via alternativa. Essas alterações podem ser desde mutações de ponto, pequenas deleções, inserções e até amplificação de sequências ou perda

total do DNA mitocondrial. Mutações no DNA mitocondrial podem ser obtidas espontaneamente a partir de repetidas transferências em meio de cultura (BERTRAND & PITTINGER, 1964) ou através de tratamentos com mutagênicos como brometo de etídio, luz ultra-violeta e raios X (McDOUGALL & PITTINGER, 1966; NIAGRO & MISHRA, 1989). A maioria dos estudos nesta área foram feitos em mutantes *petite* em *Sacharomyces cerevisiae*, mutantes *poky*, *stopper* e linhagens contendo plasmídios lineares em *Neurospora*, mutantes *ragged* em *Aspergillus amestelodami* e senescência em *Podospora anserina*. Morfologicamente, *petite* e *poky* são caracterizados como pequenas colônias de crescimento retardado; mutantes *stopper* apresentam crescimento cíclico, com períodos de crescimento e repouso; *ragged* apresentam colônias com extremidades irregulares; e senescentes apresentam um crescimento vegetativo limitado.

A mutação *poky* é caracterizada por uma deficiência na subunidade menor dos ribossomos mitocôndriais (S-rRNA) (RIFKIN & LUCK, 1971). Uma pequena deleção de 4 pb no gene para S-rRNA, resulta no processamento aberrante desta subunidade, reduzindo substancialmente a eficiência da tradução mitocondrial (AKINS & LAMBOWITZ, 1984). Conseqüentemente, esses mutantes são deficientes para citocromos *a* e *b* e apresentam um aumento considerável da produção de citocromo *c*. A concentração de citocromos varia

com a idade da cultura, após um certo número de dias eventualmente os citocromos *a* e *b* podem ser detectados em níveis inferiores aos encontrados no tipo selvagem (HASKINS et al., 1953).

Os mutantes *stopper*, diferem do tipo selvagem por seu crescimento irregular (McDOUGALL & PITTINGER, 1966; BERTRAND & PITTINGER, 1969). O DNA mitocondrial desses mutantes apresentam deleções de tamanhos variáveis, sendo encontradas deleções pequenas de 7 pb-75 pb até grandes deleções que chegam a representar metade do genoma mitocondrial. Em todos os casos, as mutações envolvem a região que compreende os genes para rRNA e tRNA (MANELLA et al., 1979; BERTRAND et al., 1980; GROSS et al., 1984). Senescência em *Neurospora* pode ainda estar associada a integração de plasmídios lineares no DNA mitocondrial. Dois plasmídios podem estar envolvidos neste fenômeno, *kalilo* (kal-DNA) isolado em linhagens de *Neurospora intermedia* (RIECK et al., 1982; BERTRAND et al., 1985) e *maranhar* (Mar-DNA) isolado em linhagens de *Neurospora crassa* (COURT et al., 1991; COURT & BERTRAND, 1992). O processo de senescência é iniciado quando esses plasmídios são inseridos no DNA mitocondrial, entretanto, o que leva a inserção não está ainda definido (GRIFFITHS, 1992).

Senescência em *Podospora* difere dos outros fungos filamentosos pois todas as raças senescem após contínua

propagação vegetativa em meio de cultura sólido e a duração da cultura é uma característica específica de cada raça (SMITH & RUBENSTEIN, 1973 a, b). Entretanto, condições de culturas e algumas mutações nucleares podem prolongar a duração da cultura. Sabe-se que culturas que contém alelos mutantes para certos genes nucleares que determinam morfogênese podem prolongar ou até permitir sua propagação indefinida, como é o caso de linhagens *incoloris vivax (i viv)* (ESSER & KELLER, 1976). Genes para tipo de reação sexual também contribuem para a média de vida das culturas (BELCOUR *et al.*, 1991).

O DNA mitocondrial de uma linhagem senescente sofre rearranjos; sequências de DNA contendo repetições em tandem são excisadas do DNA mitocondrial e amplificadas, sendo capazes de replicação autonôma, e são chamados sen-DNA (revisado por KUCK, 1989). Os sen-DNAs são moléculas de DNA, circulares, fechadas covalentemente e derivadas das diferentes regiões do DNA mitocondrial, designadas por letras gregas (α , β , γ , etc.). O evento mais frequente envolve o intron móvel α do gene para a subunidade I da citocromo oxidase. Este intron não está presente em espécies relacionadas como *Podospora curvívola*, que não senesce (revisado por GRIFFITHS, 1992). Em um certo número de dias da cultura em crescimento, o sen-DNA é excisado, sendo amplificado devido a presença de origem de replicação. O modelo de excisão proposto indica a atividade de uma transcriptase reversa que gera uma cópia do RNA do intron

α . Este cDNA pode ser convertido em DNA dupla fita e circularizado para produzir um α sen-DNA, autônomo em replicação (OSIEWACZ & ESSER, 1984). Novamente, o que dispara a excisão do α sen-DNA não é conhecido.

Os mutantes *ragged* em *Aspergillus amstelodami*, quando crescidos em meio sólido, produzem colônias com extremidades irregulares e morte das pontas das hifas em culturas em crescimento. A análise do DNA mitocondrial mostra a presença de sequências de DNA amplificadas em forma circular, que são denominados *rgd*DNAs (LAZARUS, et al.; LAZARUS & KUNTZEL, 1980, 1981). Na linhagem mutante *Rgd*₁, a sequência amplificada está mapeada perto do gene da subunidade maior do ribossomo, enquanto que em *Rgd*₃, as sequências amplificadas estão localizadas entre os genes que codificam para citocromo b e subunidade 6 da ATPase. Como os demais casos, os mutantes apresentam uma série de defeitos fisiológicos, incluindo citocromos anormais e altos níveis de respiração pela via alternativa.

2.7. SENESCÊNCIA E O FENÔMENO DE SUPRESSIVIDADE

Supressividade é o fenômeno onde mutação em uma molécula de DNA de uma única mitocôndria acumula-se na célula em detrimento das mitocôndrias normais. Foi primeiro observado em mutações *petite* de *Saccharomyces cerevisiae*, os quais

formam colônias pequenas e apresentam uma série de rearranjos e deleções no DNA mitocondrial (EPHRUSSI *et al.*, 1955; revisado por PISKUR, 1994). Existem três classes de mutantes *petite*: neutro, supressivo e hipersupressivo. No caso de neutro, o fenótipo *petite* e DNA mitocondrial deficientes não são transmitidos em cruzamentos sexuais entre linhagens *petite* e normal. Em mutantes supressivos, de 1% a 99% da progênie herda as características. A terceira classe, dos hipersupressivos, toda a progênie herda as características. Não se sabe o que leva a acumulação de mitocôndrias com DNA anormal em *petites* ou nos casos de senescência em fungos filamentosos, no entanto existem alguns modelos propostos para o caso.

O primeiro modelo é o chamado "vantagem em replicação", e sugere que pequenas sequências excisadas do genoma mitocondrial apresentam uma vantagem em replicação, pois são menores e portanto podem apresentar maior número de origens de replicação por unidade. No entanto, não se tem evidências que estes DNAs apresentem maior número de origens de replicação. Além do mais, o modelo não explica porque mutações de ponto e inserções de plasmídios podem ser supressivas (revisado em PISKUR, 1994).

O segundo modelo, proposto por PERLMAN & BIRKY (1974), é chamado "conversão gênica", ocorre durante processos de recombinação entre DNA normal e mutante.

Considerando que o DNA mutante apresenta deleções que o torna menor que o DNA normal, o pareamento entre as duas moléculas favorece a formação de um laço no DNA normal que não encontra homologia no DNA mutante. O laço subsequentemente é excisado e degradado por nucleases num mecanismo de reparo. Novamente, este modelo só explica deleções e não inserções ou ampliações. Um terceiro mecanismo somente desenvolvido para leveduras, sugere a segregação preferencial do DNA mutante na formação dos brotos durante a divisão celular (revisado em PISKUR, 1994).

A última hipótese desenvolvida para fungos filamentosos sugere o acúmulo de mitocôndrias deficientes como um resultado de um mecanismo que controla proliferação mitocondrial em células (BERTRAND, 1986). Este mecanismo determina que mitocôndrias que não respiram devidamente (detectado pela indução da via alternativa) são induzidas a dividir. O tipo normal respirando devidamente não é induzido a se dividir, levando consequentemente a sua reposição gradual da população de mitocôndrias. Esse modelo implica que as moléculas de DNA devem apresentar mutações que afetam a cadeia respiratória e que as mitocôndrias são entidades autônomas, não existindo complementação entre elas. Em fungos filamentosos, supressividade está associada com respiração deficiente. Mutações em genes mitocôndriais que levam a resistência a antibióticos, por exemplo, não são supressivas,

eventualmente mitocôndrias normais desaparecem se a cultura é mantida em meio seletivo.

A relevância do estudo de supressividade tem se mostrado cada vez maior, este trabalho mostra sua aplicação em controle biológico de doenças em plantas. Supressividade vem sendo associada a doenças em humanos causadas por mutações em DNA mitocondrial, como encefalomiopatias. Nestes casos, geralmente, o indivíduo nasce normal e o processo degenerativo é desencadeado com o tempo. YONEDA *et al.* (1992) mostram evidências do desaparecimento de DNA mitocondrial normal em favorecimento de DNA mutante (mutação de ponto) em culturas de células ao longo de subculturas. O fenótipo de respiração alterada também é uma das características encontradas com a tomada de DNA mutante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens

As linhagens de *C. parasitica* utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Linhagens de *C. parasitica* utilizadas neste trabalho e os respectivos fenótipos quanto a virulência, presença de dsRNA, coloração do micélio e origem.

Linhagens	Virulência ^a	dsRNA ^b	Coloração ^c	Origem
Ep155	+	-	laranja	CHOI & NUSS, 1992
EpBEN3	+	-	laranja	Obtida neste trabalho
80-2C	+	-	marrom	^d
Ep339	+	-	laranja	ANAGNOSTAKIS, 1982
CL1-16	+	-	laranja	GARROD <i>et al</i> , 1985
CL25	-	-	laranja	MAHANTI <i>et al</i> , 1993
CL25ss9	-	-	branca	MAHANTI <i>et al</i> , 1993
CL25ss4	+	-	branca	MAHANTI <i>et al</i> , 1993
Ep713	-	+	branca	CHOI & NUSS, 1992
GH2	-	+	laranja	GARROD <i>et al</i> , 1985
E	-	+	laranja	GARROD <i>et al</i> , 1985

^a Virulência: + linhagem virulenta; - Linhagem hipovirulenta;

^b dsRNA: + presença; - ausência;

^c coloração de micélio;

^d linhagem gentilmente cedida pelo Dr. William McDonald, West Virginia.

3.2. Meios de Cultivos e condições de crescimento

Foram utilizados os seguintes meios de cultivo:

- MC - meio completo descrito por PUHALLA & ANAGNOSTAKIS (1971): 2,5 g extrato de leveduras; 7,5 g extrato de malte; 62,5 ml solução de sais; em 1 l de água destilada.
- MC + BEN - meio completo adicionado de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de benomyl.
- MM - meio mínimo descrito por PUHALLA & ANAGNOSTAKIS (1971): 62,5 ml solução de sais; 2 mg tiamina; 10 g glicose; em 1 l de água destilada.

O meio de cultivo apresenta pH igual a 4,3.

Solução de sais: 24 g NH_4SO_3 ; 16 g KH_2PO_4 ; 4 g Na_2SO_4 ; 8 g KCl; 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g CaCl_2 ; 8 ml solução de elementos traços; em 1 l de água destilada.

Solução de elementos traços: 30 mg H_3BO_3 ; 79 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 200 mg ZnCl_2 ; 20 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 50 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 200 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; em 1 l de água destilada.

Em caso de meio sólido, ágar a concentração final de 2 % foi adicionado ao meio de cultura.

- BDA - meio comercial de batata com ágar ("Potato Dextrose Agar" - Difco).
- BDB - meio comercial de batata líquido ("Potato

Dextrose Broth" - Difco).

- Meio de Vogel - descrito por VOGEL (1956): 20 ml solução de sais; 20 g glucose; 1 mg biotina; 1 ml elementos traços; em 1 l de água destilada.

Solução de sais: 125 g citrato de sódio; 16 g KH_2PO_4 ; 100 g NH_4SO_3 ; 19 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5 g CaCl_2 .

Solucao de elementos traços: 5 g ácido cítrico; 3,12 g $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,28 g $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,25 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,066 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,050 g H_3BO_3 ; 0,050 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; em 1 l de água destilada.

Todos os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave por 20 min.

Culturas de *C. parasitica* foram mantidas em MC a temperatura ambiente (25 C) sob luz fluorescente e fotoperíodo de 16 hr.

3.3. Extração de dsRNA (adaptado de DAY et al., 1977)

3.3.1. Preparação das amostras

O fungo foi crescido em meio de cultivo completo (MC) e líquido por 10-14 dias, o micélio filtrado em funil de Buchner através de uma membrana de nylon, a seguir lavado com água destilada e seco em toalha de papel. 3 g de micélio foi

triturado em almofariz e pistilo com nitrogênio líquido e o pó resultante adicionado a 10 ml de uma solução STE 2 vezes concentrado (10 x STE= 0,5 M Tris, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, pH 6,8); 0,1 ml Bentonita 5 %; 1,5 ml SDS 10 %; 15 ml fenol saturado com STE 1 x. A suspensão foi agitada em agitador (50 rpm) por 30 min a temperatura ambiente. Um bastão de vidro foi colocado dentro do tubo para ajudar na homogenização. Logo então centrifugada a 7500 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e o volume aumentado para 20 ml com 1 x STE, e 4,4 ml de etanol 95 % foram adicionados.

3.3.2. Preparação da coluna de celulose

Utilizou-se seringas plásticas de 60 ml para a construção da coluna. Na base da coluna colocou-se um filtro circular "miracloth", vertendo-se uma suspensão de celulose (2,5 g CF-11 de celulose "Whatman" em 25 ml de uma solução de STE 1x; 18% etanol), gentilmente sobre este filtro. Toda a solução de STE/etanol foi drenada da coluna antes da adição da amostra.

3.3.3. Extração de dsRNA

Adicionou-se os 24,4 ml da amostra através da coluna de celulose, em seguida 60 ml de STE/18 % etanol. O dsRNA foi

eluído da coluna pela adição de alíquotas de STE 1 x: 1 ml + 1 ml + 6 ml + 6 ml + 6 ml, para devagar remover todo o dsRNA que estava aderido a celulose. A essa solução adicionou-se 4,4 ml de etanol 95 %. Preparou-se uma nova coluna para uma segunda extração, onde o dsRNA foi eluído em 3 alíquotas de STE 1 x: 1 ml + 6 ml + 6 ml. A precipitação do dsRNA foi feita com 26 ml de etanol 95 %, a -20°C por no mínimo 2 hr. A amostra foi centrifugada a 7500 g por 30 min a 0°C. Descartou-se o sobrenadante, e o dsRNA foi suspenso em 0,5 ml de STE 1 x. O mesmo procedimento para precipitação do dsRNA foi feito uma segunda vez. A amostra em 1 x STE foi corrida em gel de poli-acrilamida a 30 %, 12 hr a 40 mA em tampão TAE (20 x TAE = 1 M Tris, 20 mM EDTA, 0,6 M acetato de sódio, pH 7,8).

3.4. Cultura de colônias monospóricas

Para a coleta dos conídios, 1 ml de água destilada e esterilizada foi vertido sobre uma colônia crescida em MC por 10 dias, a placa agitada suavemente e a suspensão de conídios coletada em tubo de ensaio. Diluições adequadas foram realizadas e o plaqueamento feito em MC. As colônias surgiram depois de 2 dias de incubação a temperatura ambiente, pequenos discos de ágar contendo colônias isoladas (visualização em microscópio estereocópico), foram transferidas para placas com MC.

3.5. Determinação do peso fresco

Três pedaços de micélio (3 mm²) crescidos em MC por 10 dias, foram repicados em frascos contendo 50 ml de MC líquido. Após dois dias de incubação a temperatura ambiente, as culturas foram colocadas sob agitação por mais um dia a temperatura ambiente. O micélio foi filtrado, deixado a temperatura ambiente por 12 horas e pesado em balança analítica.

3.6. Teste de virulência

3.6.1. Maçãs

O teste para virulência foi realizado colocando-se um disco de 7 mm de diâmetro de ágar com micélio, crescido por 10 dias em MC, dentro de uma cavidade de 9 x 7 mm em maçãs "Golden Delicious" (FULBRIGHT, 1984). As cavidades com micélio foram recobertas com fita para prevenir dissecação e as maçãs foram colocadas no interior de sacos plástico abertos por 3 semanas a temperatura ambiente, sobre a bancada. Após esse período o diâmetro da lesão foi medido.

3.6.2. Ramos de castanheiras dormentes (laboratório)

Os ramos de castanheiras foram coletados durante o inverno, e as extremidades seladas com cera comum quente. O teste para virulência em castanheiras dormentes foi realizado inoculando-se um discos de ágar com micélio, crescido por 10 dias em MC, dentro de uma cavidade de 9 x 7 mm feitos nos ramos (JAYNES & ELLISTON, 1980). As cavidades foram cobertas com fita para prevenir dissecação. Após um período de 24 dias, a área da lesão foi determinada em cm².

3.6.3. Casca de castanheiras (laboratório)

Os ramos de castanheiras foram coletados durante o verão, período no qual a casca é facilmente retirada do ramo. Segmentos de aproximadamente 3 cm foram cortados e colocados dentro de uma placa de Petri, sobre papel de filtro umidificado com água destilada (LEE *et al.*, 1992). O teste foi realizado inoculando-se um disco de ágar com micélio crescido em MC por 10 dias, sobre o centro da casca, na sua parte interna. As placas foram incubadas no escuro, a temperatura ambiente. O diâmetro da lesão foi medido após quatro dias de incubação.

3.6.4. Árvores de castanheiras (campo)

O teste em árvores de castanheiras foi realizado durante o verão. O procedimento foi o mesmo descrito no item 3.6.2.

3.7. Obtenção de mutantes resistente ao benomyl (BORCK & BRAYMER, 1974)

Uma suspensão de conídios foi submetida ao mutagênico nitroso guanidina (NTG), a uma concentração final de 4 $\mu\text{g/ml}$ por 8 min (determinado por curva de sobrevivência permitindo 5 % de sobrevivência). Diluições adequadas foram realizadas e colocadas em MC sólido adicionado de benomyl na concentração final de 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Colônias que cresceram neste meio de cultivo foram isoladas em MC contendo benomyl. Colônias monospóricas foram isoladas e uma foi escolhida ao acaso para o teste do heterocário.

3.8. Teste do heterocário

Pedaços de micélio de cada mutante respiratório, vindos de culturas crescidas por 10 dias foram pareados com a linhagem EpBEN3 sobre uma placa de Petri contendo MC (VAN ALFEN *et al.*, 1977). Após 10 dias de crescimento, pequenos

pedaços em diferentes partes da cultura foram retirados e transferidos para placas de Petri contendo MC+BEN, com o intuito de selecionar colônias que apresentavam núcleos vindos da linhagem resistente ao benomyl. Colônias monospóricas foram selecionadas para ensaios de respiração e virulência.

3.9. Cruzamento sexual

O cruzamento sexual foi feito entre linhagens do fungo utilizando o procedimento de ANAGNOSTAKIS (1979). As diferentes linhagens com reações sexuais opostas, foram cruzadas sobre ramos de castanheiras em placas de Petri com ágar-água 4 %. Os ramos foram autoclavados e colocados assepticamente no centro da placa de Petri. Discos de ágar com micélio da linhagem maternal foram colocados sobre a superfície do ágar de cada lado do ramo, e foi permitido o crescimento do fungo por 10 dias. Quando o estroma estava formado sobre o ramo, uma suspensão de conídios da linhagem paterna, coletada de uma cultura crescida em MC, foi espalhada sobre o ramo. Os dutos periteciais foram visíveis após 3-4 semanas. Os peritécios foram removidos e rolados em ágar-água (3 %), esmagados em lâmina e lamínula, ressuspensos em água destilada e plaqueados em ágar-água, após diluições adequadas. Após 24 h, as colônias foram coletadas e crescidas em MC.

3.10. Obtenção de mutantes mitocôndriais

Uma suspensão de conídios em BDB foi adicionada de 1μ /ml de brometo de etídio e incubada por 5 hr sob agitação (200 rpm, temperatura ambiente). A solução foi então vertida em uma placa de Petri e mantida sob luz ultra-violeta por 25 min (determinado por curva de sobrevivência permitindo 40 % de sobrevivência). A luz ultra violeta foi mantida o mais próximo possível da Placa de Petri contendo a suspensão de conídios. Em seguida, 1 ml foi retirado, diluições adequadas realizadas e plaqueadas em MC. Após 3 dias a temperatura ambiente, as colônias foram transferidas para MC e observadas quanto a velocidade de crescimento. As colônias que apresentavam menor crescimento foram selecionadas para os ensaios em respiração.

3.11. Ensaios de Respiração

Três discos de 3 mm^2 de ágar contendo micélio foram colocados em frascos contendo 50 ml de MC líquido por três dias, quando então foram mantidos em agitação a 200 rpm, temperatura ambiente por um dia. O micélio foi coletado, transferido para 10 ml de meio de Vogel (VOGEL, 1956) e homogeneizado 5 s em um homogenizador "Tekmar Tissuemincer".

Da solução de micélio, 3 ml mais 1 % de glucose foram introduzidos na câmara de reação do monitor de respiração "Biological Oxygen Monitor YSI model 5300". A amostra foi aerada por cerca de 30 s para a concentração final de oxigênio de cerca de 240 μ moles. O eletrodo foi rapidamente inserido na câmara de reação e o consumo de oxigênio medido. A câmara de reação foi mantida a 25°C e a suspensão de micélio constantemente agitada com barra magnética. KCN (cianeto de potássio) e SHAM (ácido salicilhidroxâmico), inibidores da cadeia de elétrons e da via alternativa, respectivamente, foram usados para analisar a capacidade relativa das culturas respirarem através de cada via. Os inibidores foram adicionados sucessivamente na câmara de reação durante a medição do consumo de oxigênio. SHAM foi adicionado de uma solução em etanol 95 % a uma concentração final de 4,17 mM, e KCN de uma solução em Tris-HCl 10,0 mM, EDTA 5,0 mM, pH 7,2 a concentração final de 1,0 mM. Novas soluções dos inibidores foram preparadas a cada semana.

Em casos onde houve a necessidade da indução da via alternativa em linhagens do tipo selvagem, cloranfenicol foi adicionado ao meio de crescimento a uma concentração final de 3 mg/ml. O cloranfenicol foi preparado em etanol 95 %, sendo que a concentração de etanol no meio de cultura foi menor que 1 %. A solução foi adicionada a cultura líquida imediatamente antes de colocá-la sob agitação por 24 hr.

3.12. Extração de DNA para PCR ("polymerase chain reaction")

A extração de DNA para PCR foi feita de acordo com HAUSNER *et al.* (1992). Discos de micélio crescidos em MC por 10 dias foram repicados em placas de Petri contendo MC líquido. Após quatro dias de incubação a temperatura ambiente, o micélio foi coletado cuidadosamente em filtro estéril de Buchner. Aproximadamente 0,5 g de micélio foram transferidos para tubo estéril com 4 ml de tampão de lise (150 mM NaCl; 50 mM EDTA; 10 mM Tris, pH 7,4; 2 mg/ml proteinase K) e 9 g de pérolas de vidro, a solução foi agitada em "Vortex" por 2 a 3 min. A seguir a solução foi incubada a 55°C, após a adição de 3 ml de tampão de lise e 1% SDS, por 30 min. O sobrenadante foi assepticamente transferido para tubos descartáveis e o DNA foi extraído duas vezes com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) como descrito em SAMBROOK *et al.* (1989). O DNA foi precipitado com 2,25 volumes de etanol 95% e lavado duas vezes com etanol 70%.

3.13. PCR

Cada amostra de DNA foi diluída de 1:10 em água destilada e esterilizada (aproximadamente 100 ng) e adicionada a seguinte reação: 8 μ l de mistura de deoxinucleotídeos trifosfatados, 10 μ l tampão da enzima Taq polimerase, 3 μ l de

MgCl₂, 1 µl de DNA, 2 µl primers, 0,5 µl Taq polimerase, 75,5 µl água bidestilada. Todos os componentes adicionados foram adquiridos em forma de "kit" da empresa Boehringer-Mannheim. O programa utilizado no incubador com temperatura controlada "PTC 100 Programmable Thermal Controller" (MJ Research, Inc) foi 30 ciclos de 93°C por 1 min (denaturação do DNA), 50°C por 1 min (pareamento dos "primers" com o DNA), 72°C por 1 min (polimerização do DNA). Antes da adição da amostra de DNA, este foi denaturado por 10 min a 95°C. A cada reação foi adicionada 1 gota de óleo mineral para evitar a evaporação da amostra. Os produtos do PCR foram levados a eletroforese por 2 hr a 75 V em um gel de agarose 1 % com 19 cm de comprimento.

3.14. Isolamento de mitocôndrias

Para a determinação das atividades enzimáticas, espectro dos citocromos *a*, *b* e *c* e extração de DNA, mitocôndrias foram isoladas por procedimento modificado de BERTRAND & PITTENGER (1969). Discos de micélio foram repicados em 10 frascos com 50 ml de BDB, sendo que após 2 dias o material foi homogeneizado e transferido para frascos com 2 litros de BDB, e mantido sob agitação a temperatura ambiente por 24 hr. O micélio foi coletado em funil de Buchner contendo papel de filtro, com sucção, lavado com água destilada e tampão de isolamento (0,44 M sucrose, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-

HCl; pH 7,4). Todos os passos a seguir foram realizados a 4°C. O micélio foi triturado com areia do mar lavada com ácido clorídrico concentrado (11,8 M). A pasta micelial foi suspensa em 200 ml de tampão de isolamento, onde foi submetida a duas centrifugações, uma de 10 min a 2500 g para precipitar restos celulares, e a segunda a 23500 g por 50 min para precipitar as mitocôndrias.

O mesmo procedimento foi utilizado para preparação de DNA, no entanto, a quantidade de material utilizado foi quatro vezes maior do que o descrito, o meio de cultura foi substituído por MC e o micélio triturado em liquidificador e depois em um moinho. Os demais passos foram como descrito acima.

3.15. Determinações de atividades enzimáticas

A preparação de mitocôndrias foi suspensa em 0,2 ml de tampão de isolamento, sendo 50 ul utilizados para ensaios enzimáticos. O espectrofotômetro utilizado foi Varian 2200/2300.

3.15.1. Citocromo oxidase

Para determinar a atividade da enzima citocromo oxidase, a oxidação de citocromo c reduzido foi seguida espectrofotometricamente a 549,5 nm, como descrito por SMITH

(1955) e modificado por NARGANG (1978). Citocromo *c* reduzido foi obtido pela adição de poucos cristais de ditionita de sódio em uma solução de citocromo *c* 20 mg/ml em tampão TE (Tris 10 mM; EDTA 5mM, pH 7,6). O excesso de ditionita de sódio foi removido borbulhando ar na solução. Na cubeta de reação foram adicionados 975 μ l de TE, 20 μ l citocromo *c* reduzido, 5 μ l da solução de mitocôndrias. A solução foi misturada rapidamente e a leitura (densidade óptica a 549,5 nm/tempo) iniciada no espectrofotômetro a temperatura ambiente.

3.15.2. Succinato desidrogenase

Após o término da reação anterior, a mesma cubeta foi utilizada para o ensaio da enzima succinato oxidase. O procedimento foi descrito por STOTZ (1955). Neste caso, procurou-se determinar a redução do citocromo *c* a 549,5 nm, bloqueando a atividade da enzima citocromo oxidase com cianeto de potássio. Adicionou-se então 5 μ l de KCN 0,1 M e 20 μ l de ácido succínico (35 mg/ml em TE) a cubeta de reação. A leitura então foi reiniciada no espectrofotômetro.

3.15.3. NADH desidrogenase

A atividade da enzima NADH desidrogenase foi

determinada da mesma forma que a atividade da enzima succinato oxidase. Na cubeta foram adicionados 970 μ l de TE, 20 μ l de citocromo *c* oxidado, 5 μ l de KCN 0.1 M, 10 μ l de NADH (concentração final de 2 μ moles).

Nos três casos, a atividade enzimática foi calculado em função da inclinação da reta obtida com o auxílio do espectrofotômetro.

3.16. Espectro dos citocromos *a*, *b* e *c*

O restante da preparação de mitocôndrias foi utilizada para obtenção do espectro dos citocromos. A leitura foi realizada entre 500 e 650 nm, região do espectro onde se encontram os picos α de absorção de luz destes citocromos. O volume da preparação de mitocôndrias foi aumentado até 2 ml com deoxicolato a 2 %, sendo os citocromos oxidados com alguns cristais de ferri-cianeto de potássio e a solução centrifugada por 5 min em microcentrífuga e dividida em 2 cubetas para a leitura. Uma delas foi usada como referência e a outra reduzida com poucos cristais de ditionita de sódio, o que permitiu a leitura pelo espectrofotômetro. O cálculo para o conteúdo de citocromos foi descrito em BERTRAND & PITTINGER (1969). Este consistiu da utilização das seguintes fórmulas:

$$\text{citocromo } a_{a_3} = A_{508} - A_{530}$$

$$\text{citocromo b} = A_{560} - [A_{575} + 0.04 (A_{550} - A_{575})]$$

$$\text{citocromo c} = A_{550} - [A_{575} + 0.04 (A_{560} - A_{575})]$$

onde A é a absorção de luz em um dado comprimento de onda.

3.17. Extração de DNA mitocondrial

Mitocôndrias foram isoladas como descrito anteriormente e purificadas segundo LAMBOWITZ (1979) em gradiente de densidade. O precipitado de mitocôndrias foi suspenso em 5 ml de 63 % sacarose em $T_{10}E_1$ (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 1 mM). O gradiente foi preparado em tubo de ultracentrífuga, com 5 ml da amostra, 4 ml de 55 % sacarose em $T_{10}E_1$, 3 ml de 44 % sacarose em $T_{10}E_1$. O rotor utilizado foi SW41 da ultracentrífuga Beckman. O gradiente foi centrifugado a 41000 rpm a 4°C por 90 min. A interface de mitocôndria formada entre as camadas de 55 % e 44 % do gradiente de sacarose foi retirada com pipeta Pasteur e diluída em 18 ml de tampão de isolamento e centrifugado a 20000 g por 20 min a 4°C. O precipitado foi então suspenso em 2 ml 0,5 % SDS + 0,2 M NaCl em $T_{10}E_5$ (Tris 10 mM pH7,4, EDTA 5 mM), e mantido a 65°C por 20 min. Proteinase K (2 mg/ml) foi adicionada e a amostra incubada por 12 hr a 37°C. O DNA foi extraído com fenol:clorofórmio com descrito em SAMBROOK *et al.* (1989).

3.18. Análise do DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI*, *BglIII* e *HpaII* por 2-3 hr a 37°C utilizando os tampões recomendados pelo fabricante (Bethesda Research Lab., In. - BRL). Os fragmentos foram separados por eletroforese em um gel de agarose 0,7 % em tampão de corrida TBE 0,5 x (TBE 5 x = 54 g Tris; 27,5 g ácido bórico; 3,8 g EDTA, pH 8,0 em 1 litro de água destilada). A eletroforese foi realizada a 40 V por 18 hr em um gel de 25 cm de comprimento. Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 30 min e fotografados.

3.19. Detecção de fenoloxidasas

A atividade da enzima lacase foi analisada diretamente em placas de Petri contendo meio completo e 1 mM guaiacol (*o*-metoxiphenol) (Sigma), adicionado após o meio de cultura autoclavado. As diferentes linhagens foram repicadas para as placas e incubadas no escuro a temperatura ambiente (FRESE & STAHL, 1992).

3.20. Análise das subunidades de ribossomos mitocondriais

Mitocôndrias foram preparadas como descrito anteriormente para preparação de DNA mitocondrial, sendo os precipitados suspensos em 400 μ l tampão HKCTD 500/50 (500 mM KCl, 50 mM CaCl₂, 25 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM DTT). Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados 250 μ l da preparação de mitocôndrias, 12,5 μ l de uma solução de puromicina 20 mM em 50 mM Tris pH 7,6. Após 10 min de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 12,5 μ l de uma solução de 20 % Triton X 100 preparado em água destilada, e imediatamente colocado sobre um gradiente de sucrose 5-20 %. O gradiente foi então centrifugado a 40000 rpm (rotor sw41) em ultracentrífuga Beckman por 3 1/2 hr. Os gradientes foram fracionados monitorando-se a absorbância a 254 nm, usando um fracionador de gradientes ISCO e monitor de ultra-violeta. A quantidade de rRNA foi determinada pela área dos picos obtidos para cada uma das subunidades.

3.21. Extração de rRNA mitocondrial

Mitocôndrias foram preparadas como descrito anteriormente para preparação do DNA mitocondrial, sendo o precipitado suspenso em 1 ml de uma solução 50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 5 mM MgCl₂; 0,44 M sacarose, sobre gelo. Em um tubo de

centrífuga foram adicionados 1,6 ml de uma solução de 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 5 mM MgCl₂; 0,4 ml SDS 20 %; 0,1 ml dietilpirocarbonato (DEPC - potente inibidor de RNases). Em seguida a solução de mitocôndrias foi adicionada, misturada invertendo-se o tubo, e mantida em gelo por 2-3 min. A mistura foi então incubada por 5 min a 37°C e centrifugada a 9500 g por 10 min a 24°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde 0,1 g/ml de NaCl foram adicionados, e o tubo incubado em gelo por 10 min. Uma centrifugação a 12000 g por 30 min a 4°C removeu todas as proteínas e a maioria de DNA presentes na amostra. O RNA foi precipitado com 2,3 volumes de etanol 95 %, lavado várias vezes com etanol 70 % e suspenso em água tratada com DEPC. O RNA foi levado a eletroforese em gel contendo 3,5 partes de agarose (concentração final de agarose 1 %), 1 parte de formaldeído, 1,1 parte de tampão de corrida 5x (10x = 0,4 M MOPS pH 7,0; NaAc, 0,01 M; EDTA, 0,01 M pH 8,0). A amostra de RNA foi preparada da seguinte forma: a 4,5 µl da amostra foram adicionados 2 µl de tampão de corrida 5x, 3 µl de formaldeído, 10 µl de formamida e 1 µl de brometo de etídio (450 µg/ml). A solução foi mantida a 65°C por 15 min, e rapidamente colocado em gelo por 2 min. As amostras foram colocadas no gel para eletroforese por 6 hr a 60 V. Todas as soluções foram preparadas com água destilada adicionada de 1 % DEPC.

3.22. Extração de rRNA citosólico

Micélio foi crescido em MC líquido, filtrado a vácuo e seco com papel toalha. Duas gramas de micélio seco foram trituradas com nitrogênio líquido, e o pó resultante foi dissolvido nas mesmas soluções descritas no item 3.20, aumentando-se todos os volumes em 4 vezes.

3.23. "Northern blot" e hibridização com sonda de DNA

O gel de RNA foi transferido para membrana de náilon (Hybond-N+, Amersham) em procedimento descrito em SAMBROOK *et al.* (1989), utilizando-se de papel toalha e filtro de papel 3MM. A transferência foi realizada por 12 hr e a ligação do RNA a membrana de náilon foi feita com "UV-Cross Linker" (Stratagene). A hibridização foi feita utilizando o "Kit Genius + luminiphos detection" (Boehringer Mannheim). O "kit" consiste de soluções para marcar o DNA através de "random primer" com um nucleotídeo deoxiuridina-trifosfatado conjugado com digoxigenina (DIG-dUTP). Após a formação dos híbridos DNA-RNA, estes são detectados através de imunensaio, utilizando anticorpo contra digoxigenina. A detecção em filme de raio X acontece quando o conjugado é defosforilado, emitindo luz. A metodologia utilizada foi recomendada pelo manual do instruções fornecido pelo fabricante.

4. RESULTADOS

4.1. Escolha da linhagem para o trabalho

A escolha da linhagem para a indução de mutantes respiratórios foi um passo bastante importante do trabalho. Esta deveria ser estável, altamente virulenta e livre de dsRNA. Relatos são comuns em fungos fitopatogênicos que perdem a virulência em cultivo de laboratório (NAIKI & COOK, 1983). Este fato poderia confundir os resultados obtidos. A linhagem escolhida foi Ep155, isolada em Connecticut, EUA (ANAGNOSTAKIS, 1984). Esta linhagem é conhecida em ensaios nacionais como constantemente virulenta, mesmo após prolongada subcultura em laboratório, e é capaz de induzir a via alternativa quando crescendo em presença de cloranfenicol (MANHANTTI *et al.*, 1993). Foi tomado cuidado de se começar com uma linhagem livre de vírus, procedendo-se a extração de dsRNA, o que pode ser visto na Figura 2. Nenhuma partícula foi encontrada na amostra de Ep155 enquanto que o controle positivo, a linhagem GH2 apresentou as quatro partículas características (PAUL & FULBRIGHT, 1988).

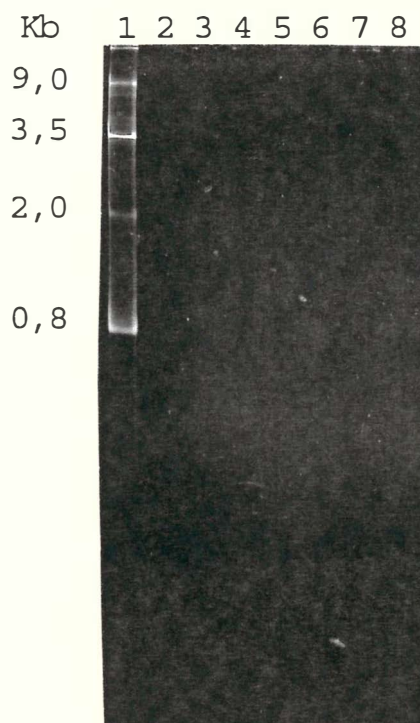


Figura 2. Extração de dsRNA das linhagens (1) GH2, contendo dsRNA; (2) Ep155, linhagem virulenta; linhagens hipovirulentas sem dsRNA (3) CL25, (4) CL25ss9; linhagens virulentas (5) CL1-16, (6) CL1-16ss17; linhagens hipovirulentas sem dsRNA (7) FC9, (8) ARN.

4.2. Obtenção de Mutantes Respiratórios

O primeiro objetivo deste trabalho foi a indução de mutantes respiratórios. Sabe-se que crescimento lento e indução da via alternativa são indicativos de mutações em genes mitocondriais. Agentes mutagênicos como luz ultra violeta e acridinas afetam ácidos nucleicos e são capazes de

produzir alterações fenotípicas que podem ser herdadas através de cruzamentos sexuais tanto em DNA nuclear quanto em DNA mitocondrial (McDOUGALL & PITTENGER, 1966). A estratégia escolhida para a obtenção de tais mutantes foi a exposição de conídios da linhagem Ep155, a uma combinação de brometo de etídio e luz ultra violeta. Brometo de etídio liga-se fortemente ao DNA intercalando-se entre os pares de bases provocando o desenrolamento do DNA, e luz ultra violeta (uv) provoca quebras no DNA. O experimento foi conduzido sem cuidados com relação ao sistema fotoativado de reparo do DNA quanto a produção de dímeros (mutações comumente provocadas pelo uso de mutagênicos como uv), pois o objetivo era produzir deleções no DNA, que levassem a defeitos respiratórios que pudessem ser detectados através da indução da via alternativa.

A primeira estratégia de seleção utilizada na busca de mutantes mitocondriais, foi selecionar colônias de crescimento reduzido em relação ao tipo selvagem. Foram analisadas 4393 colônias, sendo que 250 apresentaram crescimento reduzido em relação a linhagem Ep155. A segunda estratégia de seleção foi verificar a indução da via alternativa. Neste ensaio foi considerado a percentagem de respiração remanescente após a adição de cianeto de potássio (KCN), inibidor do transporte de elétrons através da cadeia de citocromos. Uma vez que a via alternativa é sensível ao ácido salicilhidroxâmico (SHAM), a presença da via alternativa foi

detectada pela adição de SHAM. A Figura 3 mostra o padrão de respiração para os diferentes mutantes e a linhagem Ep155. A Tabela 2 mostra que três dos mutantes (181.3, 180.17 e 53.14) apresentaram moderada inibição da via alternativa por SHAM, podendo sugerir que a cadeia de citocromos não está totalmente bloqueada, e que estas linhagens apresentam a capacidade de respirar pelas duas vias igualmente. Resultados em trabalhos relacionados mostram que a inibição da via alternativa por SHAM não é tão eficiente como no caso da inibição da cadeia de citocromos por KCN, mas inibição pode ainda ser determinada.

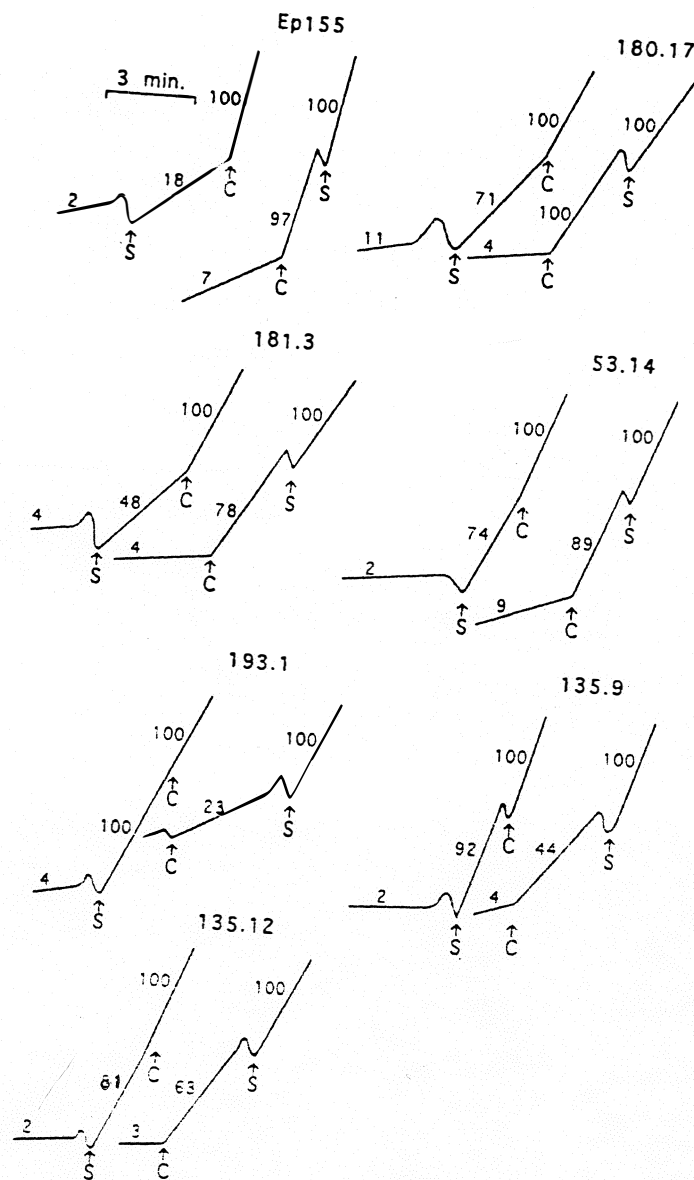


Figura 3. Padrão de respiração dos mutantes derivados da linhagem Ep155. A adição de KCN e SHAM estão indicados pelas setas marcadas C e S, respectivamente. Os números acima dos diferentes segmentos representam a percentagem da atividade de respiração iniciada (100%) restante após a adição dos inibidores. A atividade de respiração inicial representa a taxa de consumo de oxigênio antes da adição dos inibidores.

Tabela 2. Percentagem da respiração pela cadeia de citocromos e via alternativa após a adição dos inibidores KCN e SHAM, respectivamente, dos diferentes mutantes respiratórios isolados a partir de *C. parasitica*.

Linhagens	Respiração (%) *	
	KCN	SHAM
Ep155	23,20 ± 4,45	79,70 ± 18,67
53.14	79,07 ± 5,98	93,87 ± 5,64
135.9	91,77 ± 2,00	47,90 ± 6,06
135.12	79,47 ± 23,25	56,90 ± 8,17
181.3	56,67 ± 7,76	78,73 ± 0,40
180.17	69,97 ± 6,47	91,53 ± 11,09
193.1	100,00 ± 0,00	26,88 ± 8,56

* Média ± desvio padrão de três repetições

A indução da via alternativa está sujeita a alterações devido a condições de cultura e ambiente (aproximadamente 25 C). A Tabela 3 mostra ensaios de respiração em colônias monospóricas dos mutantes e EpBEN3, um mutante que apresenta resistência ao benomil, obtido a partir da linhagem Ep155. Variação entre dados é encontrada, mas Ep155 jamais apresentou elevada percentagem de respiração pela via alternativa. É sabido que mutações mitocondriais apresentam certa instabilidade atribuída a segregação de mitocôndrias normais e mutantes durante a conidiação, onde colônias de fenótipo normal podem ser encontradas a partir de um determinado

conídio devido ao predomínio de mitocôndrias de fenótipo normal.

Tabela 3. Percentagem da respiração pela via alternativa (respiração remanescente após a adição de KCN) de colônias monospóricas de *C. parasitica* isoladas dos diferentes mutantes respiratórios.

Col.	EpBEN3	Via alternativa (KCN) %					
		135.9	135.12	193.1	53.14	180.17	181.3
1	10.5	69.4	29.0	73.5	64.5	77.0	88.9
2	13.7	77.6	75.6	87.9	65.2	53.6	100.0
3	20.0	82.6	89.3	65.5	72.2	95.0	86.7
4	18.0	72.2	82.0	100.0	62.5	87.3	42.3
5	17.5	27.0	90.0	78.7	62.2	65.4	93.7
6	17.5	76.3	71.4	36.2	22.9	90.2	90.0
7	16.6	61.8	73.6	57.1	57.1	95.7	69.3
8	16.1	102.7	92.9	90.5	60.7	89.7	67.1
9	20.7	58.5	68.6	100.0	48.6	97.1	80.0
10	12.4	75.5	75.0	65.5	55.6	103.4	77.8

A morfologia dos mutantes em meio de cultivo pode ser vista na Figura 4. Os mutantes 180.17 e 181.3 apresentam morfologia semelhante ao tipo selvagem, enquanto que os mutantes 193.1, 135.9, 135.12 apresentam pouco micélio aéreo, intensa pigmentação laranja e crescimento lento em comparação com o tipo selvagem. O mutante 53.14 apresentou desde morfologia quase normal até severamente deteriorada com crescimento lento e micélio aéreo em abundância. Este trabalho pretende associar debilitação geral da linhagem como

consequência de mutações mitocondriais, que afetando a produção de energia provocam a redução no crescimento. Este atraso no crescimento levaria também a um crescimento lento nas árvores e conseqüentemente virulência atenuada. A velocidade de crescimento dos diferentes mutantes foi medida em meio de cultura sólido através da medição do diâmetro das colônias ao longo dos dias (Tabela 4, Gráfico 1). O peso fresco das linhagens crescendo em meio líquido também foi determinado (Tabela 5). Os resultados mostram que os mutantes 180.17 e 181.3 apresentam em meio sólido um crescimento comparável a linhagem Ep155, entretanto a massa micelial formada é menor que Ep155. Os demais mutantes mostram crescimento reduzido em ambas condições.



Figura 4. Fenótipo das colônias e ensaios de virulência da linhagem Ep155, mutantes respiratórios 180.17, 181.3, 193.1, 53.14, 135.9 e 135.12, e variante contendo dsRNA da linhagem Ep155, Ep713. (A) Fenótipo das colônias crescidas por cinco dias em MC. (B) Ensaio de virulência em maçãs, lesões obtidas depois de 14 dias de incubação. (C) Ensaio de virulência em ramos de castanheiras dormentes, lesões formadas depois de 40 dias de incubação.

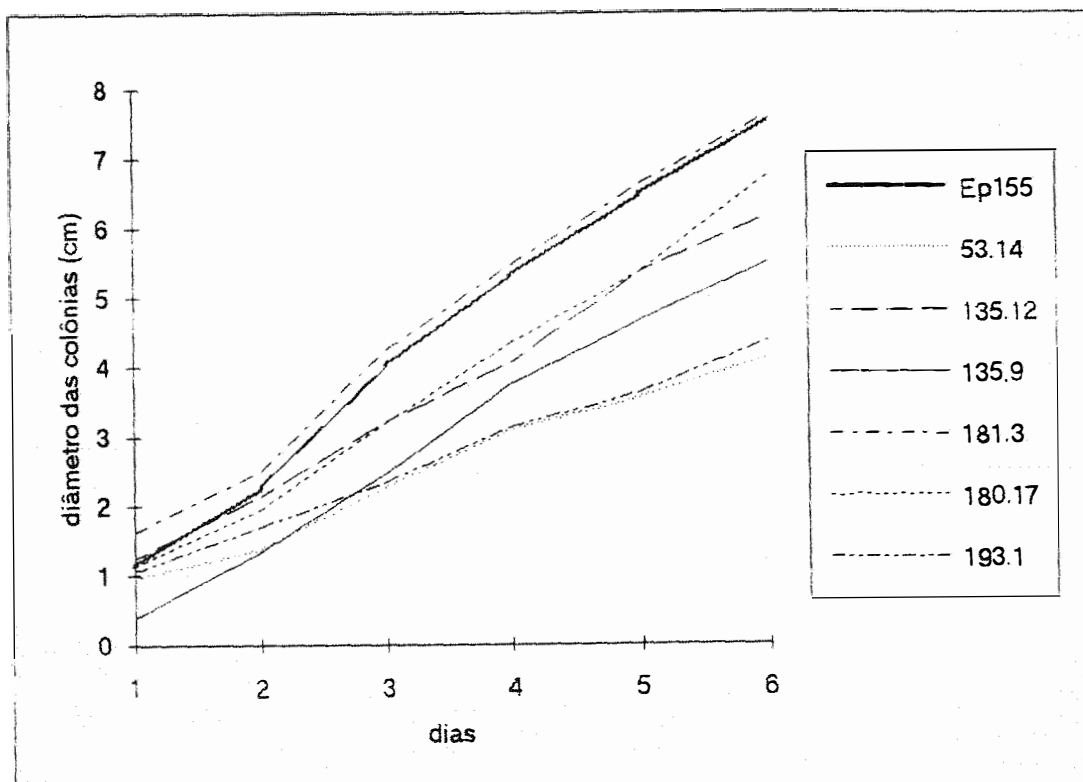


Gráfico 1. Taxa de crescimento dos diferentes mutantes respiratórios e do tipo selvagem Ep155, medido através do diâmetro da colônia ao longo dos dias, em placas de Petri contendo MC.

Tabela 4. Comparação de médias entre as colônias dos diferentes mutantes respiratórios e do tipo selvagem Ep155, após 6 dias de incubação a temperatura ambiente.

Linhagens	diâmetro (cm)
181.3	7,62a*
Ep155	7,55a
180.17	6,75b
135.12	6,17c
135.9	5,50d
193.1	4,37e
53.14	4,12e

* Teste t realizado a nível de 5% de significância.

Tabela 5. Peso fresco do micélio em miligramas das linhagens Ep155 e Ep339 e dos diferentes mutantes respiratórios de *C. parasitica*, após 3 dias de crescimento em MC líquido a temperatura ambiente.

Linhagens	Peso fresco (mg)
Ep155	39,93 ± 3,14*
Ep339	36,10 ± 3,99
180.17	17,70 ± 1,53
181.3	33,20 ± 1,25
193.1	18,73 ± 1,53
53.14	15,13 ± 1,85
135.9	19,97 ± 1,89
135.12	8,40 ± 2,23

* Média ± desvio padrão de três repetições.

4.3. Teste de virulência

Para determinar se hipovirulência, assim como respiração resistente ao cianeto, é uma das características associadas com disfunção mitocondrial o teste de virulência foi realizado em maçãs do tipo "Golden Delicious", em ramos de castanheiras dormentes e em árvores de castanheiras plantadas no campo (Tabela 6 e Figura 4). Apesar dos mutantes terem sido selecionados para altos níveis de respiração resistente ao cianeto, hipovirulência mostrou-se associada com os mutantes que cresceram mais lentamente que a linhagem Ep155 em

meio de cultura (193.1, 135.9, 135.12 e 53.14). Essas observações estão de acordo com a predição de que algumas vezes hipovirulência pode ser uma manifestação de mutações que diminuem o metabolismo energético (MAHANTI, 1993). Os dois mutantes restantes, 180.17 e 181.3 foram virulentos nos testes realizados. No teste de virulência no campo foi omitido a linhagem Ep713, portadora de dsRNA, para não ocorrer a introdução de linhagem com dsRNA naquele específico campo de teste onde dsRNA não está presente nas linhagens hipovirulentas.

Tabela 6. Comparação dos diferentes testes de virulência, em maçãs, ramos de castanheiras dormentes e árvores da linhagem Ep155, mutantes respiratórios derivados da linhagem Ep155, e um variante infectado com dsRNA da linhagem Ep155, Ep713.

Linhagens	Maçãs (cm) *	Ramos (cm ²) †	Árvores (cm) ††
Ep155	6,55 ± 0,48	28,24	3,06 ± 0,46
180.17	6,13 ± 0,87	12,21	2,89 ± 0,45
181.3	5,48 ± 0,08	21,95	3,18 ± 0,32
193.1	1,95 ± 0,80	11,52	2,07 ± 0,35
53.14	2,43 ± 0,08	8,37	1,71 ± 0,32
135.9	2,45 ± 0,43	6,71	1,94 ± 0,28
135.12	1,83 ± 0,43	4,81	1,47 ± 0,20
Ep713	2,42 ± 0,75	8,71	-

* Média ± desvio padrão de três repetições, Diâmetro da lesão medido após 21 de incubação.

† Média de duas repetições, Diâmetro da lesão medido após 24 dias de incubação.

†† Média ± desvio padrão de seis repetições, Diâmetro da lesão medido após 30 dias de incubação.

4.4. ANÁLISE GENÉTICA

4.4.1. Teste do heterocário

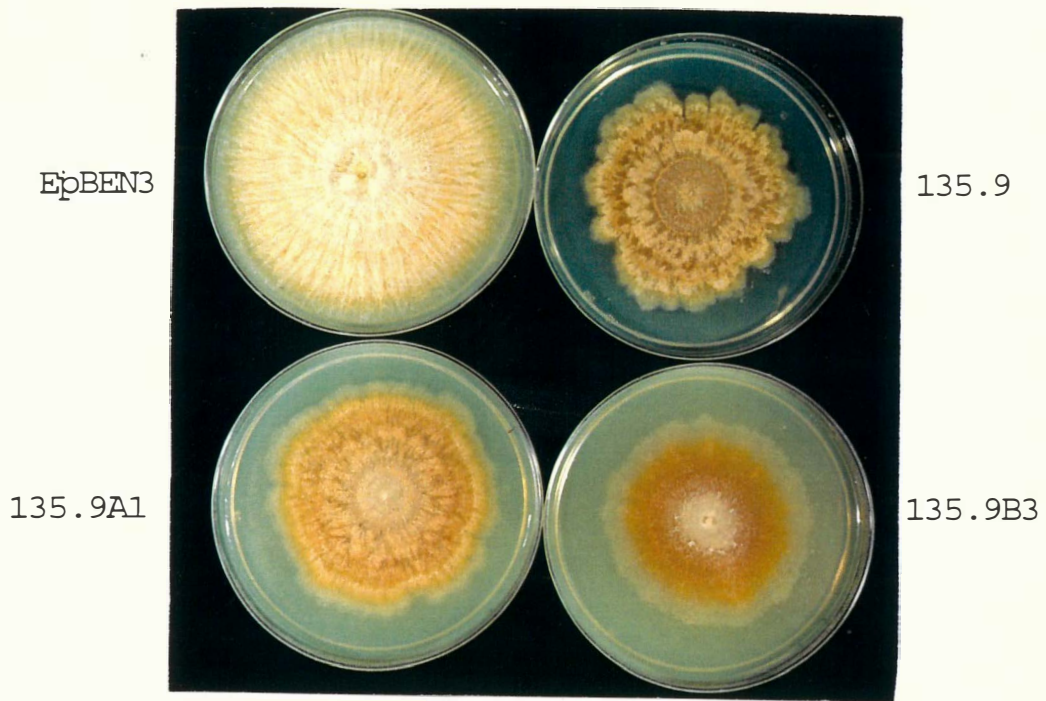
Sabendo-se que quatro dos mutantes respiratórios isolados apresentaram virulência reduzida, o próximo passo foi determinar se estas mutações são de origem nuclear ou mitocondrial. O primeiro procedimento foi tentar transferir as características (crescimento reduzido, indução da via alternativa, virulência atenuada) através de fusão de hifas. Um dos requisitos exigidos para caracterizar uma mutação de origem citoplasmática é o teste do heterocário. *Cryphonectria parasitica* permite a fusão de hifas e a formação de heterocários entre linhagens compatíveis (PUHALLA & ANAGNOSTAKIS, 1971).

Neste trabalho foi induzida uma mutação nuclear em Ep155 para resistência ao benomyl, que foi utilizada como marca de seleção após a fusão de hifas. Com relação a virulência EpBEN3 é tão virulenta quanto Ep155 (Tabela 17). Esta mutação apresenta a vantagem de ser dominante em heterocários, como demonstrado para *Neurospora* (BORCH & BRAYMER, 1974). Os mutantes de crescimento lento 193.1, 53.14, 135.9, 135.12, foram repicados dois dias antes da linhagem EpBEN3. O pareamento mutante/EpBEN3 para cada mutante foi feito em 30 placas. Foram retirados plugs da região de contato

entre as duas linhagens em quantidades aleatórias para cada pareamento.

O mutante 135.9 teve quinze plugs isolados em meio contendo benomyl, quatro não formaram colônias, dois apresentaram respiração normal e nove respiração deficiente (Tabela 7). Dessas nove colônias, duas foram escolhidas ao acaso para o isolamento de colônias monospóricas, 135.9B3 e 135.9A1 (Figura 5). A Tabela 8 mostra dois experimentos realizados com a colônia convertida e resistente ao benomyl 135.9B3. Todas as colônias monospóricas isoladas foram resistentes ao benomyl, entretanto num primeiro experimento, várias colônias apresentaram respiração normal, em um segundo experimento, após duas gerações de repicagens, todas as colônias apresentaram respiração deficiente. A Tabela 9 mostra os dados referentes a segunda colônia analisada 135.9A1. Esses resultados indicam que uma mutação de origem no citoplasma deve estar envolvida na conversão da linhagem EpBEN3 que originalmente apresentava respiração normal em respiração deficiente, uma vez que cada um dos conídios apresentam apenas um único núcleo. O mesmo tipo de resultado foi observado para o mutante 135.12 e a Tabela 10 mostra as colônias isoladas a partir da zona de contato. O convertente 135.12A2 (Figura 5) foi escolhido para a análise das colônias monospóricas (Tabela 11).

A.



B.



Figura 5. Colônias da linhagem EpBEN3 convertidas em hipovirulentas pelos mutantes 135.9 (A) e 135.12 (B), crescidas em MC por 5 dias a temperatura ambiente.

Tabela 7. Fenótipo quanto a resistência ao benomyl e respiração pela via alternativa das colônias de *C. parasitica* isoladas a partir da zona de contato no pareamento entre o mutante respiratório 135.9 e a linhagem EpBEN3.

Colônias	Resistência ao benomyl	Via alternativa (%)
EpBEN3	+	25,7 ± 7,3 ^a
135.9	-	57,8
A1	+	90,5
A2	+	100,0
A3	-	-
B1	-	-
B2	+	78,7
B3	+	76,3
B4	+	15,0
C1	-	-
C2	+	81,8
C3	-	-
GB1	+	85,9
GB2	+	94,4
GB3	+	88,2
GA1	+	100,0
GA2	+	16,9

^a Média ± desvio padrão de quatro repetições

Tabela 8. Percentagem de respiração pela via alternativa em dois diferentes experimentos, da linhagem EpBEN3, do mutante 135.9, da colônia convertida 135.9B3 e colônias monospóricas 1-15, resistentes ao benomyl isoladas a partir de 135.9B3.

Colônia	EXPERIM. 1	EXPERIM. 2
	Via alternativa (%)	Via alternativa (%)
Ep155BEN3	12,6	20,3
135.9	84,0	65,0
135.9B3	58,7	75,0
1	62,2	74,0
2	41,6	53,4
3	89,4	64,7
4	14,3	77,0
5	22,4	80,0
6	64,3	76,7
7	46,4	75,8
8	70,9	95,2
9	53,8	78,6
10	22,4	45,9
11	84,1	83,2
12	30,0	63,2
13	104,9	78,1
14	67,0	89,4
15	100,0	69,1

Tabela 9. Percentagem de respiração pela via alternativa da linhagem EpBEN3, do mutante 135.9, da colônia convertida 135.9A1 e colônias monospóricas 1-10, resistentes ao benomyl isoladas a partir de 135.9A1.

Colônias	Via alternativa (%)
Ep155BEN3	22,7
135.9	81,4
135.9A1	100,0
1	65,9
2	100,0
3	100,0
4	74,1
5	98,8
6	100,0
7	100,0
8	102,0
9	100,0
10	100,0

Tabela 10. Fenótipo quanto a resistência ao benomyl e respiração pela via alternativa das colônias isoladas a partir da zona de contato do pareamento entre o mutante respiratório 135.12 e a linhagem EpBEN3.

Colônias	Resistência ao benomyl	Via alternativa (%)
EpBEN3	+	25,7 ± 7,3 ^a
135.12	-	100,0
A1	+	86,7
A2	+	46,8
A3	+	75,0
B1	+	100,0
B2	+	100,0
B3	+	100,0
GA1	+	23,0
GA2	+	100,0

^a Média ± desvio padrão de quatro repetições

Tabela 11. Percentagem de respiração pela via alternativa da linhagem EpBEN3, do mutante 135.12, da colônia convertida 135.12A2 e colônias monospóricas 1-11, resistentes ao benomyl isoladas a partir de 135.12A2.

Colônias	Via alternativa (%)
Ep155BEN3	24,7
135.12	71,4
135.12A2	89,0
1	102,2
2	100,0
3	100,0
4	100,0
5	100,0
6	100,0
7	100,0
8	100,0
9	100,0
10	100,0
11	100,0

O esperado para uma mutação nuclear seria que a colônia isolada em meio de cultura contendo benomyl não apresentasse respiração pela via alternativa, considerando que a mutação fosse recessiva. Este heterocário deveria então segregar em colônias resistentes ao benomyl, com níveis normais de respiração pela via alternativa e colônias sensíveis ao benomyl, com altos níveis de respiração pela via alternativa. A Tabela 12 mostra as colônias isoladas em benomyl e o nível de respiração pela via alternativa do pareamento entre o mutante 193.1 e EpBEN3. Todas as colônias resistentes ao benomyl apresentaram níveis normais de respiração pela via alternativa. A colônia 193.1D2 foi escolhida ao acaso para a análise de colônias monospóricas. A Tabela 13 mostra que a colônia 193.1D2 apresenta o padrão de segregação de heterocário esperado para uma mutação nuclear. No caso dos mutantes 180.17 e 181.3 conídios foram isolados diretamente da zona de contato e analisados. Os resultados estão nas Tabelas 14 e 15 e foram semelhantes ao caso do mutante 193.1

O mutante 53.14 não formou qualquer contato com a linhagem Ep155, como se algum gene para compatibilidade vegetativa tivesse sido atingido pela mutação. Para esse mutante os resultados foram inconclusivos quanto a origem da mutação.

Tabela 12. Fenótipo quanto a resistência ao benomyl e respiração pela via alternativa das colônias isoladas a partir da zona de contato do pareamento entre o mutante respiratório 193.1 e a linhagem EpBEN3.

Colônias	Resistência ao benomyl	Via alternativa (%)
EpBEN3	+	24,7 ± 5,2 ^a
193.1	-	100,0
D1	+	18,7
D2	+	17,6
D3	+	22,3
A1	+	8,9
A2	-	-
A3	-	-
A4	-	-
GA1	+	9,8
GA2	+	18,7
GB1	+	24,7
GB2	+	22,4
GB3	-	-

^a Média ± desvio padrão de três repetições

Tabela 13. Percentagem de respiração pela via alternativa da linhagem EpBEN3, do mutante 193.1, da colônia convertida 193.1D2 e colônias monospóricas 1-13, resistentes ao benomyl isoladas a partir de 193.1D2.

Linhagens	Resistência ao benomyl	Via alternativa (%)
EpBEN3	+	17,4
193.1	-	98,8
193.1D2	+	17,5
1	-	100,0
2	-	100,0
3	-	100,0
4	+	22,5
5	-	77,1
6	-	78,1
7	-	56,5
8	+	17,8
9	+	25,0
10	+	22,1
11	+	17,3
12	-	92,3
13	+	30,0

Tabela 14. Percentagem de respiração pela via alternativa da linhagem EpBEN3, do mutante 181.3 e fenótipo das colônias monospóricas 1-10, quanto a resistência ao benomyl isoladas a partir da zona de contato do pareamento entre EpBEN3 e 181.3.

Linhagem	Restência ao Benomyl	Via alternativa (%)
EpBEN3	+	20,6
181.3	-	80,8
1	-	100,0
2	-	88,0
3	+	11,1
4	+	22,2
5	-	78,8
6	-	100,0
7	-	79,5
8	-	78,1
9	-	90,1
10	+	13,3

Tabela 15. Percentagem de respiração pela via alternativa da linhagem EpBEN3, do mutante 180.17 e fenótipo das colônias monospóricas 1-12, quanto a resistência ao benomyl isoladas a partir da zona de contato do pareamento entre EpBEN3 e 180.17.

Linhagens	Resistência ao benomyl	Via alternativa (%)
EpBEN3	+	16,0
180.17	-	69,6
1	+	30,7
2	+	26,2
3	+	27,8
4	+	16,7
5	+	28,0
6	+	37,2
7	+	29,1
8	+	13,6
9	-	100,0
10	+	18,5
11	-	100,0
12	+	12,8

A transferência do fator citoplasmático que determina hipovirulência nos mutantes 135.9 e 135.12 mostra que estes devem ser mutantes em genes mitocondriais. As colônias resistentes ao benomyl com altos níveis de respiração pela via alternativa tiveram sua velocidade de crescimento em MC sólido acompanhada e sua virulência testada (Gráfico 1, Tabelas 16 e 17).

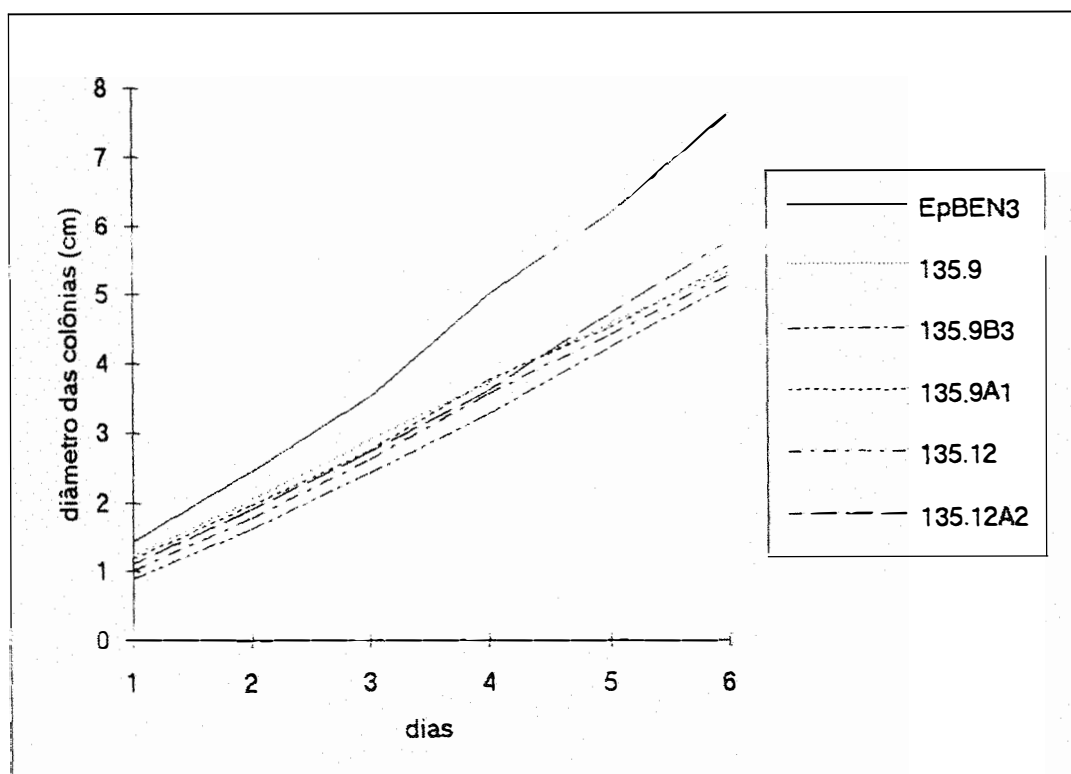


Gráfico 2. Taxa de crescimento da linhagem EpBEN3, mutantes respiratórios 135.9, 135.12 e colônias convertidas resistentes ao benomyl, 135.9B3, 135.9A1 e 135.12A2, medida através do diâmetro da colônia ao longo dos dias, em placas de Petri contendo MC

Tabela 16. Média do crescimento da linhagem EpBEN3, mutantes respiratórios 135.9, 135.12 e colônias convertidas resistentes ao benomyl, 135.9B3, 135.9A1 e 135.12A2, medida após 6 dias de incubação a temperatura ambiente.

linhagens	Diâmetro (cm)
EpBEN3	7,62a*
135.12A2	5,75b
135.9A1	5,40c
135.9	5,30c
135.12	5,25d
135.9B3	5,10d

* Teste t realizado a nível de 5% de significância

Tabela 17. Teste de virulência realizado em maçãs do tipo "Golden Delicious", das linhagens de *C. parasitica* convertidas e seus respectivos controles. O teste t foi realizado a nível de 5% de significância.

Linhagens	Diâmetro (cm) média*
EpBEN3	6,55 ^{a*}
180.17	6,50 ^a
181.3	6,47 ^a
Ep155	5,60 ^b
53.14	5,22 ^b
135.12A2	4,28 ^b
135.12	4,15 ^c
135.9A1	3,97 ^c
GH2	3,82 ^c
135.9	3,58 ^c
193.1	1,95 ^d
135.9B3	1,47 ^d

*Média de três repetições

*Teste t realizado a nível de 5% de significância

4.4.2. Cruzamentos Sexuais

Com a determinação de que em dois mutantes foi possível a transferência da mutação através de fusão de hifas, ficou de importância confirmar os resultados através de cruzamentos sexuais, visando a herança maternal da mutação. Foram utilizadas duas linhagens nos cruzamentos recíprocos com os mutantes respiratórios. Ambas com tipos de reação sexual opostos a Ep155, esta apresenta reação sexual A e as duas outras culturas apresentam tipo de reação a. Ep339 apresenta micélio de coloração laranja, enquanto 80-2c apresenta uma mutação nuclear para coloração marrom de micélio. Pelo menos 40 esporos foram analisados para cada cruzamento recíproco, isolados de 4 diferentes peritécios, e segregação de 1:1 para pigmentação marrom e laranja foi observada quando 80-2c foi um dos parentais.

Como esperado para uma característica citoplasmaticamente determinada, o fenótipo de respiração pela via resistente ao cianeto foi transmitido para a maioria da progênie sexual (95%) quando o mutante 135.9 foi cruzado como parental feminino (protoperitecial), e para nenhum descendente quando este foi cruzado como parental masculino (conidial) (Tabela 18a e b). A progênie foi examinada para polimorfismo no DNA mitocondrial e confirmou transmissão maternal do cromossomo mitocondrial como descrito previamente por MILGROOM

& LIPARI (1993) (Figura 6).

Quando o mutante 135.12 foi cruzado como o parental masculino, com Ep339 ou 80-2c, nenhum descendente mostrou o fenótipo de respiração resistente ao cianeto. Em alguns casos, poucos peritécios foram formados quando esse mutante foi usado como fêmea com Ep339 sendo o parental masculino. O fenótipo de respiração resistente ao cianeto não foi encontrado entre a progênie (Tabela 18a e b). Nenhum peritécio foi formado entre 135.12 e 80-2c, nas várias tentativas, sustentado a seguinte hipótese. Em *Neurospora crassa* os mutantes *stopper* apresentam esterilidade feminina, entretanto em alguns casos, fertilidade pode ser atribuída a um citoplasma contendo uma mistura de mitocôndrias normais e deficientes. O protoperitécio que funciona em um cruzamento deve conter suficiente citoplasma normal para funcionar normalmente, enquanto que o citoplasma contendo uma grande porção de fatores *stp* é infértil, como a maioria das culturas mutantes (McDOUGALL & PITTINGER, 1967). A progênie do cruzamento entre 135.12 e Ep339 foi examinada para o polimorfismo no DNA mitocondrial (Figura 7), e confirmou que realmente o mutante foi cruzado como fêmea apesar do fenótipo de respiração pela via alternativa não ter sido transmitido.

Em contraste, segregação 1:1 para respiração sensível e resistente ao cianeto foi encontrada nas progênies dos cruzamentos envolvendo os mutantes 193.1, 180.17, 181.3 e

53.14 tanto com Ep339 ou 80-2c, independente se esse mutante foi usado como fêmea ou macho (Tabela 18a e b). A Tabela 18 mostra os dados de todos os cruzamentos combinados, os resultados detalhados de segregação para coloração e via alternativa estão nas Tabelas 1-22 do "Apêndice". Nem todos os cruzamentos recíprocos foram conseguidos para ambas as linhagens, Ep339 e 80-2c, entretando, os resultados foram considerados suficientes, uma vez que os cruzamentos devem ser realizados em ramos de castanheiras, não justificando maiores tentativas. Esses resultados confirmam as conclusões encontradas a partir do teste do heterocário, onde os defeitos respiratórios e hipovirulência dos mutantes 135.9 e 135.12 são causadas por alelos mutantes de genes citoplasmáticos, enquanto o mesmo fenótipo de 193.1 e 53.14 e os defeitos respiratórios de 180.17 e 181.3 são resultados de mutações em genes nucleares.

Tabela 18a. Número de colônias analisadas a partir de cruzamentos recíprocos entre os mutantes respiratórios e as linhagens 80-2c e Ep339. Os números representam a quantidade de colônias que apresentaram os fenótipos combinados respiração normal e deficiente; coloração laranja e marrom.

Parental ♀	Segundo parental ♂					
	80-2c				Ep339	
	Respiração deficiente		Respiração normal		Resp. def.	Resp. norm.
Laranja	Marrom	Laranja	Marrom			
135.9	51	52	2	3	-	-
135.12	-	-	-	-	-	77
53.14	-	-	-	-	13	27
193.1	12	12	11	13	25	25
181.3	17	17	8	18	23	27
180.17	10	14	15	10	22	28
Ep155	0	0	27	23	0	47
Parental ♂	Segundo parental ♀					
135.9	0	0	41	29	0	50
135.12	0	0	23	26	0	59
53.14	-	-	-	-	27	23
193.1	9	5	13	23	-	-
181.3	10	11	16	10	-	-
180.17	5	7	12	14	18	22
Ep155	0	0	24	25	0	31

O sinal (-) significa cruzamento não realizado.

Tabela 18b. Análise do χ^2 dos resultados obtidos para os cruzamentos recíprocos entre os mutantes respiratórios e as linhagens Ep339 e 80-2c, considerando segregação de 1:1 entre colônias de respiração normal e deficiente.

Parental	Segundo parental					
	80-2c			Ep339		
	Normal	Anormal	χ^2	Normal	Anormal	χ^2
135.9	105	5	88,9**	-	-	-
135.12	-	-	-	-	77	77,0**
53.14	-	-	-	13	27	4,9 ^{ns}
193.1	24	24	0 ^{ns}	25	25	0 ^{ns}
181.3	34	26	1,06 ^{ns}	23	27	0,32 ^{ns}
180.17	24	25	0,02 ^{ns}	22	28	0,72 ^{ns}
Ep155	0	50	50,0**	0	47	47,0**

Parental	Segundo parental					
	Normal	Anormal	χ^2	Normal	Anormal	χ^2
135.9	0	70	70,0**	0	50	50,0**
135.12	0	49	49,0**	0	59	59,0**
53.14	-	-	-	27	23	0,32 ^{ns}
193.1	14	36	10,6**	-	-	-
181.3	21	26	0,36 ^{ns}	-	-	-
180.17	12	26	5,15 ^{ns}	18	22	0,40 ^{ns}
Ep155	0	49	49,0**	0	31	31,0**

0 sinal (-) significa cruzamento não realizado.

** resultados significativos a 5% de probabilidade.

^{ns} resultados não significativos a nível de 5% de probabilidade.

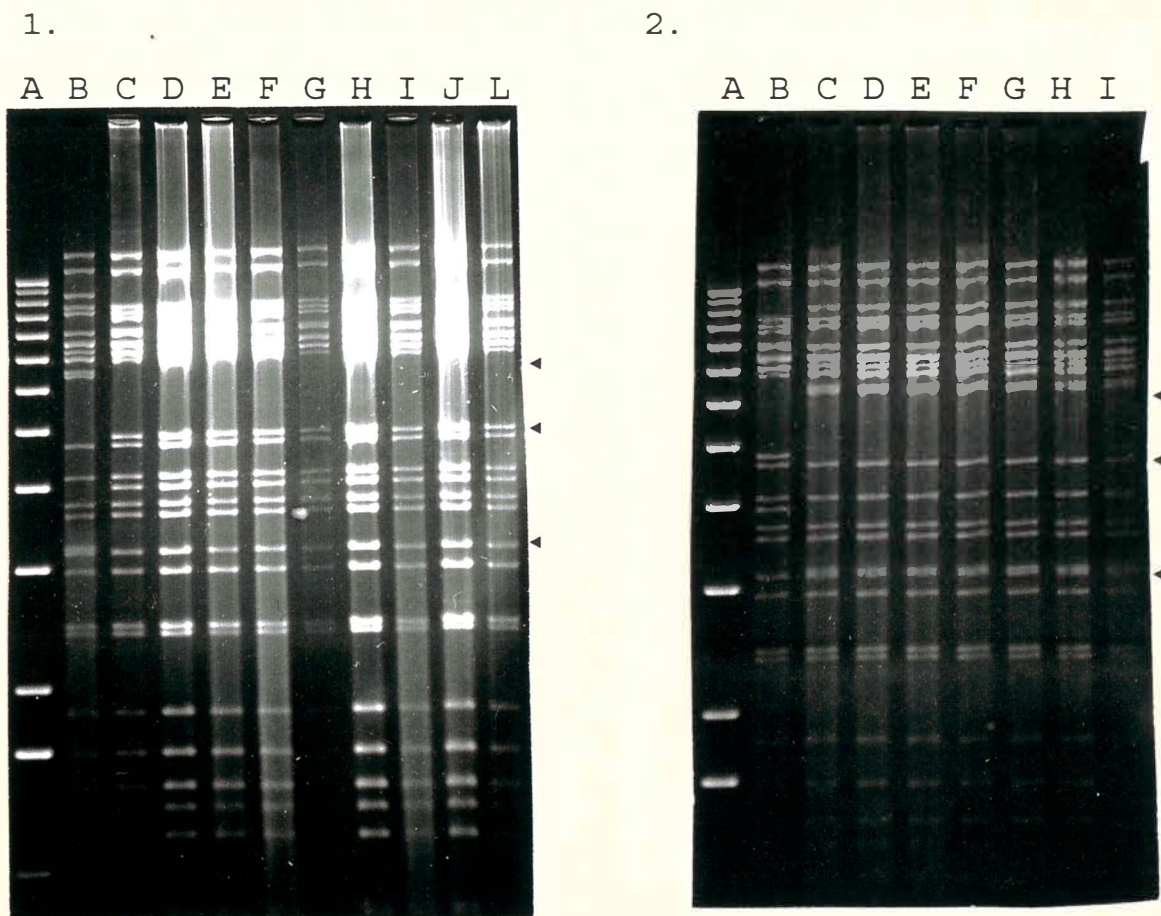


Figura 6. Fragmentos *EcoRI* de restrição do mtDNA da progênie dos cruzamentos recíprocos entre o mutante 135.9 e a linhagem 80-2c. Na margem direita, as setas identificam o polimorfismo que distingue as linhagens. (1) A, marcador de peso molecular; B, 80-2c; C-J, progênie derivada do cruzamento onde 135.9 foi o parental feminino; L, 135.9. (2) A, marcador de peso molecular; B, 135.9; C-H, progênie derivada do cruzamento onde 80-2c foi o parental feminino; I, 80-2c. O primeiro fragmento do marcador de peso molecular apresenta 12 kpb, os fragmentos decrescem 1 kpb.

4.5. Análise dos fragmentos de restrição do DNA mitocondrial

Uma vez que o fenômeno de senescência, citoplasmaticamente herdado em *Neurospora*, *Podospora* e *Aspergillus* é causado algumas vezes por um gradual acúmulo de derivativos deficientes do cromossomo mitocondrial (GRIFFITHS, 1992), o número e tamanho dos fragmentos de restrição de *EcoRI* do DNA mitocondrial dos seis mutantes foram comparados com os fragmentos do mtDNA da linhagem Ep155 (Figura 8). A princípio nenhuma diferença significativa foi encontrada, sugerindo que os defeitos respiratórios deveriam ser causados por mutações de ponto nos mutantes citoplasmáticos 135.9 e 135.12, e por mutações nucleares que não afetam a estabilidade do DNA mitocondrial nos mutantes 180.17, 181.3, 193.1, e 53.14.

Entretanto, em novas preparações de DNA, sequências de DNA amplificadas puderam ser detectadas nos mutantes citoplasmáticos. Estas sequências serão discutidas a seguir no item 4.7.

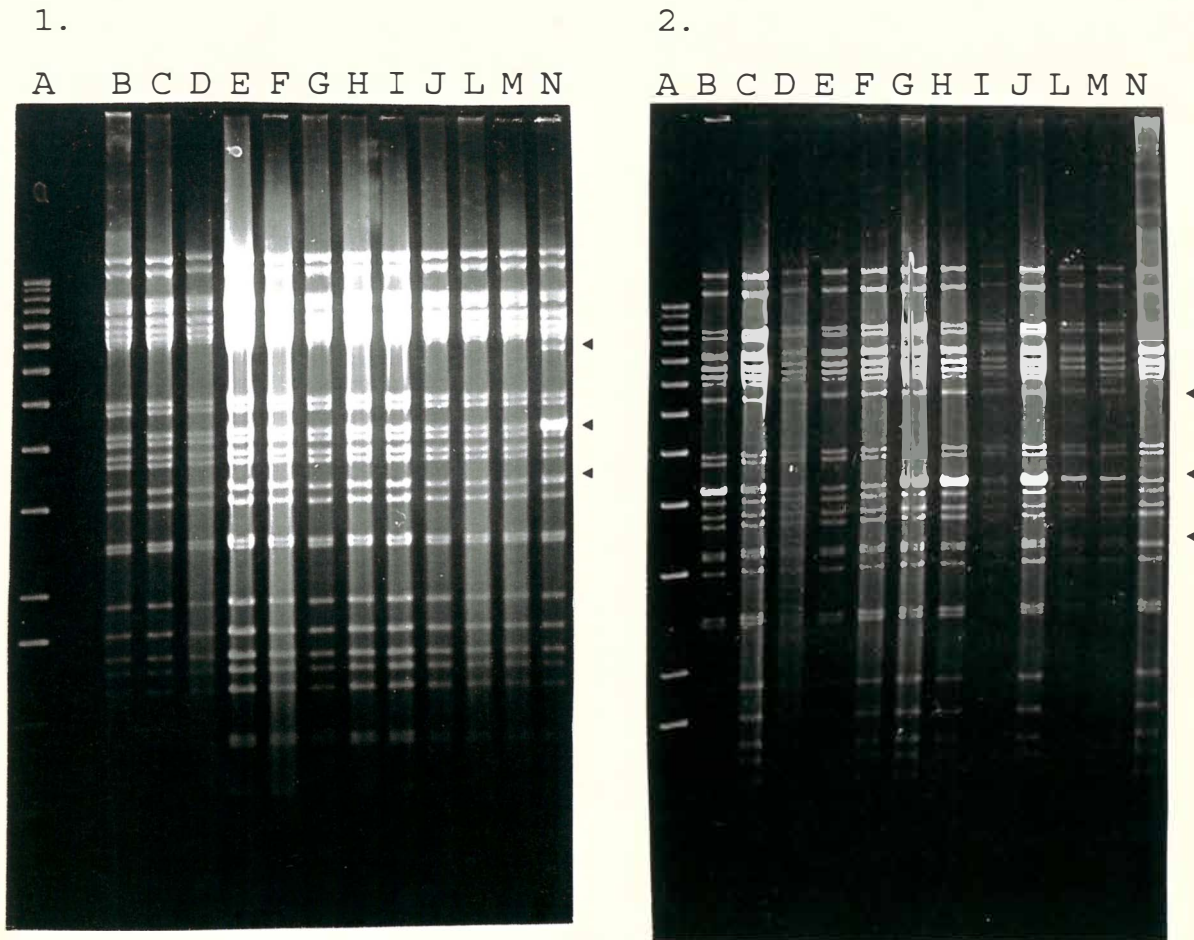


Figura 7. Fragmentos *EcoRI* de restrição do mtDNA progênie dos cruzamentos recíprocos entre o mutante 135.12 e a linhagem Ep339. Na margem direita, as setas identificam o polimorfismo que distingue as linhagens. (1) A, marcador de peso molecular; B, 135.12; C-M, progênie derivada do cruzamento onde 135.12 foi o parental feminino; N, Ep339. (2) A, marcador de peso molecular; B, Ep339; C-M, progênie derivada do cruzamento onde Ep339 foi o parental feminino; N, 135.12. O primeiro fragmento do marcador de peso molecular apresenta 12 kpb, os fragmentos decrescem 1 kpb.

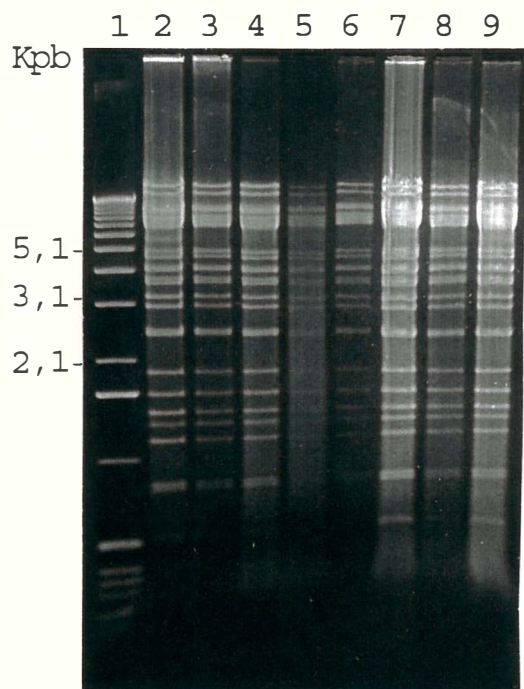


Figura 8. Fragmentos de restrição da enzima *EcoRI* do DNA mitocondrial dos mutantes respiratórios derivados da linhagem Ep155. (1) marcador de peso molecular; (2) Ep155; (3) 180.17; (4) 181.3; (5) 193.1; (6) 53.14; (7) 135.9; (8) 135.12. A margem direita mostra os pesos moleculares dos diferentes fragmentos na linha contendo o marcador molelular.

4.6. INVESTIGANDO AS CAUSAS DAS MUTAÇÕES

Para determinar o papel do DNA mitocondrial na geração e transmissão de hipovirulência nos mutantes citoplasmáticos foi necessário identificar funções mitocondriais que poderiam ser afetadas pela mutação mitocondrial. Mutações nucleares devem também de alguma forma apresentar efeitos em funções mitocondriais.

4.6.1. Ensaaios enzimáticos

Análise de algumas das enzimas relacionadas a cadeia respiratória foi a primeira etapa. Todos os mutantes foram submetidos aos ensaios e os resultados são mostrados na Tabela 19. As enzimas escolhidas foram NADH desidrogenase (NADH), succinato desidrogenase (SO) e citocromo oxidase (CO). A atividade das enzimas SO e NADH são mostradas em relação a atividade da enzima citocromo oxidase. Em *Neurospora crassa* a relação determinada pelo tipo selvagem é de 2 CO/SO : 1 CO/NADH e mutantes apresentam desvios dessa relação. Como pode ser observado para *Cryphonectria parasitica*, os resultados são variáveis e inconclusivos. O ensaio dessas enzimas mitocondriais não foi uma estratégia eficiente pois foram influenciados por pigmentos no micélio. A preparação de mitocôndrias a partir dos mutantes apresenta uma intensa

coloração laranja que impede totalmente a leitura pelo espectrofotômetro nas condições utilizadas.

O tipo de resultado esperado por esse ensaio poderia determinar, por exemplo, se a enzima citocromo oxidase sendo codificada por genes mitocondriais estaria afetada em relação a atividade das duas outras enzimas, apontando para uma possível deficiência em citocromo aa_3 .

Tabela 19. Relação de atividades das enzimas citocromo oxidase (CO), succinato desidrogenase (SO) e NADH desidrogenase (NADH) em preparações de mitocôndrias dos mutantes derivados da linhagem Ep155.

Linhagens	Relação da atividade enzimática	
	CO/SO	CO/NADH
Ep155	5,33 ± 2,01*	0,47 ± 0,30
180.17	5,38 ± 5,21	0,46 ± 0,26
181.3	6,56 ± 4,05	0,72 ± 0,58
193.1	9,67 ± 12,02	0,54 ± 0,61
53.14	4,09 ± 1,21	0,44 ± 0,08
135.9	2,86 ± 1,63	0,38 ± 0,40
135.12	3,54 ± 1,77	0,53 ± 0,28

* Média ± desvio padrão de três repetições

4.6.2. Espectro dos citocromos mitocondriais

Para tentar sobrepor a barreira da presença desse pigmento laranja impedindo a visualização do espectro dos citocromos em mitocôndrias dos mutantes respiratórios, a progênie de coloração marrom dos cruzamentos entre os mutantes e a linhagem 80-2c foram utilizadas nos ensaios. Os mutantes que puderam ser analisados foram 193.1, 180.17, 181.3 e 135.9. O mutante 135.12 não formou peritécio em cruzamentos onde este foi utilizado como o parental feminino com a linhagem 80-2c e o mutante 53.14 não formou peritécio em nenhum dos cruzamentos recíprocos com a linhagem 80-2c, nas várias tentativas.

A Tabela 20 mostra a relação entre os citocromos dos diferentes mutantes e das linhagens Ep155 e 80-2c. O espectro de absorção de luz dos citocromos pode ser visto na Figura 9. Como pode ser observado, o mutante 135.9 é deficiente em citocromo aa_3 (citocromo c oxidase), onde três das subunidades são codificadas por genes mitocondriais. Confirmando que uma mutação de ponto nesse gene pode ser responsável pela indução da via alternativa, redução em crescimento e virulência atenuada. É comum em outros fungos onde o fenômeno de senescência está envolvido, deficiências em citocromos a e/ou b, tais mutações podem ser supressivas, como parece ser o caso do mutante 135.9. Em paralelo com mutantes mitocondriais em *Neurospora*, mutantes que apresentam deficiência somente em

citocromo *a* apresentam fertilidade normal podendo ser usados em cruzamentos sexuais. Em constraste, alguns mutantes que são deficientes para citocromos *a* e *b*, apresentam esterilidade feminina, este poderia ser o caso do mutante 135.12.

Os mutantes nucleares 180.17 e 181.3 apresentam uma alteração na relação de citocromos determinada pelo tipo selvagem. Os dados mostram que eles apresentam quantidades reduzidas de citocromos *a* e *b* e com elevada quantidade de citocromo *c*. Isto pode indicar que a síntese de proteínas mitocondriais não está sendo eficiente, uma vez que o citocromo *b* também apresenta quantidades reduzidas, e ambos citocromos *a* e *b* possuem subunidades codificadas por genes mitocondriais.

O mutante 193.1 apresentou quantidades variáveis de citocromos *a* (Figura 9), podendo indicar que uma mutação nuclear está afetando indiretamente a produção deste citocromo *a*. A causa da mutação que provoca hipovirulência neste mutante permanece desconhecida.

Tabela 20. Relação das quantidades de citocromos aa_3 , b e c nos mutantes derivados da linhagem Ep155 e linhagem 80-2c.

Linhagens	Relação das quantidades de citocromos		
	a/b	a/c	b/c
80-2c*	$0,390 \pm 0,10$	$0,64 \pm 0,19$	$1,58 \pm 0,10$
135.9†	$0,018 \pm 0,04$	$0,014 \pm 0,03$	$0,89 \pm 0,19$
180.17	$0,310 \pm 0,10$	$0,160 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,07$
181.3	$0,320 \pm 0,18$	$0,210 \pm 0,10$	$0,68 \pm 0,08$
193.1††	$0,220 \pm 0,21$	$0,240 \pm 0,23$	$1,55 \pm 0,61$
Ep155	$0,54 \pm 0,01$	$0,530 \pm 0,11$	$0,98 \pm 0,20$

* Média \pm desvio padrão de quatro repetições

† Média \pm desvio padrão de três repetições

†† Média \pm desvio padrão de cinco repetições

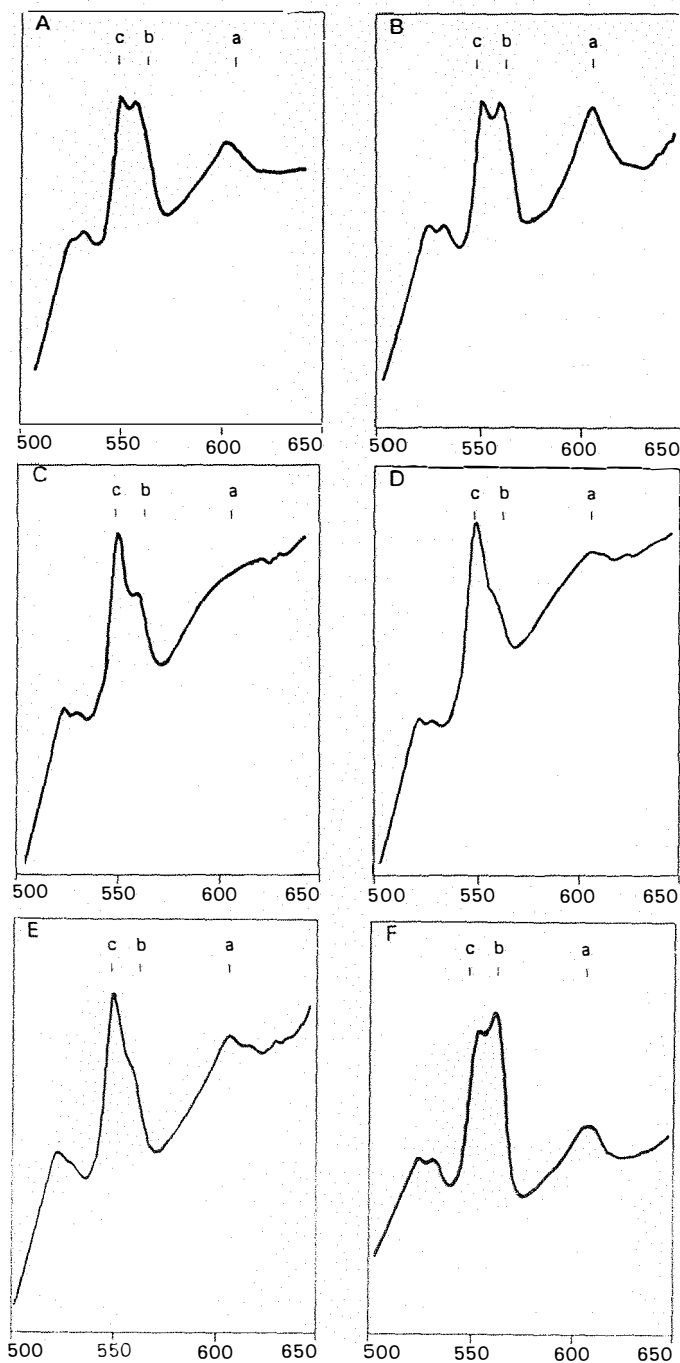


Figura 9. Espectro de absorção de luz dos citocromos de mitocôndrias isoladas das linhagens (A) 80-2c; (B) Ep155; (C) 135.9; (D) 180.17; (E) 181.3; (F) 193.1. As letras a,b,c representam os picos de absorção para cada citocromo e os números abaixo de cada espectro, os comprimentos de onda dados em nm.

4.6.3. Análise dos ribossomos mitocondriais

Os mutantes 180.17 e 181.3 sugerem, pelo espectro de absorção de luz dos citocromos, a presença de problemas na síntese de proteínas mitocondriais. Os demais mutantes apresentam a formação dos ribossomos aparentemente normal. Relatos anteriores em *Neurospora crassa* mostram que mutantes em processamento de RNA ribossômico mitocondrial podem levar a deficiência em citocromos *a* e *b*, como os detectados nos mutantes 180.17 e 181.3 (BERTRAND *et al.*, 1982).

O RNA mitocondrial dos mutantes e da linhagem Ep155 foram extraídos para verificar se este poderia ser o caso dos mutantes 180.17 e 181.3 (Figura 10). Como pode ser observado, existe um acúmulo de uma banda extra maior do que a subunidade maior dos ribossomos nos mutantes 180.17 e 181.3. Para confirmar se este RNA é um precursor da subunidade maior, este foi hibridizado com um plasmídeo pHPR4a que contém um inserto para o exon maior do gene para a subunidade maior do ribossomo mitocondrial de *Neurospora crassa* (BERTRAND *et al.*, 1982). A Figura 10 confirmou que os dois segmentos de RNA contém as mesmas sequências de nucleotídeos, provando que existe um precursor que não está sendo devidamente processado nesses mutantes. Nessa mesma figura rRNA citosólico é colocado como controle demonstrando que não existe qualquer sinal de hibridização, os rRNA em questão são mesmo de origem

mitochondrial.

Tabela 21. Relação entre as subunidade menor (S) e maior (L) dos ribossomos mitocondriais dos mutantes respiratórios derivados da linhagem Ep155.

Linhagens	S/L
Ep155	2,24 ± 1,37*
180.17	20,5
181.3	8,57
193.1	1,08
53.14	2,27
135.9	3,27
135.12	2,31

*Média ± desvio padrão de seis repetições

4.6.4. Análise de fenoloxidasas

Duas evidências a respeito da atividade da enzima lacase incentivaram a análise desta enzima neste trabalho. Primeiro, acredita-se que lacase pode estar envolvida na determinação de virulência, uma vez que os níveis de sua atividade são drasticamente reduzidos em linhagens hipovirulentas de *Cryphonectria parasitica* portadoras de dsRNA (RIGLING et al., 1989). Segundo, recente relato menciona que lacase pode ser a enzima oxidase alternativa funcional da via respiratória resistente ao cianeto (FRESE & STAHL, 1992).

Neste trabalho foi utilizado o procedimento descrito em *Podospora* para analisar a produção de lacases em *C. parasitica*. A Figura 11 mostra a atividade desta enzima representada pela formação de coloração vermelha envolvendo as colônias. Os mutantes virulentos 180.17 e 181.3 apresentam quantidades semelhantes a linhagem Ep155, enquanto os mutantes citoplasmáticos hipovirulentos 135.12 e 135.9 e o mutante nuclear hipovirulento 193.1 apresentam quantidades reduzidas desta enzima. Em contraste, o mutante hipovirulento 53.14 apresenta um aumento significativo na atividade da lacase. Estes resultados não estão em acordo com nenhuma das observações propostas para *Podospora* ou *Cryphonectria*.

O esperado para todos os mutantes de virulência reduzida com a produção constitutiva de uma oxidase

alternativa, seria um aumento na atividade de lacase, se esta fosse realmente a enzima que representa a oxidase alternativa em *Cryphonectria parasitica*. Da mesma forma, todos os mutantes de virulência reduzida deveriam apresentar redução na atividade de lacase, e o mutante hipovirulento 53.14 apresenta um aumento em relação a linhagem Ep155. Esta enzima então não pode ser considerada a responsável pela diminuição da virulência em linhagens que apresentam dsRNA. Outros tipos de fenol oxidases como tirosinase (PRILLINGER & ESSER, 1977) também podem ser detectadas neste teste.

Maiores detalhes devem ser investigados a respeito da identificação desta enzima e sua quantificação para confirmar os resultados obtidos neste trabalho, e possivelmente sugerir sua função nos mutantes respiratórios.

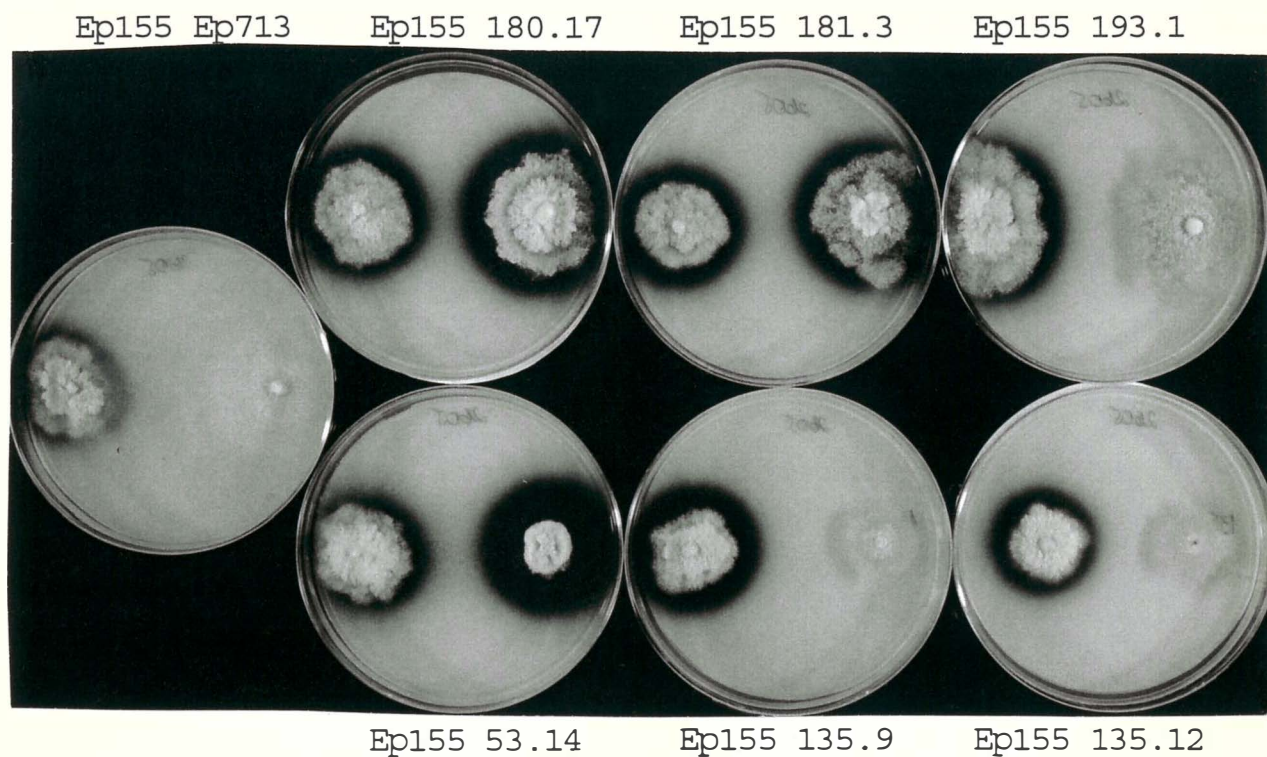


Figura 11. Resposta dos mutantes respiratórios derivados da linhagem Ep155 e do variante de Ep155 contendo dsRNA, Ep713, a reação de atividade da enzima lacase em meio de cultura contendo guaiacol.

4.7. INSTABILIDADE DOS MUTANTES CITOPLASMÁTICOS

A Figura 12 mostra que o mutante citoplasmático 135.12 após repetidas transferências em meio de cultura começou a apresentar colônias com morfologia deteriorada e produção de setores. Esse comportamento mais uma vez aponta para semelhanças com o fenômeno de senescência. O DNA dos mutantes respiratórios foram extraídos em diferentes preparações. Os mutantes citoplasmáticos 135.9 e 135.12 passaram a apresentar bandas amplificadas de DNA (Figura 13). O DNA mitocondrial de *Podospora anserina* mostra amplificação de segmentos de DNA, quando o processo de senescência é disparado.

O fato do DNA dos mutantes citoplasmáticos apresentarem sequências de DNA amplificadas que não foram identificadas desde o começo do trabalho, sugere que a mutação provocada no DNA mitocondrial associada as repetidas transferências em meio de cultura causa uma instabilidade no DNA mitocondrial, como visto em casos de senescência.

O fenômeno de senescência apesar de extensivamente estudado não define a causa da instabilidade no DNA mitocondrial e o que dispara esse evento. Estudos mais detalhados devem ser feitos a respeito dessas sequências de DNA. Este deveria ser clonado, hibridizado contra o DNA da linhagem selvagem para determinar a sua localização no mapa de

restrição do DNA mitocondrial de *C. parasitica* e sequenciado.



Figura 12. Morfologia deteriorada das colônias do mutante respiratório 135.12 após repetidas transferências em meio de cultura.

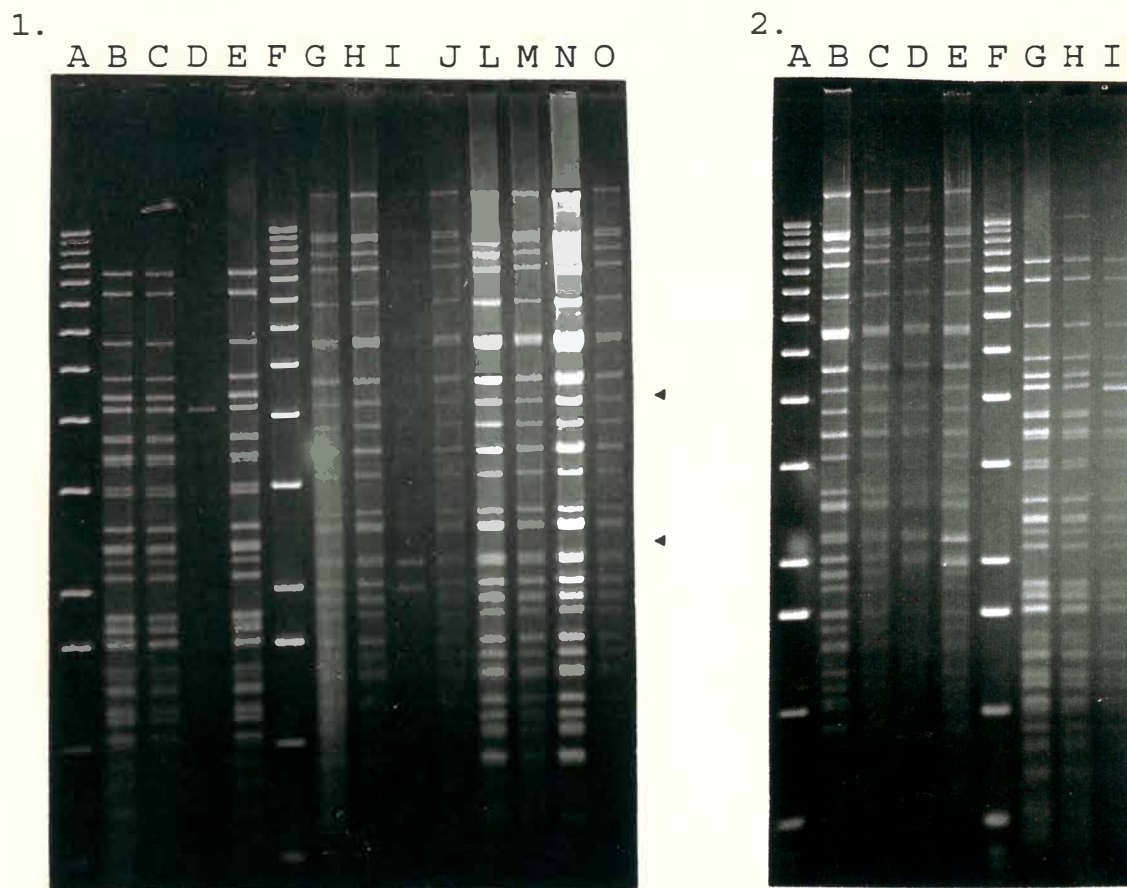


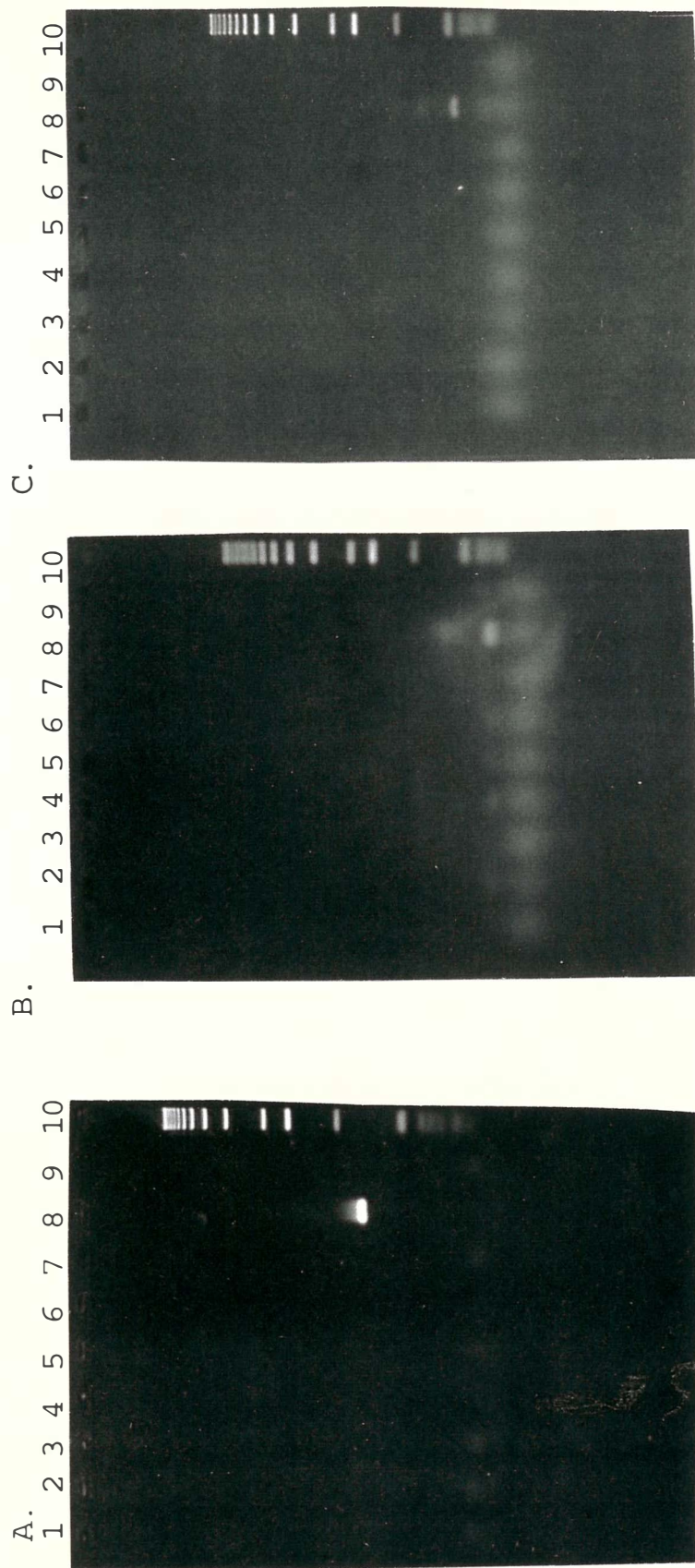
Figura 13. Padrão de restrição das enzimas *HpaII* e *BglIII* dos mutantes respiratórios derivados da linhagem Ep155. 1. A, marcador de peso molecular; B-E, fragmentos *HpaII* de: B, Ep155; C, 135.12; D, 135.9; E, Ep155; F, marcador de peso molecular; G-P, fragmentos *BglIII* de: G, Ep155; H, 135.12; I, 135.9; J, Ep155

A linhagem hipovirulenta CL25 de *C. parasitica* não apresenta dsRNA. A causa da hipovirulência nesta linhagem vem sendo investigada, onde foi encontrado um plasmídeo mitocondrial de 4,6 Kb (comunicação pessoal do trabalho em andamento pela Dra. Julia Bell). Plasmídios mitocondriais em *Ophiostoma ulmi* podem estar relacionado a hipovirulência nesta espécie, entretanto estes plasmídios apresentam homologia com o DNA mitocondrial, diferentemente do plasmídeo encontrado em *Cryphonectria*. Para verificar se existe algum plasmídeo que poderia estar provocando a instabilidade nos mutantes citoplasmáticos obtidos neste trabalho, a Dr. Julia Bell cedeu os primers que foram utilizados no sequenciamento do plasmídeo em *C. parasitica*. Os "primers" cobrem a sequência de DNA do plasmídeo e foram utilizados em experimentos de PCR para verificar se sequências relacionadas poderiam ser encontradas em Ep155 e nos mutantes respiratórios, que não puderam ser visualizadas em gel corado com brometo de etídio. A sequência de nucleotídeos dos "primers" estão escritas da região 5' para 3':

número do "primer":	5'	3'
19 -	CATTGACCCCTCTACCAG	
20 -	TCAACATAGATAGATCTGCA	
14 -	CTATGTTATTGGCTCCAGC	
29 -	CGATCTGCATACGTCTCTTG	
16 -	GTGCAAACGCAAACGCAA	

A Figura 14 mostra que somente a colônia monospórica ss9 derivada da linhagem CL25 apresentou produtos derivados do PCR. Concluiu-se então, que plasmídios ou sequências relacionadas a esses não estão relacionados as causas da hipovirulência dos mutantes derivados da linhagem Ep155.

Figura 14. Produtos derivados de PCR utilizando as combinações de primers (A) 19 e 20; (B) 14 e 16; (C) 14 e 29; em 1, 135.9; 2, 135.12; 3, 193.1; 4, 53.14; 5, 180.17; 6, 181.3; 7, Ep155; 8, Cl25ss9; 9, H₂O; 10, marcador de peso molecular. O primeiro fragmento do marcador de peso molecular apresenta 12 kb, e os demais decrescem 1 kb.



4.8. NOMENCLATURA DOS MUTANTES RESPIRATÓRIOS em *C. parasitica*

Os mutantes 135.9 e 135.12 por apresentarem mutações em genes mitocondriais, sugere-se que estas sejam designadas *mit1* e *mit2*, respectivamente. Para os mutantes nucleares 180.17, 181.3 e 193.1, que apresentam deficiência em citocromos sugere-se, de acordo com o sistema estabelecido para *Neurospora* por BERTRAND *et al.* (1977), os nomes *cyt1*, *cyt2* e *cyal*, respectivamente. Os autores sugeriram a seguinte nomenclatura: *cyt*, quando a mutação determinava deficiência em pelo menos dois citocromos; *cya*, para deficiência em citocromo a; e *cyb*, para deficiência em citocromo b. Para o mutante 53.14, por apresentar causa ainda indefinida, sugere-se a nomenclatura *res1*, representando mutante que apresenta respiração deficiente. Esses nomes foram dados as mutações apesar de não ter sido determinado, principalmente para os mutantes nucleares, se estes são diferentes alelos do mesmo gene, ou diferentes genes. Portanto, estas designações podem ainda sofrer modificações com o decorrer de novas investigações. A Tabela 22 define as características de cada uma das mutações, determinadas por este trabalho.

Tabela 22. Características dos mutantes respiratórios de *Cryphonectria parasitica*, obtidos neste trabalho.

Nº de Isolamento	Tipo de Mutação ^a	Citocromos	Taxa de Crescimento	Fertilidade Feminina ^b	Designação do Gene
180.17	N	a: reduzido b: reduzido c: elevado	Normal	+	cyt1
181.3	N	a: reduzido b: reduzido c: elevado	Normal	+	cyt2
193.1	N	a: variável b: normal c: normal	Reduzida	+	cyal
53.14	N	indeterminado	Reduzida	+	res1
135.9	C	a: deficiente b: normal c: elevado	Reduzida	+	mit1
135.12	C	indeterminado	Reduzida	±	mit2

^a N e C indicam mutações de origem nuclear e citoplasmática, respectivamente.

^b + e ± indicam fertilidade feminina e fertilidade feminina observada ocasionalmente, respectivamente.

4.9. INSTABILIDADE EM LINHAGENS VIRULENTAS

Como em muitos fungos fitopatogênicos, alguns isolados de *C. parasitica* mantidos em cultura por vários anos tendem a perder a sua habilidade de provocar doença, e comumente alteram sua morfologia. Relatos semelhante podem ser encontrados em *Gaeumannomyces graminis* (NAIKI & COOK, 1983) e *Ophiobolus graminis* (CHAMBERS, 1970). A perda de patogenicidade durante prolongada cultura vegetativa pode ocorrer pela expressão de micovírus latentes, morte vegetativa associada com elementos genéticos citoplasmáticos (plamídios), ou uma alteração na relação de núcleos geneticamente diferentes se o fungo é heterocariótico.

A linhagem CL1-16 é altamente instável em cultura, sendo que suas colônias produzem vários setores. Um setor em particular (CL1-16.3) mostrou uma morfologia diferente. CL1-16.3 apresenta colônia com micélio branco em pouca quantidade e que após 10-15 dias em cultura produz um pigmento marrom, dando um aspecto escuro a colônia. A colônia apresenta um bom desenvolvimento inicial, o que corresponde aos primeiros 10 cm em diâmetro numa placa de Petri, inclusive com abundância em micélio, e então começa a produzir uma fina camada de hifas, culminando após 10-15 dias com a produção do pigmento marrom. Além do mais, frequentemente produz setores normais. CL1-16-17, CL1-16-26, CL1-16-14 são colônias monospóricas isoladas a

partir de CL1-16.3. A Figura 15 mostra colônias originadas de micélio retirados de uma mesma colônia do variante CL1-16.3, a partir do centro em direção ao final da colônia e ilustra a sua degeneração.

A Figura 2 (pág. 59) mostra a ausência de dsRNA em CL1-16 e CL1-16-17. A Tabela 23 mostra os dados obtidos em testes de virulência realizados em árvores de castanheiras no campo em Morgantown, West Virginia. A Tabela 24 mostra os resultados encontrados em teste de virulência realizado em maçãs. Os resultados de ambos os testes confirmam o estado de virulência reduzida desses isolados.

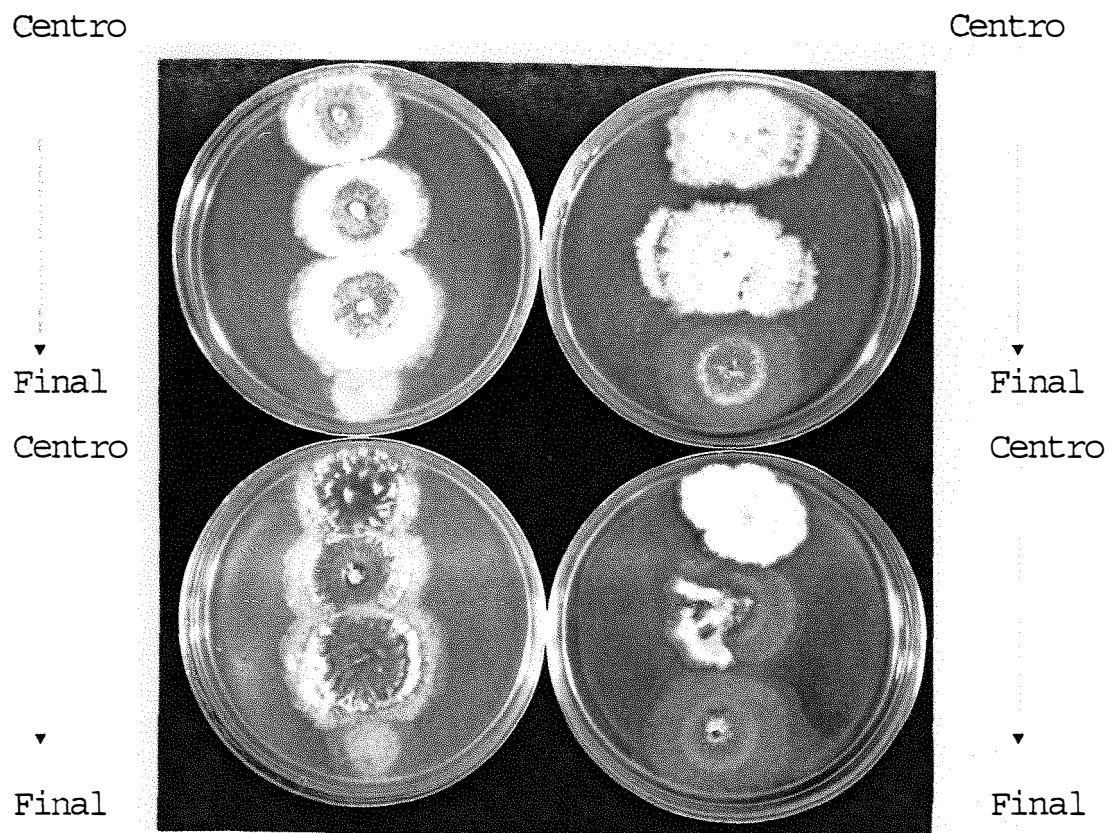


Figura 15. Colônias derivadas de uma única colônia do variante CL1-16.3. As setas indicam a direção com que o micélio foi retirado da colônia de CL1-16.3.

Tabela 23. Teste para virulência realizado em árvores de castanheira. O diâmetro da lesão foi medido 3 meses após inoculação.

Linhagens	Diâmetro da Lesão (cm) *
Ep 155-4 ¹	6,84 ^a
Ep 155-1 ¹	6,70 ^a
CL1-16	6,52 ^a
Ep 155-2 ¹	6,16 ^a
Ep 155	6,15 ^a
Ep 155-141 ¹	5,80 ^a
CL1-16.3	3,38 ^b
GH2	0,26 ^c

* Média de três repetições, o teste *t* foi realizado a nível de 5% de significância.

¹ Diferentes culturas da linhagem Ep155.

Tabela 24. Teste de virulência realizado em maçãs do tipo "Golden Delicious". Diâmetro da lesão medido após 21 dias de incubação

Linhasgens	Diâmetro (cm) *
Ep155 H ¹	6,55 a*
Ep155 B ¹	5,97 a,b
Ep155 JB ¹	5,95 a,b
181.3	5,92 a,b
CL1-16	5,87 a,b
EpBEN3	5,77 b
180.17	5,75 b
CL25-4 ²	5,67 b
CL25-L ²	5,50 b
CL25-A ²	5,48 b
CL1-16-17	2,80 c
135.12	2,40 c
135.9	2,35 c,d
A1 ³	2,35 c,d
CH2	2,32 c,d
A1 ³	1,75 d,e
CL25	1,40 e
193.1	1,35 e
53.14	1,30 e
CL25ss9 ²	1,20 e
CL25ss9 ²	1,00 e

* Média de três repetições, teste t realizado a nível de 5% de significância*

¹ Diferentes culturas da linhagem Ep155

² Diferentes culturas monospóricas de CL25

³ Colônias derivadas do cruzamento entre Ep155 e CL1-16

Os resultados dos ensaios de respiração são apresentados na Tabela 25. Enquanto o nível de respiração resistente ao cianeto foi sempre baixo nas linhagens Ep155 e CL1-16 (< 15 %), respiração através dessa via foi variável nos isolados hipovirulentos e ocasionalmente chegando a 80%. A flutuação nos níveis de respiração resistente ao cianeto dos derivados hipovirulentos de CL1-16 foi consistente com a variação encontrada nos conteúdos de citocromos mitocondriais. Pode ser visto na Figura 16 o espectro de absorção de luz do citocromos obtidos de mitocôndrias de CL1-16-17. O espectro varia desde de normal (selvagem) até completa ausência de citocromos a e b.

Tabela 25. Percentagem de respiração pela via alternativa e número de colônias encontradas para as classes de alta (>40 %) e baixa (<25 %) respiração pela via alternativa.

Linhagens	Baixa Alt.Ox.		Alta Alt.Ox.	
	Nº de colônias	Média (%)*	Nº de colônias	Média (%)*
Ep155	17	11,1 ± 4,5	0	-
CL1-16	9	14,4 ± 8,7	0	-
CL1-16-17	21	19,6 ± 9,6	6	48,4 ± 7,8
CL1-16-14	4	23,3 ± 12,2	3	66,4 ± 14,0
CL1-16-26	11	22,2 ± 9,3	1	75,0
CL25ss9	9	25,7 ± 10,2	4	47,1 ± 9,0

* Média ± desvio padrão

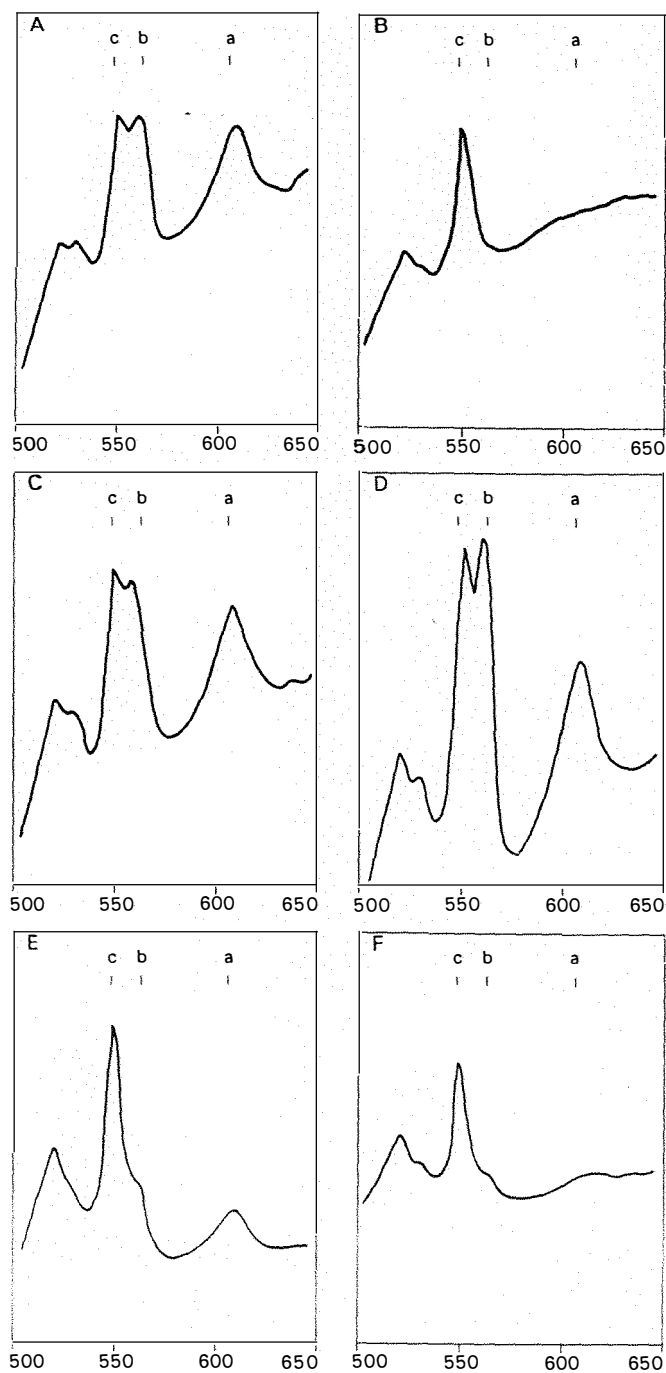


Figura 16. Espectro de absorção de luz dos citocromos mitocondriais das linhagens: A, Ep155; B, Ep155 crescida em presença de clorafenicol; C, CL1-16; D-F, ilustram a variabilidade de conteúdo de citocromos em mitôcondrias de CL1-16-17. As letras a,b,c representam os picos de absorção para cada citocromo e os números abaixo de cada espectro, o comprimento de onda dados em nm.

5. DISCUSSÃO

5.1. Obtenção de mutantes respiratórios

Os experimentos de mutagênese neste trabalho produziram duas classes de mutações para deficiência em respiração, detectada pela indução da via alternativa. O gene estrutural para a enzima oxidase alternativa é nuclear, sendo que o sítio de atuação dessa enzima localizado na mitocôndria. Neste contexto, é fácil de entender a quantidade de genes envolvidos neste processo. Vários trabalhos tem mostrado ser possível a indução de mutações que causam defeitos respiratórios, tanto de origem nuclear como citoplasmática (McDOUGALL & PITTENGER, 1966; ROSENBERG *et al.*, 1976; BERTRAND *et al.*, 1977; NIAGRO & MISHRA, 1989). A metodologia empregada neste trabalho mostrou-se eficiente na seleção de mutantes respiratórios. Foram isolados seis mutantes, sendo quatro de origem nuclear e dois de origem citoplasmática.

O teste de virulência mostrou que os mutantes que apresentaram crescimento reduzido em meio de cultura são os que apresentaram virulência reduzida. A correlação entre virulência e mutações citoplasmáticas ou nucleares que causam defeitos respiratórios alterando a taxa de crescimento suporta a idéia de que pelo menos em *C. parasitica*, hipovirulência pode ser causada por uma debilitação metabólica ao invés do

perda de função de genes específicos para virulência (ZHANG et al., 1993).

5.2. Mutações citoplasmáticas como fonte de hipovirulência

O objetivo principal deste trabalho foi determinar se hipovirulência em *C. parasitica* poderia estar associada com mutações em genes mitocondriais, como sugerido por MAHANTI et al. (1993). As mutações *mit1* e *mit2* obtidas neste trabalho provocam hipovirulência e níveis elevados de respiração pela via alternativa, transmitem essas características através de fusão de hifas e maternalmente em cruzamentos sexuais. Características essas presentes em linhagens hipovirulentas que não contém dsRNA.

As mutações *mit1* e *mit2* apresentam também características semelhantes as encontradas em fungos como *Neurospora*, *Podospora* e *Aspergillus*, em eventos de senescência (BERTRAND, 1983; BERTRAND & GRIFFITHS, 1989; BERTRAND et al., 1980; ESSER et al., 1986; LAZARUS et al., 1980; GRIFFITHS, 1992). A capacidade de transmissão dessas mutações mitocondriais pode ser explicada em analogia com o processo de senescência, que determina o caráter supressivo de mutações mitocondriais que afetam a cadeia respiratória. Exatamente como mitocôndrias anormais podem ser supressivas em relação a mitocôndrias normais não está determinado, entretanto existem

alguns modelos sugeridos para o evento.

O único modelo definido para fungos filamentosos, proposto por BERTRAND *et al.* (1986), sugere que mitocôndrias anormais, que não são eficientes na produção de energia, são induzidas a replicação, levando a reposição gradual de mitocôndrias normais. As mutações *mit1* e *mit2*, apresentam caráter supressivo como demonstrado pela sua transferência através de fusão de hifas com linhagens normais. A transmissão de hipovirulência determinada por mitocôndria foi conseguida em ensaios realizados em placas de Petri, experimentos em árvores de castanheiras foram iniciados e os resultados serão conhecidos no próximo ano devido ao período de inverno.

O determinante do fenômeno de senescência envolve mutações mitocondriais que afetam a respiração, independente do tipo de mutação (rearranjos, plasmídios, deleções ou mutações de ponto). A mutação *mit1* foi caracterizada como apresentando o fenótipo de deficiência em citocromo *a*. A princípio nenhuma alteração no DNA mitocondrial pode ser detectada neste mutante, sugerindo essa mutação como causa da supressividade. Entretanto, as mutações *mit1* e *mit2*, parecem também provocar instabilidade no DNA mitocondrial, como pôde ser visto pelo surgimento de sequências amplificadas e sequências extras de DNA. Em contraste, nenhuma alteração no DNA mitocondrial foi detectada nos mutantes nucleares isolados neste trabalho.

Em *Podospora*, o fenômeno de senescência está associado com sequências de DNA amplificadas derivadas do DNA mitocondrial, são os chamados *senDNA* (JAMET-VIERNEY *et al.*, 1980). Diferentes linhagens senescentes e até mesmo diferentes culturas de uma mesma linhagem podem apresentar diferentes *senDNA* (revisado em GRIFFITHS, 1992). O caráter variável da presença desses segmentos de DNA amplificados parece estar associado as mutações *mit1* e *mit2*. Entretanto em *Podospora*, a geração dos *senDNA* resulta, em um curto prazo, na morte da cultura. Em *Cryphonectria parasitica*, até o momento, parece que as culturas podem alcançar um estágio avançado de senescência, como pode ser visto pela morfologia da colônia na Figura 5, e numa próxima cultura recuperar um estágio mais precoce. Isto sugere que devem ser mantidos de alguma forma heteroplasmos no micélio deste fungo, impedindo a morte da cultura.

Em *Ophiostoma ulmi*, plasmídios derivados do DNA mitocondrial têm sido associados a hipovirulência em linhagens que apresentam dsRNA (CHARTER *et al.*, 1993). O papel desses plasmídios na geração de hipovirulência não foi ainda determinado, assim como sua relação com dsRNA. Neste caso deficiência em citocromos *a*, também é detectada em linhagens hipovirulentas. As mutações mitocondriais produzidas em *Cryphonectria parasitica* poderiam também ser comparadas as esse tipo de fenômeno, com a exceção de que dsRNA não está

presente nas linhagens mutantes, facilitando o seu estudo.

Em *Cryphonectria parasitica*, um plasmídio que não apresenta homologia com o DNA mitocondrial, portanto, sendo considerado um plasmídio verdadeiro, segundo definição proposta por LAMBOWITZ et al. (1986), tem sido encontrado em linhagens hipovirulentas sem dsRNA isoladas no campo (comunicação pessoal pela Dra. Julia Bell). Sequências relacionadas a esse plasmídio não foram encontradas nos mutantes mitocondriais isolados, sendo eliminada a possibilidade de este ser a causa de instabilidade no DNA mitocondrial.

Independente da determinação do efeito produzido pela mutagênese, este trabalho apresenta resultados que mostram ser possível a indução de mutantes citoplasmáticos que são hipovirulentos. A associação de virulência atenuada com altos níveis de respiração pela via alternativa sugere que mutantes em genes mitocondriais são a causa do fenótipo de hipovirulência citoplasmaticamente transmissível. O padrão de transmissão assexual nesse tipo de hipovirulência parece ser o mesmo que a hipovirulência associada com micovírus. Entretanto, hipovirulência causada por vírus raramente é transmitida através de cruzamentos sexuais (NUSS, 1992). Hipovirulência causada por formas mutantes de DNA mitocondrial pode ser transmitida verticalmente através do parental feminino, portanto evitando as barreiras impostas pela

incompatibilidade vegetativa.

A manipulação de genes mitocondriais pode ser uma alternativa e um complemento a hipovirulência mediada por vírus em programas de controle biológico de doenças causadas por fungos, principalmente em casos de fungos fitopatogênicos que não apresentam a ocorrência natural de vírus como fator de atenuação de virulência.

5.3. Mutações nucleares que afetam a respiração

Quatro mutantes respiratórios de origem nuclear foram isolados, sendo que dois apresentaram virulência reduzida (mutações *res1* e *cy1*). As mutações *cyt1* e *cyt2*, apresentaram crescimento aproximadamente normal não afetando virulência.

A análise das mutações *cyt1* e *cyt2* mostrou que estas apresentam o fenótipo de deficiência em citocromos *a* e *b*, devido a um processamento inadequado da subunidade maior dos ribossomos mitocondriais. Mutações em formação e processamento de ribossomos em *Neurospora* (COLLINS *et al.*, 1977; MANNELLA *et al.*, 1979; BERTRAND *et al.*; 1982; GARRIGA *et al.*, 1984) têm sido estudado extensivamente, com a identificação de vários mutantes de origem nuclear e mitocondrial. O sintoma característico para o isolamento desses mutantes é deficiência em citocromos *a* e *b*, uma vez que essa característica reflete

falha no sistema de síntese proteica mitocondrial. Subunidades dos citocromos *a* e *b* são codificadas por genes mitocondriais.

A subunidade maior dos ribossomos mitocondriais de *Neurospora* é sintetizada a partir de um precursor de 5,6 kb (35S RNA) que contém um único intron de 2,3 kb. Em linhagens selvagens este pré-rRNA é processado em uma única reação de clivagem, para produzir um rRNA 25S e um intron moderadamente estável de 2,3 kb (MANNELLA *et al.*, 1979). A formação dos ribossomos depende não somente de RNA, mas de uma série de proteínas. A maioria dessas proteínas são sintetizadas no citosol. Mutações em qualquer dessas proteínas pode levar a formação inadequada dos ribossomos. Identificar o defeito que leva a um processamento irregular das subunidades ribossomais é um trabalho extenso, o que é possível dizer a respeito dos resultados encontrados para as mutações *cyta* e *cytb*, é que o acúmulo de um precursor sugere que este não está sendo devidamente processado. Conseqüentemente a síntese de proteínas mitocondriais não está sendo eficiente, reduzindo o conteúdo de citocromos *a* e *b*.

A mutação *cyal*, apresenta um fenótipo variável quanto a quantidade de citocromo *a*. O citocromo *a* é formado por sete polipeptídeos, os três maiores são codificados por genes mitocondriais e os demais por genes nucleares. Além do mais a formação do citocromo *a* envolve um grupo heme e fosfolipídeos (NARGANG *et al.*, 1978; BERTRAND & COLLINS, 1978;

BERTRAND & WERNER, 1979; BERTRAND, 1980). Considerando a natureza variável do conteúdo do citocromo *a* em mutantes *cya1*, parece que alguma disfunção de origem regulatória deve estar envolvida na origem desta mutação. Em experimento onde o conteúdo deste citocromo foi normal (tipo selvagem), a via alternativa permaneceu induzida. Concluindo-se que esta variação deve ser um efeito secundário de uma mutação principal, ainda não definida.

A mutação *res1* mostra um acúmulo de uma fenol oxidase, entretanto o papel deste enzima e a causa da mutação continuam da mesma forma indefinidos.

5.4. Fenoloxidase VS hipovirulência e via alternativa

Lacase é uma enzima do tipo polifenoloxidase (*p*-difenol oxidase - EC 1.10.3.2). Pertence a um grupo de proteínas que assim com oxidases terminais em respiração aeróbica, apresentam a capacidade de reduzir oxigênio molecular em água. Essas proteínas acumulam elétrons pois geralmente, a redução do oxigênio molecular em água é acompanhada da oxidação de um substrato fenólico. Esse componente atua como uma bateria, estocando elétrons, a fim de reduzir o oxigênio molecular (revisado por THURSTON, 1994).

Esses fatos, mais a associação do aparecimento da via alternativa com indução de fenoloxidases, levou FRESE &

STAHL (1992) a sugerirem que lacase funciona como uma oxidase alternativa em *Podospora*. Em *Cryphonectria parasitica*, entretanto os mutantes mitocondriais que apresentam a via alternativa funcionando constitutivamente apresentam uma redução na produção de lacase. Esses resultados indicam que pelo menos em *Cryphonectria parasitica*, lacase não parece ser a enzima responsável pela via alternativa.

Linhagens que contém dsRNA apresentam níveis reduzidos de lacase, levando RIGLING et al. (1989) sugerirem que a redução de lacase seria a responsável pela redução de virulência nestas linhagens. Lacase tem sido considerada responsável por pigmentação, degradação de lignina, formação de corpo de frutificação. Características essas que estão associadas a hipovirulência em linhagens que contém dsRNA. Entretanto, a mutação *res1*, apresenta como efeito a produção elevada de uma fenoloxidase e virulência reduzida. Concluindo-se que lacase pode apresentar níveis reduzidos em linhagens hipovirulentas, mas sua presença não pode ser considerada como a responsável pela virulência em *Cryphonectria parasitica*.

5.5. Instabilidade em linhagens virulentas

Um fato bastante conhecido em estudos de fungos fitopatogênicos é a perda de virulência em culturas mantidas por muito tempo em laboratório (revisado por NAIKI & COOK,

1983). O estudo de linhagens virulentas que apresentam instabilidade vegetativa em *Cryphonectria parasitica* vem em apoio a sugestão de que uma das várias causas que podem levar a esse fato, são mutações no DNA mitocondrial.

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que ocasionalmente a via alternativa pode ser induzida em isolados com crescimento debilitado que conseqüentemente são hipovirulentos. Da mesma forma variação no conteúdo de citocromos também foi observada. A instabilidade observada nestas linhagens sugere que mais do que um evento deve ser responsável pelo aparecimento de setores associados a hipovirulência. O caráter de instabilidade sugere que pelo menos um deles deve ser de origem citoplasmática, envolvendo mutações mitocondriais.

6. CONCLUSÕES

As conclusões obtidas neste trabalho foram:

1. A utilização de uma combinação de brometo de etídio e luz UV como agentes mutagênicos e, crescimento lento e indução da respiração pela via alternativa como métodos de seleção foram estratégias eficientes que permitiram a obtenção de mutantes citoplasmáticos;
2. É possível a obtenção de variantes hipovirulentos em *C. parasitica* através da indução de mutantes citoplasmáticos;
2. Mutantes citoplasmáticos de *C. parasitica* apresentam características associadas ao processo de senescência;
3. Hipovirulência pode ser obtida devido a um estado de debilitação geral do fungo, uma vez que os mutantes respiratórios que apresentaram crescimento lento apresentaram também virulência reduzida;
4. Linhagens virulentas que são instáveis apresentam características que podem estar associadas a mutações mitocondriais;
5. Pelo menos em *C. parasitica*, lacase não é a enzima responsável pela via alternativa;
6. Seis mutantes respiratórios foram obtidos e denominados

mit1, mit2, cyt1, cyt2, cya1, res1.

7. A mutação citoplasmática *mit1* é caracterizada por deficiência em citocromo *a* e ambos *mit1* e *mit2* apresentam instabilidade no DNA mitocondrial.

8. As mutações nucleares *cyt1, cyt2* e *cya1*, apresentam quantidades alteradas de citocromos, sendo que as duas primeiras são causadas por um processamento anormal da subunidade maior dos ribossomos mitocondriais.

9. A mutação *res1* continua indefinida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINS, R.A. & LAMBOWITZ, A.M. The [poky] mutant of *Neurospora crassa* contains a 4 base pair deletion at the 5' end of the mitochondrial small rRNA. Proceedings of the National Academy of Science, (USA), Washington, 81: 3791-3795, 1984.
- ANAGNOSTAKIS, S.L. Vegetative incompatibility in *Endothia parasitica*. Experimental Mycology, New York, 1:306-316, 1977.
- ANAGNOSTAKIS, S.L. Sexual reproduction of *Endothia parasitica* in the laboratory. Mycologia, New York, 71:213-215, 1979.
- ANAGNOSTAKIS, S.L. Biological control of chestnut blight. Science, Washington, 215:466-471, 1982.
- ANAGNOSTAKIS, S.L. Genetics analyses of *Endothia parasitica*: linkage data for four single genes and three vegetative compatibility types. Genetics, Princeton, 102:25-28, 1982.
- ANAGNOSTAKIS, S.L. Conversion to curative morphology in *Endothia parasitica* and its restriction by vegetative compatibility. Mycologia, New York, 75: 777-780, 1983.
- ANAGNOSTAKIS, S.L. Nuclear gene mutations in *Endothia parasitica* that affect morphology and virulence. Phytopathology, St. Paul, 74:561-564, 1984.
- ANAGNOSTAKIS, S.L. Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. Mycologia, New York, 79:23-37, 1987.
- ANAGNOSTAKIS, S.L.; HAU, B.; KRANZ, J. Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. Plant Disease, St. Paul, 70:536-538, 1986.
- BAOSCHAN, C.; CHOI, G.H.; NUSS, D.L. Attenuation of fungal virulence by synthetic infectious Hypovirus transcripts. Science, Washington, 264:1762-1764, 1994.
- BELCOUR, L.; BEGEL, O.; PICARD, M. A site-specific deletion in mitochondrial DNA is under the control of nuclear genes. Proceedings of the National Academy of Science, (USA), Washington, 88:3579-3583, 1991.

- BELCOUR, L.; BEGEL, O.; KELLER, A.M.; VIERNY, C. In: SLONIMSK, P.P.; BORST, P.; ATTARDI, G. Mitochondrial Genes. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. pp.415-422.
- BERTRAND, H. Biogenesis of cytochrome c oxidase in *Neurospora crassa*. In: KROON, A.M. & SACCONI, C. Developments in Genetics. Amsterdam, North Holland Biomedical Press, 1980. p.325-332.
- BERTRAND, H. Aging and senescence in fungi. In: REGELSON, W. & SINEX, F.M. Intervention in the aging process, Part B: Basic Research and Preclinical Screening. New York, Alan R. Liss, Inc., 1983. p.233-251.
- BERTRAND, H. The kalilo senescence factor of *Neurospora intermedia*: a mitochondrial IS element derived from a nuclear plasmid. In: WICKNER, R.B.; HINNEBUSCH, A.; LAMBOWITZ, A.M.; GUNSALUS, I.C.; HOLLAENDER, A. Extrachromosomal elements in lower eukaryotes. New York, Plenum Press, 1986. p.93-103.
- BERTRAND, H. & COLLINS, R. A regulatory system controlling the production of cytochrome aa_3 *Neurospora crassa*. Molecular and General Genetics, Berlin, 166:1-13, 1978.
- BERTRAND, H. & PITTENGER, T.H. Cytoplasmic mutants selected from continuously growing cultures of *Neurospora crassa*. Genetics, Berlin, 61: 643-659, 1969.
- BERTRAND, H. & PITTENGER, T.H. Isolation and classification of extranuclear mutants of *Neurospora crassa*. Genetics, Berlin, 71:521-533, 1972.
- BERTRAND, H. & WERNER, S. Cytochrome c oxidase subunits in nuclear and extranuclear cytochrome aa_3 -deficient mutants of *Neurospora crassa*. European Journal of Biochemistry, Berlin, 98:9-18, 1979.
- BERTRAND, H.; ARGAN, C.A.; SZAKACS, N.A. Genetic control of the biogenesis of cyanide insensitive respiration in *Neurospora crassa*. In: SCHWEYEN, R.J.; WOLF, K.; KAUDEWITZ, F. Mitochondria 1983. Berlin, Walter de Gruyter, 1983. p.495-505.
- BERTRAND, H.; BRIDGE, P.; COLLINS, R.A.; GARRIGA, G.; LAMBOWITZ, A.M. Characterization of new nuclear mutants with defects in splicing the mitochondrial large rRNA. Cell, Cambridge, 29:517-526, 1982.

- BERTRAND, H.; CHAN, B.S.S.; GRIFFITHS, A.J.F. Insertion of a foreign nucleotide sequence into mitochondrial DNA causes senescence in *Neurospora intermedia*. Cell, Cambridge, 41:877-884, 1985.
- BERTRAND, H.; COLLINS, R.A.; STOHL, L.L.; GOEWERT, R.R.; LAMBOWITZ, A.M. Deletion mutants of *Neurospora crassa* mitochondrial DNA and their relationship to the "stop-start" growth phenotype. Proceedings of the National Academy of Science, (USA), Washington, 11:6032-6036, 1980.
- BERTRAND, H.; NARGANG, F.E.; COLLINS, R.A.; ZAGOZESKI, C.A. Nuclear mutants of *Neurospora crassa*: isolation, characterization and genetic mapping. Molecular and General Genetics, Berlin, 153: 247-257, 1977.
- BERTRAND, H.; SZAKACS, N.A.; NARGANG, F.E.; ZAGOZESKI, C.A.; COLLINS, R.A.; HARRIGAN, J.C. The function of mitochondrial genes in *Neurospora crassa*. Canadian Journal of Genetic and Cytology, Ottawa, 18:397-409, 1976.
- BIRAGHI, A. La distribuzione del cancro del castagno in Italia. L'Italia Forestale e Montana, 5:18-21, 1950.
- BONNER, W.D.; CLARKE, S.D.; RICH, P.R. Partial purification and characterization of the quinol oxidase activity of *Arum maculatum* mitochondria. Plant Physiology, Sofia, 80:838-842, 1986.
- BORCK, K. & BRAYMER, H.D. The genetic analysis of resistance to benomyl in *Neurospora crassa*. Journal of General Microbiology, London, 85:51-56, 1974.
- BRASIER, C.M. The d factor in *Ceratocystes ulmi*; its biological characteristics and implications for Dutch elm disease. In: BUCK, K.W. Fungal Virology. Boca Raton, CRC Press, 1986. p.117-208.
- BRASIER, C.M. The unexpected element: mycovirus involvement in the outcome of two recent pandemic events, Dutch elm disease and chestnut blight. In: BURDON, J.J. & LEALTER, S.R. Pests, Pathogens and Plant Communities. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1990. p.289-308.
- BUCK, K.W. Viruses of the wheat take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. In: BUCK, K.W. Fungal Virology. Boca Raton, CRC Press, 1986. p. 221-236.

- CHARTER, N.W.; BUCK, K.W.; BRASIER, C.M. De-novo generation of mitochondrial DNA plasmids following cytoplasmic transmission of a degenerative disease in *Ophiostoma novoulmi*. Current Genetics, Berlin, 24:505-514, 1993.
- CHOI, G.H.; LARSON, T.G.; NUSS, D.L. Molecular analysis of the laccase gene from the chestnut blight fungus and selective suppression of its expression in a isogenic hypovirulent strain. Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, 5:119-128, 1992.
- CHOI, G.H. & NUSS, D.L. A viral gene confers hypovirulence-associated traits to the chestnut blight fungus. EMBO Journal, Oxford, 11:473-477, 1992.
- CHOI, G.H. & NUSS, D.L. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. Science, Washington, 257:800-803, 1992.
- COCHARAN, M.F. Back from the brink: chestnuts. National Geographic Magazine, 177:128-140, 1990.
- COURT, D.A. & BERTRAND, H. Genetic organization and structural features of maranhar, a senescence-inducing linear mitochondrial plasmid of *Neurospora crassa*. Current Genetics, Berlin, 22:385-397, 1992.
- COURT, D.A.; GRIFFITHS, A.J.F.; KRAUSS, S.R.; RUSSEL, P.J.; BERTRAND, H. A new senescence-inducing mitochondrial linear plasmid in field isolated *Neurospora crassa* strains from India. Current Genetics, Berlin, 19:129-137, 1991.
- DAY, P.R.; DODDS, J.A.; ELLISTON, J.E.; JAYNES, R.A.; ANAGNOSTAKIS, S.L. Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. Phytopathology, St. Paul, 67:1393-1396, 1977.
- DEBETS, F.; YANG, X.; GRIFFITHS, A.J.F. Vegetative incompatibility in *Neurospora*: its effect on horizontal transfer of mitochondrial plasmids and senescence in natural populations. Current Genetics, Berlin, 26:113-119, 1994.
- de VRIES, H.; de JONGE, J.C.; VAN'T SANT, P.; AGSTERIBBE, E.; AMBERG, A. A "stopper" mutant of *Neurospora crassa* containing two populations of aberrant mitochondrial DNA. Current Genetics, Berlin, 3:205-211, 1981.

- DODDS, J.A. Association of type 1 viral-like dsRNA with club-shaped particles in hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. Virology, Amsterdam, 107:1-12, 1980.
- DODDS, J.A. Revised estimates of the molecular weights of dsRNA segments in hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. Phytopathology, St. Paul, 70:1217-1220, 1980.
- EDWARDS, D.; ROSENBERG, E.; MARONEY, P. Induction of cyanide-insensitive respiration in *Neurospora crassa*. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 249: 3551-3556, 1974.
- ELLISTON, J.E. Characterization of dsRNA-free and dsRNA containing strains of *Endothia parasitica* in relation to hypovirulence. Phytopathology, St. Paul, 75:151-158, 1985.
- ELTHON, T.E. & McINTOSH, L. Characterization and solubilization of the alternative oxidase of *Sauromatum guttatum* mitochondria. Plant Physiology, Sofia, 82:1-6, 1986.
- EPHRUSSI, B.; DE MARGERIE-HOTTINGUER, H.; ROMAN, H. Suppressiveness: a new factor in the genetic determinism of the synthesis of respiratory enzymes in yeast. Proceedings of the National Academy of Science, (USA), Washington, 41:1065-1071, 1955.
- ESSER, K. & KELLER, W. Genes inhibiting senescence in the ascomycete *Podospora anserina*. Molecular and General Genetics, Berlin, 144:107-110, 1976.
- FRESE, D. & STAHL, U. Oxidative stress and ageing in the fungus *Podospora anserina*. Mechanisms of Ageing and Development, Irlanda, 65:277-288, 1992.
- FULBRIGHT, D.W. Effect of eliminating dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. Phytopathology, 74: 722-724, 1984.
- FULBRIGHT, D.W.; WEIDLICH, W.H.; HAUFLER, K.Z.; THOMAS, C.S.; PAUL, C.P. Chestnut blight and recovering American chestnut tree in Michigan. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 61:3144-3171, 1983.
- GARRIGA, G.; BERTRAND, H. & LAMBOWITZ, A.M. RNA splicing in *Neurospora* mitochondria: nuclear mutants defective in both splicing and 3' end synthesis of the large rRNA. Cell, Cambridge, 36:623-634, 1984.

- GARROD, S.W.; FULBRIGHT, D.H.; RAVENSCROFT, A.V. Dissemination of virulent and hypovirulent forms of a marked strain of *Endothia parasitica* in Michigan. Phytopathology, St. Paul, 75: 533-538, 1985.
- GHABRIAL, S.A. Viruses of *Helminthosporium victoriae*. In: KOLTIN, Y & LEIBOWITZ, M.J. Viruses of Fungi and Lower Eukaryotes. New York, Marcel Dekker, Inc., 1988. p.353-369.
- GHABRIAL, S.A.; BIBB, J.A.; PRICE, K.H.; HAVENS, W.M.; LESNAW, J.A. The capsid polypeptides of the 190s virus of *Helminthosporium victoriae*. Journal of General Virology, London, 68:1791-1800, 1987.
- GHABRIAL, S.A.; SANDERLIN, R.S.; CALVERI, L.A. Morphology and viruslike particle content of *Helminthosporium victoriae* colonies regenerated from protoplasts of normal and diseased isolates. Phytopathology, St. Paul, 69:312-315, 1979.
- GRIFFITHS, A.J.F. Fungal senescence. Annual Review of Genetics, Palo Alto, 26: 351-372, 1992.
- GRIFFITHS, A.J.F.; KRAUS, S.R.; BARTON, R.; COURT, D.A.; BERTRAND, H. Heterokaryotic transmission of senescence plasmid plasmid DNA in *Neurospora*. Current Genetics, Berlin, 17:139-145, 1990.
- GROSS, S.R.; HSIAH, J.S.; LEVINE, P.H. Intramolecular recombination as a source of mitochondrial chromosome heteromorphism in *Neurospora*. Cell, Cambridge, 38:233-239, 1984.
- GROSSMAN, L.I. & HUDSPETH, M.E.S. Fungal mitochondrial genomes. In: BENNETT, J.W. & LASURE, L.L. Gene Manipulation in Fungi. Orlando, Academic Press, 1985. pp.65-103.
- HANSEN, D.R.; VAN ALFEN, N.K.; GILLIES, K.; POWELL, N.A. Naked dsRNA associated with hypovirulence of *Endothia parasitica* is package in fungal vesicles. Journal of General Virology, London, 66:2605-2614, 1985.
- HASKIS, F.A.; TISSIERES, A.; MITCHELL, H.K.; MITCHELL, M.B. Cytochromes and the succinic acid oxidase system of poky strains of *Neurospora*. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 200:819-826, 1953.

- HAUSNER, G.; REID, J.; KLASSEN, G.R. Do galeate-ascospore members of the cephalosporaceae, endomycetaceae and ophiostomataceae share a common phylogeny? Mycologia, New York, 84:870-881, 1992.
- HAVIR, E.A. & ANAGNOSTAKIS, S.L. Oxalate production by virulent but not by hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. Physiological Plant Pathology, London, 23:369-376, 1983.
- HILLMAN, B.I.; TIAN, Y.; BEDKER, P.J.; BROWN, M.P. A North American hypovirulent isolate of the chestnut blight fungus with European isolate-related dsRNA. Journal of General Virology, London, 73:681-686, 1992.
- HAVIR, E.A. & ANAGNOSTAKIS, S.L. Oxaloacetate acetylhydrolase activity in virulent and hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. Physiological Plant Pathology, London, 26:1-9, 1985.
- JAMET-VIERNEY, C.; BEGEL, O.; BELCOUR, L. Senescence in *Podospora anserina*: amplification of a mitochondrial DNA sequence. Cell, Cambridge, 21: 189-194, 1980.
- KIM, N.K.; MUTHE, W.; HAUSNER, G.; KLASSEN, G.R. Isolation of high molecular weight DNA and dsRNAs from fungi. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 68:1898-1902, 1990.
- KOLTIN, Y. & LEIBOWITZ, M.J. Viruses of fungi and simple eukaryotes. New York, Marcel Dekker, Inc., 1988. 409pp.
- KUCK, U. Mitochondrial DNA rearrangements in *Podospora anserina*. Experimental Mycology, New York, 13:111-120, 1989.
- LAMBOWITZ, A.M. Preparation and analysis of mitochondrial ribosomes. Methods in Enzymology, 59:421-433, 1961.
- LAMBOWITZ, A.M. & SLAYMAN, C.W. Cyanide-resistant respiration in *Neurospora crassa*. Journal of Bacteriology, Washington, 108:1087-1096, 1971.
- LAMBOWITZ, A.M.; SLAYMAN, C.W.; SLAYMAN, C.L.; BONNER, W.D. The electron transport components of wild type and poky strains of *Neurospora crassa*. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 247:1536-1545, 1972

- LAMBOWITZ, A.M.; AKINS, R.A.; KELLY, R.L.; PANDE, S.; NARGANG, F.E. Mitochondrial plasmids of *Neurospora* and other filamentous fungi. In: WICKNER, R.B.; HINNEBUSCH, A.; LAMBOWITZ, A.M.; GUNSALUS, I.C.; HOLLAENDER, A. Extrachromosomal elements in lower eukaryotes. New York, Plenum Press, 1986. p.83-92.
- LAMBOWITZ, A.M.; SABOURIN, J.R.; BERTRAND, H.; NICKELS, R. & McINTOSH, L. Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. Molecular and Cellular Biology, Washington, 9:1362-1364, 1989.
- LAZARUS, C.M. & KUNTZEL, H. Amplification of a common mitochondrial DNA sequence in three new ragged mutants of *Aspergillus amstelodami*. In: KROON, A.M. & SACCONI, C. Developments in Genetics. Amsterdam, North Holland Biomedical Press, 1980. p.87-90.
- LAZARUS, C.M. & KUNTZEL, H. Anatomy of amplified mitochondrial DNA in "ragged" mutants of *Aspergillus amstelodami*. Current Genetics, Berlin, 4:99-107, 1981.
- LAZARUS, C.M.; EARL, A.J.; TURNER, G.; KUNTZEL, H. Amplification of a mitochondrial DNA sequence in the cytoplasmically inherited "ragged" mutant of *Aspergillus amstelodami*. European Journal of Biochemistry, Berlin, 106:633-641, 1980.
- LEE, J.K.; TAITAR, T.A.; BERMAN, P.M. & MOUNT, M.S. A rapid method for testing the virulence of *Cryphonectria parasitica* using excised bark and wood of american chestnut. Phytopathology, St. Paul, 82:1454-1456, 1992.
- LINDBERG, G.D. A transmissible disease of *Helminthosporium victoriae*. Phytopathology, St. Paul, 49:29-32, 1959.
- LINDBERG, G.D. Reduction in pathogenicity and toxin production in diseased *Helminthosporium victoriae*. Phytopathology, St. Paul, 50:457-469, 1969.
- LOCKER, J.; LEWIN, A.; RABINOWITZ, M. The structure and organization of mitochondrial DNA from petite yeast. Plasmid, San Diego, 2:155-181, 1979.
- MCDUGALL, K.J. & PITTENGER, T.H. A cytoplasmic variant of *Neurospora crassa*. Genetics, Berlin, 54: 551-565, 1966.

- MAHANTI, N.; BERTRAND, H.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; FULBRIGHT, D.W. Elevated mitochondrial alternative oxidase activity in dsRNA-free, hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica*. Physiological and Molecular Plant Pathology, London, 42:455-463, 1993.
- MANELLA, C.A.; COLLINS, R.A.; GREEN, M.R.; LAMBOWITZ, A.M. Defective splicing of mitochondrial rRNA in cytochrome deficient, nuclear mutants of *Neurospora crassa*. Proceedings of the National Academy of Science, (USA), Washington, 76:2635-2639, 1979.
- MANELLA, C.A.; GOEWERT, R.R.; LAMBOWITZ, A.M. Characterization of variant *Neurospora crassa* mitochondrial DNAs which contain tandem reiterations. Cell, Cambridge, 18:1197-1207, 1979.
- MARCOU, D. Notion de longevité et nature cytoplasmique du déterminant de sénescence chez quelques champignons. Ann. Sci. Nat. Bot., 11:653-764, 1961.
- MARESCA, B.; LAMBOWITZ, A.M.; KOBAYASHI, G.S.; MEDOFF, G. Respiration in the yeast and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum*. Journal of Bacteriology, Washington, 138:647-649, 1979.
- MCDONALD, W.L. & FULBRIGHT, D.W. Biological control of chestnut blight: use and limitations of transmissible hypovirulence. Plant Disease, St. Paul, 75:656-661, 1991.
- McFADDEN, J.J.P.; BUCK, K.W.; RAWLINSON, C.J. Infrequent transmission of double-stranded RNA virus particles but absence of DNA proviruses in single ascospore culture of *Gaeumannomyces graminis*. Journal of General Virology, London, 64: 927-937, 1983.
- MEEUSE, B.J.D. Thermogenic respiration in aroids. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, 26:117-126, 1975.
- MICALES, J.A. & STIPES, R.J. A reexamination of the fungal genera *Cryphonectria* and *Endothia*. Phytopathology, St. Paul, 77:650-654, 1987.
- MINAGAWA, N.; SAKAJI, S.; KOMIYAMA, T.; YOSHIMOTO, A. A 36 kDa mitochondrial protein is responsible for cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. FEBS Letters, Amsterdam, 264:149-152, 1990.

- MOFFITT, E.M. & LISTER, R.M. Application of a serological screening test for detecting double-stranded RNA mycoviruses. Phytopathology, St. Paul, 65:851-859, 1975.
- NAIKI, T. & COOK, R.J. Factors in loss of pathogenicity in *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Phytopathology, St. Paul, 73:1652-1656, 1983.
- NARGANG, F.E.; BERTRAND, H.; WERNER, S. A nuclear mutants of *Neurospora crassa* lacking subunit 1 of cytochrome c oxidase. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 253: 6364-6369, 1978.
- NEWHOUSE, J.R. & MacDONALD, W.L. The ultrastructure of hyphal anastomoses between vegetatively compatible and incompatible virulent and hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 69:602-614, 1991.
- NIAGRO, F.D. & MISHRA, N.C. An ethidium bromide induced mutants of *Neurospora crassa* defective in mitochondrial DNA. Current Genetics, Berlin, 16:303-305, 1989.
- NUSS, D.L. Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. Microbiological Reviews, Washington, 32:561-576, 1992.
- OISEWACZ, H.D. & ESSER, K. The mitochondrial plasmid of *Podospora anserina*: mobile intron of a mitochondrial gene. Current Genetics, Berlin, 8:299-305, 1984.
- PALMER, J.M. The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, 27:133-157, 1976.
- PAUL, C.P. & FULBRIGHT, D.W. Double-stranded RNA molecules from Michigan hypovirulent isolates of *Endothia parasitica* vary in sizes and sequence homology. Phytopathology, St. Paul, 78:751-755, 1988.
- PISKUR, J. Inheritance of the yeast mitochondrial genome. Plasmid, San Diego, 31:229-241, 1994.
- POLLASHOCK, J.J. & HILMAN, B.I. A small mitochondrial dsRNA element associated with a hypovirulent strain of the chestnut blight fungus and acentrally related to yeast cytoplasmic T and W dsRNAs. Proceedings of the National Academy of Science, (USA), Washington, 91:8680-8684, 1994.

- POWELL, W.A. & VAN ALFEN, N.K. a. Two non homologous viruses of *Cryphonectria parasitica* reduce accumulation of specific virulence-associated polypeptides. Journal of Bacteriology, Washington, 169:5324-5325, 1987.
- POWELL, W.A. & VAN ALFEN, N.K. b. Differential accumulation of poly (A)⁺ RNA between virulent and double-stranded RNA induced hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica*. Molecular and Cellular Biology, Washington, 7:3688-3693, 1987.
- PRILLINGER, H. & ESSER, K. The phenoloxidase of the ascomycete *Podospora anserina*. Molecular and General Genetics, Berlin, 156:333-345, 1977.
- PUHALLA, J.E. & ANAGNOSTAKIS, S.L. Genetics and nutritional requirements of *Endothia parasitica*. Phytopathology, St. Paul, 61:169-173, 1971.
- PUSEY, P.L. & WILSON, C.L. Detection of double-stranded RNA in *Ceratocystis ulmi*. Phytopathology, St. Paul, 72:423-428, 1982.
- RIECK, A.; GRIFFITHS, A.J.F.; BERTRAND, H. Mitochondrial variants of *Neurospora intermedia* from nature. Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, 24: 741-759, 1982.
- RIFKIN, M.R. & LUCK, D.J.L. Defective production of mitochondrial ribosomes in the poky mutants of *Neurospora crassa*. Proceedings of the National Academy of Science, (USA), Washington, 68:287-290, 1971.
- RIGLING, D.; HEINIGER, U.; HOHL, H.R. Reduction of laccase activity in dsRNA-containing hypovirulent strains of *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. Phytopathology, St. Paul, 79:219-223, 1989.
- RIGLING, D. & VAN ALFEN, N.K. Regulation of laccase biosynthesis in the plant-pathogenic fungus *Cryphonectria parasitica* by double-stranded RNA. Journal of Bacteriology, Washington, 173:8000-8003, 1991.
- RISSLER, J.F. & MILLAR, R.L. Contribution of cyanide-insensitive alternate respiratory system to increases in formamide hydro-lyase activity and to growth in *Stemphylium loti* in vitro.

- ROANE, M.K.; GRIFFIN, G.J.; ELKINS, J.R. Chestnut blight, other *Endothia* diseases, and the Genus *Endothia*. In: APS Monographs. APS Press, St. Paul, Minnesota. p.53, 1986.
- ROGER, H.J.; BUCK, K.W.; BRASIER, C.M. Transmission of double-stranded RNA and a disease factor in *Ophiostoma ulmi*. Plant Pathology, Oxford, 35:277-287, 1986.
- ROGER, H.J.; BUCK, K.W.; BRASIER, C.M. A mitochondrial target for double stranded RNA in diseased isolates of the fungus that causes Dutch elm disease. Nature, London, 329:558-560, 1987.
- ROGER, H.J.; BUCK, K.W.; BRASIER, C.M. Double-stranded RNA in diseased isolates of the aggressive subgroup of the dutch elm disease fungus, *Ophiostoma ulmi*. In: KOLTIN, Y & LEIBOWITZ, M.J. Viruses of Fungi and Lower Eukaryotes. New York, Marcel Dekeer, Inc., 1988. p.327-351.
- SAKAJO, S.; MINAGAWA, N.; KOMIYAMA, T.; YOSHIMOTO, T. Molecular cloning of cDNA for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, 1090:102-108, 1991.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANDERLIN, R.S. & GHABRIAL, S.A. Physicochemical properties of two distinct types of virus-like particles from *Helminthosporium victoriae*. Virology, Amsterdam, 87:142-151, 1978.
- SEIDEL-ROGOL, B.; KING, J.; BERTRAND, H. Instable mtDNA in natural-death nuclear mutants of *Neurospora crassa*. Molecular and Cellular Biology, Washington, 9:4259-4264, 1989.
- SHAPIRA, R.; CHOI, G.H.; NUSS, D.L. Virus-like genetic organization and expression strategy for dsRNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. EMBO Journal, Oxford, 10:731-739, 1991.
- SHENG, T.C. A gene that causes natural death in *Neurospora crassa*. Genetics, Berlin, 36:200-212, 1950.

- SHEPHERD, M.G.; CHIN, C.M.; SULLIVAN, P.A. The alternate respiratory pathway of *Candida albicans*. Archives of Microbiology, 116:61-67, 1978.
- SMITH, J.R. & RUBENSTEIN, I. The development of senescence in *Podospira anserina*. Journal of General Microbiology, London, 76:283-296, 1973.
- SMITH, J.R. & RUBENSTEIN, I. Cytoplasmic inheritance of the timing of senescence in *Podospira anserina*. Journal of General Microbiology, London, 76:297-304, 1973.
- STOREY, B.T. Respiratory chain of plant mitochondria. Plant Physiology, Sofia, 58:521-525, 1976.
- TARTAGLIA, J.; PAUL, C.P.; FULBRIGHT, D.W.; NUSS, D.L. Structural properties of double-stranded RNAs associated with biological control of chestnut blight fungus. Proceedings of the National Academy of Science, (USA), Washington, 83:9109-9113, 1986.
- THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. Microbiology, London, 140:19-26, 1994.
- VAN ALFEN, N.K. Viruses of *Endothia parasitica*. In: KOLTIN, Y. & LEIBOWITZ, M.J. Viruses of Fungi and Simple Eukaryotes. led. New York, Marcel Dekker, Inc., 1988. p.371-386.
- VAN ALFEN, N.K.; JAYNES, R.A.; ANAGNOSTAKIS, S.L.; DAY, P.R. Chestnut blight: biological control by transmissible hypovirulence in *Endothia parasitica*. Science, Washington, 189:890-891, 1975.
- VARLEY, D.A.; PODILA, G.K.; HIREMATH, S.T. Molecular and Cell Biology, Washington, 12:4539-4544, 1992.
- VOGEL, H.J. A convenient medium for *Neurospora*. Microbiol Genet Bulletin, 13:42-43, 1956.
- YONEDA, M.Y.; CHOMYN, A.; MARTINUZZI, A.; HURKO, O.; ATTARDI, G. Marked replicative advantage of human mtDNA carrying a point mutation that causes the MELAS encephalomyopathy. Proceedings of the National Academy of Science, (USA), Washington, 89:11164-11168, 1992.

ZHANG, L.; CHURCHILL, A.C.L.; KAZMIERCZAK, P.; KIM, D.; VAN ALFEN, N.K. Hypovirulence-associated traits induced by a mycovirus of *Cryphonectria parasitica* are mimicked by targeted inactivation of a host gene. Molecular and Cellular Biology, Washington, 13:7782-7792, 1993.

APÊNDICE

Tabela 1. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e a linhagem Ep155.

Colônias	Via alternativa (%)			
	♀Ep339 x Ep155♂			
	P1	P3	P4	P5
1	17.6	10.8	12,2	16,4
2	14.7	5.6	6,9	26,1
3	14.3	18.5	7,9	12,5
4	8.5	3.2	8,2	9,2
5	4.4	9.6	6,3	10,7
6	8.0	3.8	10,3	12,0
7	-	10.5	-	13,8
8	3.4	5.0	-	-
9	10.0	5.2	-	-
10	13.6	-	-	-
Ep339	12.6	12.6	24,0	24,0
Ep155	11.1	11.1	1,8	1,8

Tabela 2. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e a linhagem Ep155.

Colônias	Via alternativa (%)				
	♀Ep155 x Ep339♂				
	P3	P4	P7	P8	P5
1	13,8	3,3	9,0	13,5	10,6
2	17,5	10,4	15,0	16,6	11,0
3	14,6	12,2	13,0	16,6	14,3
4	17,2	12,6	8,7	20,0	11,5
5	20,5	11,0	15,6	10,6	15,4
6	14,1	3,8	25,2	12,0	11,7
7	15,0	9,0	10,7	12,8	12,0
8	7,7	8,3	-	20,8	12,2
9	13,1	8,0	-	10,8	13,4
10	14,7	10,5	-	18,0	6,0
Ep339	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5
Ep155	12,4	12,4	12,4	12,4	

Tabela 3. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante respiratório 181.3.

Colônias	Via alternativa (%)				
	♀181.3 x Ep339♂				
	P1	P22	P21	P23	P31
1	10,0	74,8	98,4	11,7	8,8
2	86,1	17,8	77,5	25,8	78,1
3	84,4	58,5	19,0	72,3	52,4
4	68,9	6,9	22,0	70,6	63,0
5	71,2	74,7	19,4	71,9	10,0
6	22,5	16,4	18,6	11,7	18,8
7	75,6	17,8	10,9	18,5	59,3
8	26,3	61,0	19,0	17,9	76,9
9	78,3	66,9	13,7	21,0	49,5
10	17,1	15,3	8,2	71,7	69,3
Ep339	26,1	29,0	16,3	29,0	28,2
181.3	65,2	53,8	49,4	53,8	65,5

Tabela 4. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante respiratório 180.17.

Colônias	Via alternativa (%)				
	♀180.17 x Ep339♂				
	P1	P31	P103	P101	P12
1	93,4	27,5	16,3	81,0	100,0
2	12,0	21,5	75,0	3,3	20,2
3	12,2	73,3	78,4	79,0	17,9
4	92,1	76,3	6,3	11,4	97,2
5	12,4	30,8	84,4	12,5	73,5
6	12,8	19,4	51,1	87,6	16,6
7	9,4	17,9	16,7	12,5	19,4
8	12,6	82,9	73,8	66,7	20,7
9	100,0	19,2	85,6	81,0	17,9
10	13,1	87,3	4,6	97,2	28,2
Ep339	10,5	2,1	9,0	9,0	18,5
180.17	57,1	66,7	62,9	62,9	83,3

Tabela 5. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante respiratório 180.17.

Colônias	Via alternativa (%)			
	♀Ep339 x 180.17♂			
	P8	P6	P51	P52
1	5,0	89,5	7,3	15,6
2	93,5	93,4	75,3	9,4
3	80,0	12,5	11,6	7,5
4	42,9	16,0	74,3	36,8
5	76,6	75,0	16,7	8,4
6	100,0	14,1	6,0	78,6
7	8,5	15,8	14,3	11,4
8	98,6	9,0	17,2	100,0
9	17,7	66,9	55,6	88,9
10	4,4	12,2	75,0	83,3
Ep339	7,3	7,3	24,0	24,0
180.17	81,0	81,0	73,9	73,9

Tabela 6. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante respiratório 193.1.

Colônias	Via alternativa (%)				
	♀193.1 X ♂Ep339				
	P2	P1	P5	P6	P7
1	64,1	15,7	18,2	20,6	25,0
2	12,3	19,6	16,7	13,3	79,5
3	87,9	13,4	95,9	77,8	83,2
4	102,2	82,9	90,0	19,6	24,6
5	78,8	61,1	8,7	29,4	90,0
6	88,2	93,8	12,9	76,0	102,1
7	13,4	97,2	14,1	85,5	14,3
8	12,6	14,8	10,1	8,4	88,5
9	5,6	88,9	57,9	22,3	94,4
10	83,3	83,6	16,9	97,1	100,0
Ep339	25,8	21,5	21,5	32,3	32,3
193.1	87,1	84,3	84,3	105,0	105,0

Tabela 7. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante respiratório 53.14.

Colônias	Via alternativa (%)			
	♀53.14 x Ep339♂			
	P1	P2	P3	P5
1	20,0	81,3	16,0	31,3
2	71,3	7,7	7,0	25,4
3	84,8	14,2	69,1	22,2
4	87,5	8,5	74,1	19,3
5	81,5	16,5	14,7	27,5
6	24,0	50,0	17,6	6,5
7	13,5	17,3	8,3	38,9
8	3,4	76,9	66,6	41,7
9	12,7	15,5	41,4	23,9
10	7,7	17,8	19,8	13,2
Ep339	12,2	12,2	15,1	15,1
53.14	89,5	89,5	57,5	57,5

Tabela 8. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante respiratório 53.14.

Colônia	Via alternativa (%)				
	♀Ep339 x ♂53.14				
	P4	P2	P3	P5	P1
1	17,6	18,8	58,0	68,6	49,6
2	84,0	9,4	14,6	53,6	9,2
3	15,0	83,5	7,1	72,3	58,7
4	80,0	94,0	8,0	69,6	35,7
5	13,7	80,1	14,8	77,5	13,7
6	78,6	17,2	11,3	76,6	47,1
7	4,5	37,6	64,3	55,1	77,8
8	86,8	108,7	18,4	73,4	20,9
9	63,0	88,3	23,1	18,4	17,2
10	91,9	11,0	90,6	59,4	15,2
Ep339	7,9	7,9	7,9	19,1	19,1
53.14	67,5	67,5	67,5	57,7	57,7

Tabela 9. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante respiratório 135.9.

Colônias	Via alternativa (%)			
	♀Ep339 X ♂135.9			
	P1	P2	P3	P5
1	16,5	24,0	19,0	0
2	13,0	17,5	15,9	13,9
3	0	18,7	21,4	14,7
4	23,4	16,7	14,9	16,7
5	10,0	11,4	9,7	13,9
6	13,3	24,0	14,6	4,0
7	17,8	5,2	25,0	13,5
8	11,9	13,5	13,4	18,4
9	19,3	9,8	8,2	14,4
10	27,0	17,5	25,5	9,7
11	16,3	17,4	-	-
12	16,8	19,4	-	-
13	16,5	13,5	-	-
14	19,0	21,7	-	-
15	24,4	10,1	-	-
Ep339	13,6	23,2	8,18	8,18
135.9	67,5	73,1	73,8	73,8

Tabela 10. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante respiratório 135.12.

Colônias	Via alternativa (%)					
	♀Ep339 x 135.12♂					
	P10	P2	P3	P11	P12	P13
1	25,7	32,3	15,1	22,5	14,5	13,5
2	20,0	20,6	20,6	32,7	-	18,0
3	30,8	19,0	23,8	18,5	18,9	13,4
4	31,5	19,0	18,4	28,6	30,8	14,2
5	35,7	26,8	21,6	28,6	13,6	18,8
6	21,2	30,4	20,4	20,0	19,4	12,1
7	24,2	27,8	22,9	20,0	14,0	12,2
8	25,0	23,8	17,5	21,2	8,0	7,0
9	29,9	20,6	24,5	17,4	18,5	18,0
10	36,6	25,3	23,1	13,4	17,4	7,6
Ep339	15,6	24,3	15,6	22,9	34,5	34,5
135.12	100,0	84,9	100,0	86,8	78,2	78,2

Tabela 11. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem Ep339 e o mutante respiratório 135.12.

Colônias	Via alternativa (%)					
	♀135.12 X Ep339♂					
	P1	P10	P3	P9	P6	P5
1	15,0	22,4	20,0	15,0	17,6	16,8
2	11,4	13,6	9,8	26,4	16,1	17,1
3	12,0	25,0	19,0	29,7	14,0	21,1
4	13,7	25,0	14,7	11,4	24,4	17,0
5	11,0	25,9	17,6	19,1	12,0	12,4
6	7,2	25,0	15,6	16,0	13,8	30,8
7	11,2	18,5	18,0	17,3	10,9	29,7
8	12,5	16,1	11,0	11,0	9,8	24,7
9	12,1	13,3	13,5	26,0	21,8	21,7
10	10,6	15,8	14,2	16,4	16,0	22,2
11	20,4	-	13,4	-	-	24,7
12	20,0	-	18,0	-	-	21,8
13	13,8	-	13,4	-	-	25,7
14	14,1	-	14,7	-	-	-
15	25,0	-	12,5	-	-	-
16	17,5	-	15,5	-	-	-
17	5,4	-	16,8	-	-	-
Ep339	16,8	27,2	27,2	17,4	20,3	20,3
135.12	72,6	100,0	100,0	78,8	51,2	51,2

Tabela 12. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre as linhagens 80-2c e Ep155. Os números em "bold" representam as colônias de micélio marrom e os números normais as colônias de micélio laranja.

Colônias	Via alternativa (%)				
	♀Ep155 X 80-2c♂				
	P1	P2	P3	P5	P10
1	9,4	3,8	4,7	7,0	1,6
2	13,6	12,6	8,2	0	20,3
3	16,2	11,0	6,8	12,5	0
4	15,3	6,3	13,2	15,0	6,0
5	1,8	3,4	3,0	8,1	20,7
6	6,7	7,0	1,8	14,1	14,7
7	12,5	5,3	8,2	7,5	22,5
8	25,6	5,3	2,3	9,0	9,4
9	6,3	32,2	3,0	7,4	32,4
10	13,2	19,8	1,2	3,9	8,7
80-2c	23,9	23,9	32,2	32,2	32,2
Ep155	14,8	14,8	31,0	31,0	31,0

Tabela 13. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre as linhagens 80-2c e Ep155. Os números em "bold" representam as colônias de micélio marrom e os números normais as colônias de micélio laranja.

Colônias	Via alternativa (%)				
	♀80-2c x Ep155♂				
	P1	P2	P3	P4	P6
1	1,4	18,0	8,9	9,6	5,8
2	17,4	11,0	15,0	16,7	16,9
3	16,0	11,3	2,9	7,0	18,0
4	21,7	17,4	6,5	6,4	13,8
5	15,0	15,9	10,5	9,7	10,5
6	14,3	11,1	9,0	12,9	21,1
7	11,5	15,3	9,3	10,6	13,8
8	15,4	15,7	19,5	20,9	6,7
9	23,1	6,5	15,7	8,0	15,9
10	-	10,0	15,2	30,0	5,5
80-2c	21,7	8,0	21,7	21,7	21,7
Ep155	4,1	8,6	4,1	4,1	4,1

Tabela 14. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante respiratório 180.17. Os números em "bold" representam as colônias de micélio marrom e os números normais as colônias de micélio laranja.

Colônias	Via alternativa (%)			
	♀80-2c x 180.17♂			
	P1	P2	P3	P4
1	87,9	78,4	66,7	11,1
2	94,2	21,4	77,1	81,6
3	14,3	83,1	2,5	10,9
4	13,3	85,1	81,6	9,4
5	13,9	26,9	11,8	28,0
6	89,7	21,2	40,0	7,6
7	20,0	23,0	66,5	17,8
8	23,1	21,9	12,9	7,0
9	18,8	15,4	21,2	21,3
10	-	13,2	13,3	9,6
80-2c	29,4	14,8	14,8	29,4
180.17	80,0	70,7	70,7	80,0

Tabela 15. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante respiratório 180.17. Os números em "bold" representam as colônias de micélio marrom e os números normais as colônias de micélio laranja.

Colônias	Via alternativa (%)				
	♀180.17 x 80-2c♂				
	P1	P2	P3	P4	P5
1	11,5	8,9	18,5	17,7	16,0
2	81,5	71,7	14,1	85,2	77,8
3	69,7	14,2	57,2	12,8	13,7
4	12,0	63,3	75,9	10,9	5,6
5	11,4	60,0	16,8	71,4	85,5
6	90,0	66,2	9,4	-	20,0
7	75,0	14,1	10,0	86,3	21,7
8	11,0	10,4	34,6	80,0	19,7
9	18,1	64,4	75,2	97,2	80,0
10	13,2	66,8	86,7	87,1	93,4
80-2C	19,6	19,6	16,7	19,6	16,7
180.17	50,0	50,0	40,9	50,0	40,9

Tabela 16. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante respiratório 181.3. Os números em "bold" representam as colônias de micélio marrom e os números normais as colônias de micélio laranja.

Colônias	Via alternativa (%)				
	♀80-2c x 181.3♂				
	P4	P10	P11	P12	P13
1	10,6	46,6	55,0	19,2	11,5
2	83,3	61,3	66,8	21,3	71,0
3	20,5	14,2	5,8	15,3	56,3
4	28,7	73,0	67,8	54,0	45,5
5	10,0	67,6	53,5	11,8	19,2
6	20,8	18,3	58,7	49,0	27,3
7	85,0	10,2	59,5	13,2	20,4
8	21,4	19,0	4,6	4,1	80,0
9	23,1	65,5	4,4	65,0	73,7
10	17,7	69,6	14,4	15,0	-
80-2c	14,1	17,1	17,1	16,3	17,1
181.3	57,0	57,0	57,0	71,3	57,0

Tabela 17. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante respiratório 181.3. Os números em "bold" representam as colônias de micélio marrom e os números normais as colônias de micélio laranja.

Colônias	Via alternativa (%)					
	♀181.3 x 80-2c♂					
	P1	P2	P3	P4	P5	P12
1	13,8	65,4	17,3	60,0	17,1	19,2
2	90,7	86,7	64,2	55,6	77,0	21,3
3	75,0	63,0	19,6	50,0	4,8	15,3
4	81,7	8,0	71,4	55,0	67,2	54,0
5	4,6	74,6	12,4	46,5	5,8	11,8
6	4,9	73,4	58,5	5,8	2,8	49,0
7	70,9	71,2	58,4	66,7	66,5	13,2
8	45,0	66,3	29,9	17,3	75,0	4,1
9	7,6	62,2	12,9	12,5	52,1	65,0
10	86,5	7,0	62,7	-	71,4	15,0
80-2c	2,4	2,4	7,9	4,0	2,4	4,0
181.3	62,0	62,0	50,9	49,1	62,0	49,1

Tabela 18. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante respiratório 193.1. Os números em "bold" representam as colônias de micélio marrom e os números normais as colônias de micélio laranja.

Colônias	Via alternativa (%)				
	♀193.1 x 80-2c♂				
	P10	P11	P12	P13	P36
1	14,0	10,1	31,3	7,7	22,6
2	56,5	19,0	64,8	1,0	16,5
3	9,4	21,3	94,4	86,5	23,6
4	14,5	15,2	12,4	1,2	92,0
5	8,3	80,9	74,5	6,1	-
6	85,0	81,3	64,0	63,0	7,6
7	90,8	72,5	14,1	71,9	82,7
8	66,8	14,8	87,5	69,3	18,6
9	92,4	77,2	24,7	71,4	69,7
10	79,3	70,0	11,7	-	14,8
80-2c	29,7	29,7	29,4	7,9	29,7
193.1	83,0	83,0	60,0	72,4	83,0

Tabela 19. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante respiratório 193.1. Os números em "bold" representam as colônias de micélio marrom e os números normais as colônias de micélio laranja.

Colônias	Via alternativa (%)				
	♀80-2c x 193.1♂				
	P1	P2	P4	P5	P4v
1	6,3	63,9	21,0	11,0	82,3
2	14,0	14,9	16,7	86,6	4,1
3	9,3	8,9	14,7	70,8	13,9
4	25,7	13,9	12,7	5,8	20,3
5	13,0	94,5	81,7	15,0	16,3
6	8,3	12,1	4,0	11,5	8,3
7	81,4	10,9	72,7	7,6	86,8
8	17,5	71,7	6,9	12,0	24,5
9	81,4	95,4	8,0	17,6	25,0
10	67,4	10,6	55,1	14,2	18,5
80-2c	4,0	4,0	7,9	7,9	22,0
193.1	86,8	86,8	72,4	72,4	93,8

Tabela 20. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante respiratório 135.9. Os números em "bold" representam as colônias de micélio marrom e os números normais as colônias de micélio laranja.

Colônias	Via alternativa (%)						
	♀80-2c x 135.9						
	P7	P2	P9	P6	P51	P52	P8
1	14,3	10,5	16,4	10,7	8,0	8,3	17,1
2	9,7	17,5	13,3	2,9	12,5	8,0	14,4
3	14,2	16,9	15,9	16,7	6,0	11,6	8,6
4	12,3	11,6	13,8	8,4	18,0	4,9	12,1
5	13,5	9,8	11,5	11,2	12,5	15,5	9,3
6	16,9	8,9	23,6	9,5	-	4,1	6,4
7	5,9	12,4	7,2	5,8	13,0	12,0	22,9
8	12,4	11,1	21,2	14,1	9,4	12,4	7,8
9	22,5	13,4	8,2	2,0	23,5	9,2	35,3
10	27,1	15,2	24,4	8,0	13,1	16,7	-
11	-	-	-	-	8,9	16,0	-
80-2C	8,4	8,4	8,4	8,3	10,9	24,6	8,3
135.9	78,0	78,0	78,0	73,8	71,9	68,1	73,8

Tabela 21. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante respiratório 135.9. Os números em "bold" representam as colônias de micélio marrom e os números normais as colônias de micélio laranja.

		Via alternativa (%)													
Colônias		‡135.9 x 80-2Cd													
		P10	P13	P15	P110	P100	P101	P104	P103	P105	P6				
1		79,7	78,6	70,8	42,4	45,0	60,0	51,4	44,9	59,4	65,2				
2		74,9	84,0	44,2	50,3	41,7	87,0	-	45,5	44,8	50,0				
3		86,7	78,8	75,5	85,0	57,5	43,4	66,7	72,1	63,6	58,3				
4		81,5	95,9	76,9	60,0	62,1	58,3	-	-	-	40,2				
5		81,7	77,8	66,5	66,7	61,3	67,4	66,5	72,2	69,2	62,5				
6		54,5	66,8	-	63,7	75,0	73,3	55,4	63,4	51,1	69,5				
7		87,3	89,6	51,8	54,5	82,4	48,1	61,8	47,2	-	57,1				
8		84,0	79,5	38,0	69,0	60,9	43,3	58,7	71,5	67,4	33,8				
9		84,0	76,7	73,7	-	54,7	25,0	66,7	78,1	76,3	-				
10		76,1	84,0	-	71,1	66,7	85,5	101,6	64,3	32,1	-				
11		45,8	40,9	45,0	61,1	39,0	72,2	52,9	63,2	76,1	-				
12		46,8	44,0	50,8	-	-	48,0	-	-	48,3	-				
13		38,5	49,0	-	-	-	-	-	-	-	-				
14		43,2	52,9	-	-	-	-	-	-	-	-				
15		40,0	45,0	-	-	-	-	-	-	-	-				
80-2c		22,4	22,4	10,9	4,1	4,1	4,1	4,1	8,6	8,6	14,8				
135.9		74,7	74,7	71,9	52,0	52,0	52,0	52,0	77,8	77,8	43,7				

Tabela 22. Percentagem de respiração pela via alternativa da progênie do cruzamento entre a linhagem 80-2c e o mutante respiratório 135.12. Os números em "bold" representam as colônias de micélio marrom e os números normais as colônias de micélio laranja.

Colônias	Via alternativa (%)				
	♀80-2c x 135,12♂				
	P2	P3	P1	P4	P5
1	12,7	1,5	16,4	27,7	9,8
2	23,0	12,0	14,7	5,3	15,3
3	8,5	10,7	7,9	10,6	8,0
4	27,0	31,7	6,0	2,5	8,5
5	15,6	9,4	24,4	18,9	6,7
6	24,3	9,1	10,0	7,0	7,6
7	3,1	18,0	9,2	4,1	4,6
8	25,1	14,7	8,1	11,7	8,7
9	11,6	15,0	6,8	6,1	9,7
10	1,0	-	5,7	15,3	20,2
80-2c	11,6	11,6	5,0	5,0	5,0
135.12	52,5	52,5	43,8	43,8	43,8