

**MUTAGENICIDADE NO *locus* RESPONSÁVEL PELA RESISTÊNCIA AO
FUNGICIDA CLORONEB EM *Aspergillus nidulans***

Tadeu Elisbão
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Orientador : JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

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

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

Aos Geneticistas e Formadores de Cientistas

JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

e

NEWTON FREIRE-MAIA.

Minha admiração

A

DOMINGAS, minha mãe,
SEBASTIÃO, meu pai,
MARIA DO CARMO, minha esposa,

DEDICO

Minúsculos seres sao minúsculos seres.
(2) (4)

AGRADECIMENTOS

Quero registrar aqui o meu agradecimento a todas as pessoas e instituições que contribuíram para a realização deste trabalho e de modo especial ao(s):

- Prof. João Lúcio de Azevedo, pela orientação, paciência e sobretudo pelo bom exemplo.
- Demais professores do Instituto de Genética da ESALQ/USP, pela solicitude e pelos ensinamentos transmitidos.
- Amigos do Setor de Genética de Microrganismos, contemporâneos de pós-graduação, pelo companheirismo e estímulo constantes.
- Funcionários do Instituto de Genética da ESALQ/USP, pela presteza dos seus serviços.
- Técnicos do Setor de Genética de Microrganismos, em particular, pelo inestimável auxílio nos procedimentos laboratoriais.
- Instituto de Genética da ESALQ/USP, na pessoa do seu diretor, Prof. Ernesto Paterniani, por ter me permitido a utilização das suas instalações, equipamentos e material de laboratório.
- Colegas do Departamento de Biologia Geral do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade a mim concedida.
- Prof. Mário Arthur Gabrielli, desse mesmo departamento, pela cuidadosa revisão dos originais.
- Ministério da Educação e Cultura juntamente com a Universidade Estadual de Londrina que através do Convênio FUEL-PICD-CAPES concederam-me a bolsa de estudos que me possibilitou frequentar o curso de pós-graduação.

" CURRICULUM VITAE "

Tadeu Elisbão, natural de São Paulo, licenciou-se em Ciências Físicas e Biológicas pela extinta Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Londrina em 1969.

Iniciou a carreira docente nessa mesma instituição em 1970 na qualidade de Professor Colaborador.

Com a implantação da Universidade Estadual de Londrina foi contratado para a função de Auxiliar de Ensino no Departamento de Biologia Geral.

Obteve o título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná em 1976.

No ano seguinte, mediante concurso público, galgou ao cargo de Professor Assistente na área de Genética do Departamento de Biologia Geral da UEL.

Ingressou no Curso de Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em 1978.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. RESUMO	01
2. INTRODUÇÃO	03
3. REVISÃO DA LITERATURA.	06
3.1. Resistência a substâncias fungitóxicas.	06
3.2. Sistemas para averiguação e quantificação de efeitos mutagênicos em <i>A. nidulans</i>	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Linhagens utilizadas.	20
4.1.1. Linhagem MSE	20
4.1.2. Linhagem <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂	21
4.1.3. Linhagem <i>bia</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁	21
4.1.4. Linhagem CHL-1	21
4.1.5. Linhagem CHL-13.	22
4.1.6. Símbolos dos marcadores genéticos das linhagens supracitadas e correspondentes fenótipos.	22
4.2. Meios de cultura e soluções utilizados.	23
4.2.1. Meio mínimo.	23
4.2.2. Meio completo sólido	23
4.2.3. Meio de acetato de amônio.	24
4.2.4. Meio de galactose.	24
4.2.5. Meio mínimo líquido acrescido de 2% de meio completo.	24
4.2.6. Meios de análise	24
4.2.7. Suplementos adicionados ao meio mínimo	25
4.2.8. Solução de vitaminas	26
4.2.9. Hidrolisado de ácido nucléico de leveduras.	26
4.2.10. Solução salina.	26
4.2.11. Solução de "tween 80"	27
4.2.12. Solução de <i>p</i> -fluorofenilalanina	27
4.2.13. Solução de benlate.	27
4.2.14. Soluções de cloroneb.	27
4.2.15. Solução de nitrito de sódio	28
4.2.16. Solução fosfato pH 7,0.	28
4.2.17. Solução acetato pH 4,4.	28
4.2.18. Solução de metano-sulfonato de etila.	29
4.2.19. Solução de dietilsulfato.	29
4.2.20. Solução de 8-metoxipsoraleína	29

	<u>Página</u>
4.3. Condições de preparo, esterilização e conservação das soluções e dos meios de cultura	30
4.4. Esterilização da vidraria e instrumental. . . .	31
4.5. Inoculação.	31
4.6. Incubação	32
4.7. "Purificação" de linhagens.	33
4.8. Obtenção de mutantes espontâneos.	33
4.8.1. Mutantes resistentes ao cloroneb	33
4.8.2. Mutantes sensíveis ao cloroneb	34
4.9. Curvas de dose-resposta	34
4.10. Técnicas de análise genética	35
4.10.1. Obtenção de heterocários.	35
4.10.2. Teste do heterocário.	36
4.10.3. Segregação meiótica	37
4.10.4. Isolamento de diplóides	38
4.10.5. Análise mitótica.	39
4.10.6. Análise meiótica.	40
4.10.7. Teste de alelismo	41
4.10.8. Relações de dominância-recessividade. .	42
4.11. Indução de mutantes através de tratamentos mutagênicos.	42
4.11.1. Tratamento com ácido nitroso.	43
4.11.2. Tratamento com metano-sulfonato de etila.	44
4.11.3. Tratamento com dietilsulfato.	44
4.11.4. Tratamento com 8-metoxipsoraleína associada à luz ultravioleta longa.	45
5. RESULTADOS	47
5.1. Obtenção de mutantes espontâneos.	47
5.1.1. Mutantes resistentes ao cloroneb	47
5.1.1.1. A partir da linhagem MSE. . . .	47
5.1.1.2. A partir da linhagem <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂	48
5.1.2. Mutantes sensíveis ao cloroneb	48
5.1.2.1. A partir da linhagem CHL-1. . . .	48
5.1.2.2. A partir da linhagem CHL-13 . . .	49
5.2. Caracterização dos mutantes resistentes	49

	<u>Página</u>
5.2.1. Inibição em presença de cloroneb	49
5.2.2. Relações de dominância-recessividade . .	53
5.3. Análise genética dos mutantes resistentes . . .	66
5.3.1. Teste do heterocário	66
5.3.2. Determinação do número de locos responsá veis pela resistência.	68
5.3.3. Localização dos genes para resistência nos respectivos grupos de ligação. . . .	68
5.3.4. Mapeamento dos genes para resistência dentro dos grupos de ligação	71
5.3.5. Sondagem de alelismo	71
5.4. Caracterização e análise genética dos mutantes sensíveis	74
5.5. Teste de alelismo entre os genes <i>Chl₁</i> e <i>chl₁₃</i> .	75
5.6. Tratamentos mutagênicos	82
5.6.1. Sobrevivência de conídios.	82
5.6.2. Curvas de sobrevivência.	82
5.6.3. Obtenção de mutantes	99
5.6.3.1. Por meio de colônias monospóri- cas	99
5.6.3.2. Por semeadura de um grande núme ro de conídios.	99
6. DISCUSSÃO.	103
6.1. Obtenção de mutantes espontâneos.	103
6.2. Caracterização dos mutantes	105
6.2.1. Resistentes.	105
6.2.2. Sensíveis.	108
6.3. Análise genética.	109
6.3.1. Dos mutantes resistentes	109
6.3.2. Dos mutantes sensíveis	111
6.4. Tratamentos mutagênicos	111
6.5. Aspectos a destacar no fenômeno resistência-ao- cloroneb.	117
7. CONCLUSÕES	120
8. SUMMARY.	122
9. LITERATURA CITADA.	124

LISTA DAS TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Diâmetros (em milímetros) de colônias de 8 linhagens desenvolvidas em concentrações crescentes de cloroneb.	50
2 - Crescimento percentual das colônias de cada linhagem da Tabela 1 em relação a concentrações crescentes de cloroneb	51
3 - Valores do ED ₅₀ das linhagens caracterizadas nas Tabelas 1 e 2 e também na Figura 1	53
4 - Diâmetros (em mm) de colônias das linhagens CHL-16//MSE, CHL-16 e MSE ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb.	54
5 - Diâmetros (em mm) de colônias das linhagens CHL-17//MSE, CHL-17 e MSE ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb.	56
6 - Diâmetros (em mm) de colônias das linhagens CHL-18//MSE, CHL-18 e MSE ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb.	58
7 - Diâmetros (em mm) de colônias das linhagens CHL-19//ppy, CHL-19 e ppy ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb.	60
8 - Diâmetros (em mm) de colônias das linhagens CHL-20//ppy, CHL-20 e ppy ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb.	62
9 - Diâmetros (em mm) de colônias das linhagens CHL-21//ppy, CHL-21 e ppy ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb.	64
10 - Resultados do teste do heterocário aplicado às linhagens resistentes.	67
11 - Segregação meiótica nos cruzamentos das linhagens resistentes com a MSE ou ppy.	69
12 - Análise mitótica dos segregantes haplóides das linhagens CHL-16//MSE, CHL-17//MSE, CHL-18//MSE, CHL-19//ppy, CHL-20//ppy e CHL-21//ppy	70
13 - Análise meiótica das mutações para a resistência.	72

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
14 - Teste de alelismo aplicado às 6 mutações para a resistência.	73
15 - Desenvolvimento de colônias das linhagens CHL-1 (resistente), <i>bia</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁ (sensível) e CHL-1(Chl ₁ ^S), CHL-1(Chl ₂ ^S), CHL-1(Chl ₃ ^S) (derivadas da primeira) ensaiadas sob doses crescentes de cloroneb	76
16 - Desenvolvimento de colônias das linhagens CHL-13 (resistente), <i>ppy</i> (sensível) e CHL-13(Chl ₁ ^S), CHL-13(Chl ₂ ^S) (derivadas da primeira) ensaiadas sob doses crescentes de cloroneb	78
17 - Análise mitótica dos segregantes haplóides das linhagens CHL-1(Chl ₁ ^S)//MSE, CHL-1(Chl ₂ ^S)//MSE, CHL-1(Chl ₃ ^S)//MSE e CHL-13(Chl ₁ ^S)//MSE.	80
18 - Análise meiótica das linhagens CHL-1(Chl ₁ ^S), CHL-1(Chl ₂ ^S), CHL-1(Chl ₃ ^S) e CHL-13(Chl ₁ ^S).	81
19 - Sobrevivência de conídios da linhagem MSE submetidos ao tratamento com ácido nitroso.	83
20 - Sobrevivência de conídios da linhagem <i>ppy</i> submetidos ao tratamento com ácido nitroso.	84
21 - Sobrevivência de conídios da linhagem CHL-13 submetidos ao tratamento com ácido nitroso.	85
22 - Sobrevivência de conídios da linhagem CHL-1 submetidos ao tratamento com ácido nitroso.	86
23 - Sobrevivência de conídios da linhagem MSE submetidos ao tratamento com metano-sulfonato de etila (EMS)	87
24 - Sobrevivência de conídios da linhagem <i>ppy</i> submetidos ao tratamento com metano-sulfonato de etila (EMS)	88
25 - Sobrevivência de conídios da linhagem CHL-13 submetidos ao tratamento com metano-sulfonato de etila (EMS)	89
26 - Sobrevivência de conídios da linhagem CHL-1 submetidos ao tratamento com metano-sulfonato de etila (EMS)	90

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
27 - Sobrevivência de conídios da linhagem MSE submetidos ao tratamento com dietilsulfato (DES). . .	91
28 - Sobrevivência de conídios da linhagem <i>ppy</i> submetidos ao tratamento com dietilsulfato (DES) . .	91
29 - Sobrevivência de conídios da linhagem CHL-13 submetidos ao tratamento com dietilsulfato (DES). .	92
30 - Sobrevivência de conídios da linhagem CHL-1 submetidos ao tratamento com dietilsulfato (DES).. .	92
31 - Sobrevivência de conídios da linhagem MSE submetidos ao tratamento com 8-metoxipsoraleína associada à luz ultravioleta longa (8-MOP + UVL) . .	93
32 - Sobrevivência de conídios da linhagem <i>ppy</i> submetidos ao tratamento com 8-metoxipsoraleína associada à luz ultravioleta longa (8-MOP + UVL) . .	93
33 - Sobrevivência de conídios da linhagem CHL-13 submetidos ao tratamento com 8-metoxipsoraleína associada à luz ultravioleta longa (8-MOP + UVL) .	94
34 - Sobrevivência de conídios da linhagem CHL-1 submetidos ao tratamento com 8-metoxipsoraleína associada à luz ultravioleta longa (8-MOP + UVL) .	94
35 - Frequência de setores mutantes observados em colônias monospóricas das linhagens MSE, <i>ppy</i> (sensíveis) e CHL-13, CHL-1 (resistentes).	101
36 - Obtenção de colônias resistentes a partir de conídios da linhagem <i>ppy</i> tratados com os mutagênicos indicados.	102

LISTA DAS FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Marcadores genéticos da linhagem MSE	20
2 - Marcadores genéticos da linhagem <i>proA</i> ₁ ; <i>pabaA</i> ₆ ; <i>yA</i> ₂	21
3 - Marcadores genéticos da linhagem <i>biA</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁	21
4 - Curvas de dose-resposta das linhagens MSE, <i>ppy</i> (sensíveis) e CHL-16, CHL-17, CHL-18, CHL-19, CHL-20, CHL-21 (resistentes).	52
5 - Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-16//MSE, CHL-16 e MSE, construídas com base nos dados da Tabela 4	55
6 - Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-17//MSE, CHL-17 e MSE, construídas com base nos dados da Tabela 5	57
7 - Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-18//MSE, CHL-18 e MSE, construídas com base nos dados da Tabela 6	59
8 - Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-19// <i>ppy</i> , CHL-19 e <i>ppy</i> , construídas com base nos dados da Tabela 7	61
9 - Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-20// <i>ppy</i> , CHL-20 e <i>ppy</i> , construídas com base nos dados da Tabela 8	63
10 - Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-21// <i>ppy</i> , CHL-21 e <i>ppy</i> , construídas com base nos dados da Tabela 9	65
11 - Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-1 (resistente), <i>biA</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁ (sensível), CHL-1(Chl ₁ ^S), CHL-1(Chl ₂ ^S) e CHL-1(Chl ₃ ^S).	77
12 - Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-13 (resistente), <i>ppy</i> (sensível) e CHL-13(Chl ₁ ^S), CHL-13(Chl ₂ ^S) (ambas derivadas da primeira)	79
13 - Curvas de sobrevivência de conídios das linhagens MSE, <i>ppy</i> , CHL-13 e CHL-1 submetidos ao tratamento com ácido nitroso.	95

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
14 - Curvas de sobrevivência de conídios das linhagens MSE, <i>ppy</i> , CHL-13 e CHL-1 submetidos ao tratamento com metano-sulfonato de etila (EMS).	96
15 - Curvas de sobrevivência de conídios das linhagens MSE, <i>ppy</i> , CHL-13 e CHL-1 submetidos ao tratamento com dietilsulfato (DES).	97
16 - Curvas de sobrevivência de conídios das linhagens MSE, <i>ppy</i> , CHL-13 e CHL-1 submetidos ao tratamento com 8-metoxipsoraleína associada à luz ultravioleta longa (8-MOP + UVL)	98

1. RESUMO

Esta investigação foi levada a efeito com o objetivo de estudar geneticamente o fenômeno da resistência ao fungicida cloroneb (1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno) em *Aspergillus nidulans*.

Através de mutações espontâneas foram obtidos 6 mutantes resistentes ao cloroneb, a partir de linhagens sensíveis. Esses mutantes foram caracterizados quanto à capacidade de crescimento em doses crescentes do fungicida verificando-se que todos eram semidependentes de cloroneb, requerendo a presença da droga no meio de cultura para que suas colônias alcançassem o desenvolvimento máximo. Diplóides construídos entre linhagens resistentes e sensíveis mostraram que a mutação para a resistência foi recessiva em uma linhagem, semidominante em outra e dominante em 4 outras. Em 3 destas últimas linhagens encontrou-se indícios de sobredominância.

Submetidos à análise genética, todos os 6 mutantes revelaram que a resistência era devida a um único gene. Em cada um dos mutantes a análise mitótica atribuiu ao grupo de ligação III o loco responsável pela resistência e a análise meiótica permitiu mapear esse loco a uma distância média de 34 unidades de mapa do marcador *galA1*. Ensaios de alelismo comprovaram que todas as 6 mutações pertenciam ao mesmo

loco.

Procurando-se obter mutantes sensíveis a partir de duas linhagens resistentes ao cloroneb (CHL-1 e CHL-13) apurou-se uma linhagem realmente sensível e outras 3 que continuavam resistentes mas tinham sofrido alterações nos graus de resistência e ou semidependência.

Duas linhagens sensíveis e duas resistentes foram submetidas a 4 diferentes tratamentos mutagênicos: ácido nitroso, metano-sulfonato de etila, dietilsulfato e 8-metoxipsoralena associada à luz ultravioleta longa. Foram traçadas curvas de sobrevivência para cada linhagem em cada tratamento e, com base em tais curvas, estimou-se as doses apropriadas para futuros procedimentos. Procurou-se induzir mutantes resistentes a partir das linhagens sensíveis e vice-versa. Através das frequências de setores mutantes emitidos por colônias monospóricas, advindas de conídios submetidos aos tratamentos, não se detectou efeito residual de nenhum dos mutagênicos. Uma das linhagens sensíveis (*proA₁*; *pabaA₆*; *yA₂*) revelou-se adequada para se quantificar os efeitos dos tratamentos mutagênicos sobre a indução de resistência ao cloroneb já que os mutantes, em meio de cultura adequado, produzem conídios que contrastam francamente com os da linhagem sensível original. Foi sugerido um sistema para a averiguação da capacidade mutagênica de substâncias suspeitas baseado na indução de resistência ao cloroneb em *A. nidulans*.

2. INTRODUÇÃO

Os organismos vivos possuem uma notável potencialidade para se adaptar a mudanças do ambiente. Entre essas mudanças, um tipo que vem assumindo importância cada dia maior é a intervenção por parte do Homem no meio ambiente através da introdução de biocidas além de outros compostos químicos diversos. Por sua vez, as espécies biológicas procuram se adaptar às substâncias que lhes são adversas através da articulação de mecanismos de resistência genética.

Os mutantes que se tornaram resistentes a agentes inibidores têm se constituído em profícuos objetos de estudo. Esta categoria de mutantes tem sido observada em praticamente todos os organismos nos quais se procurou controlar o crescimento populacional através do emprego de agentes tóxicos.

O grande acúmulo de relatos de surgimento de resistência a antibióticos e inseticidas (GEORGOPOULOS e ZARACOVITIS, 1967) ilustra muito bem a afirmação do parágrafo anterior.

O fenômeno também vinha sendo registrado, embora de forma discreta, nos sistemas fungo-fungicida. Entretanto, a partir de 1968 quando se intensificou o emprego dos chamados fungicidas sistêmicos, o problema ganhou nova dimensão.

Estes compostos, via de regra, atuam em um único passo do metabolismo do fungo e, em consequência, apenas uma mutação é suficiente para transformar uma linhagem sensível em resistente.

O cloroneb (1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno) pertence ao grupo dos fungicidas sistêmicos e o aparecimento de resistência a essa droga tem atraído o interesse de vários pesquisadores.

Uma das espécies em que se tem repetidamente procurado investigar a resistência ao cloroneb é *Aspergillus nidulans*, fungo filamentosso, homotático, de propriedades genéticas relativamente bem estabelecidas (PONTECORVO e col., 1953b). Outros conhecimentos a respeito desse fungo e que o recomendam para estudos genéticos versam sobre mutações diretas (ALDERSON e SCAZZOCCHIO, 1967; ALDERSON e HARTLEY, 1969; SCOTT e col., 1977), mutações reversas e genes supressores (LILLY, 1965), genes letais induzidos por mutagênicos (AZEVEDO, 1970) e aberrações cromossômicas (UPSHALL e KÄFER, 1974; NORMANSELL e HOLT, 1979).

Consideradas as vantagens acima expostas, o *A. nidulans* foi escolhido para material biológico do presente trabalho que teve por escopo:

- a) Isolar, caracterizar e analisar geneticamente mutantes de *A. nidulans* resistentes ao cloroneb.
- b) Isolar e caracterizar revertentes sensíveis ao fungicida.
- c) Examinar a mutagenicidade relacionada com o caráter, através da indução de resistência em linhagens sensíveis e vice-versa. Para

esta etapa escolheu-se 4 agentes mutagênicos suficientemente ensaiados em fungos: ácido nitroso, metano-sulfonato de etila, dietilsulfato e 8-metoxipsoraléina associada à luz ultravioleta longa.

- d) Ajustar o sistema "resistência ao cloroneb em *A. nidulans*" para que ele possa ser empregado na averiguação de efeitos mutagênicos de substâncias suspeitas. É notório que o desenvolvimento industrial tem acrescentado um grande número de compostos químicos novos ao meio ambiente nas últimas décadas e dessa maneira os organismos vivos (com interesse especial para os seres humanos) vão ficando cada vez mais expostos ao contato com substâncias pouco conhecidas. Os testes de mutagenicidade empregando mamíferos e células humanas em cultura são dispendiosos e dotados de muitas restrições de forma que se fazem oportunos novos métodos que se valham da simplicidade e rapidez dos procedimentos com microrganismos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Resistência a substâncias fungitóxicas

Este item da revisão irá procurar abranger os principais estudos com conotação genética a respeito do fenômeno da ocorrência de resistência em diferentes espécies de fungos (fitopatogênicos ou não) a substâncias inibidoras. Dentre elas, serão especialmente visados os fungicidas convencionais e, mais particularmente ainda, os fungicidas sistêmicos com ênfase para o cloroneb.

Embora fosse notória desde o início a facilidade com que bactérias adquiriam resistência a antibióticos e insetos se tornavam tolerantes a inseticidas, o fenômeno não encontrava paralelo no grupo dos fungos (DEKKER, 1972, 1976, 1977).

Com a introdução de novos tipos de substâncias antifúngicas nas últimas décadas, começaram a se tornar mais frequentes as descrições de aquisição de resistência a uma da droga. COLE e col. (1968) reportaram casos em que *Sclerotinia homeocarpa* se tornou tolerante a compostos contendo cádmio. Fenômeno semelhante foi registrado por GILPATRICK e BLOWERS (1974) em *Venturia inaequalis* em relação ao fungicida

cida dodine.

A difusão do emprego de um grupo de fungicidas tendo em comum a presença do anel benzênico na molécula fez-se acompanhar por um aumento considerável dos relatos de aparecimento de resistência. Veja-se as publicações de SHATLA e SINCLAIR (1963) com respeito ao pentacloronitrobenzeno, de KUIPER (1965) referindo-se ao hexaclorobenzeno e a de LOCKE (1969) ao lado da de WEBSTER e col. (1970) tratando do dicloran.

O aparecimento de mutantes resistentes também foi observado em laboratório: GEORGOPOULOS (1962a, 1962b, 1963a, 1963b) isolou linhagens de *Hypomyces solani* f. *cucurbitae* resistentes ao cloronitrobenzeno e VOMVOYANNI e GEORGOPOULOS (1966) obtiveram, a partir da mesma espécie, alguns isolados resistentes ao difenil. TILLMAN e SISLER (1971) viram surgir mutantes tolerantes ao cloroneb em *Ustilago maydis*.

Esse período, marcado pela utilização predominante dos fungicidas convencionais (não-sistêmicos), não apresentou casos de emergência de resistência que alcançassem maior importância prática, conforme pode-se constatar na revisão de ASHIDA (1965) tratando dos fungicidas inorgânicos e também na de GEORGOPOULOS e ZARACOVITIS (1967) em que foram abordados os orgânicos.

Em se tratando dos fungicidas sistêmicos, antes mesmo que esses produtos fossem colocados ao alcance dos agricultores, já se tinha conhecimento da facilidade com que surgiam mutantes resistentes (OEKKER, 1977). Este autor compilou 35 relatos de descoberta de resistência, abrangendo 8 diferentes fungicidas sistêmicos e várias espécies de fungos fitopatogênicos.

As espécies nas quais se tornou possível a análise genética, como *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* e

Saccharomyces cerevisiae, foram especialmente visadas para in vestigações objetivando as bases genéticas do fenômeno da re- sistência. Paralelamente, espécies fitopatogênicas como *Venturia inaequalis*, *Ustilago maydis*, *U. ordei* e *Hypomyces solani* foram também alvo de estudos. No que diz respeito aos fungicidas examinados, os esforços se concentraram em torno do grupo dos hidrocarbonetos aromáticos, dos derivados e pro- dutos correlatos do benzimidazol e do grupo dos oxatins (DEK- KER, 1977).

Cruzamentos provocados entre uma linhagem re- sistente e outra sensível a um dado inibidor, via de regra re- velavam que o caráter estava subordinado a um único loco gêni co. Cinco locos, individualmente relacionados com a resistên- cia a hidrocarbonetos aromáticos, foram assinalados por GEOR- GOPOULOS e PANOPOULOS (1966) em *Nectria haematococca*. Em *A. nidulans*, para a mesma classe de fungicidas, THRELFALL (1968) distinguiu 2 locos. Ainda em *A. nidulans*, estudando 9 linhagens resistentes ao benomil obtidas através da irradia- ção de esporos com luz ultravioleta, HASTIE e GEORGOPOULOS (1971) verificaram que em cada linhagem o fenótipo "resistên- cia" estava relacionado com mutação num único loco. Dois den- tre esses genes mutantes foram mapeados: um deles foi atribuí- do ao grupo de ligação II e o outro ao VIII. TUYL (1977) obte- ve confirmação para esses resultados e também conseguiu ma- pear um terceiro gene mutante, atribuindo-o ao grupo de liga- ção VII. O mesmo investigador encontrou também resistência à cicloheximida e ao imazalil em *A. nidulans* obedecendo a pa- drão poligênico. Por sua vez, a resistência ao oxatin induzi- da em *Ustilago ordei* por BEN-YEPHET e col. (1975) denotou se- guir padrão de herança monogênica em algumas linhagens e poli- gênica em outras. Um mutante de *A. nidulans* resistente a es- se mesmo fungicida foi isolado por AZEVEDO e col. (1977). A mutação que conferia resistência mostrou-se dominante e a aná lise genética indicou que o loco correspondente faz parte do

grupo de ligação VII mas não se encontra ligado ao gene *nicB₈*, marcador genético da linhagem testadora (MSE) nesse grupo de ligação. Em *Hypomyces solani* f. *cucurbitae* foram reconhecidos 4 locos distintos relacionados com a tolerância ao dodine (KAPPAS e GEORGOPOULOS, 1970). Uma linhagem de *Ceratocystis ulmi* resistente ao metil-2-benzimidazol-carbamato foi estudada por NISHIJIMA e SMALLEY (1979) que apontaram um único loco interferindo sobre o fenômeno. Vários isolados de *Venturia pirina* resistentes ao carbendazim examinados por SHABI e KATAN (1979) acusaram subordinação do caráter a um único loco em todos os resistentes, sem influências citoplasmáticas ou de genes modificadores.

O fato do nível de resistência se apresentar variável para determinados locos sugeriu a hipótese de mais de um alelo resistente para tais locos (DEKKER, 1972, 1977).

A ocorrência de genes modificadores atuando alternativa ou sinergisticamente com alelos múltiplos foi evocada por VOMVOYANNI (1974) para justificar diferentes níveis de resistência à cicloheximida em *Neurospora crassa*.

Efeitos aditivos de duas ou mais mutações para resistência ao dodine foram registrados em *Nectria haematococca* (KAPPAS e GEORGOPOULOS, 1970). Fenômenos análogos foram descritos por TUYL (1977) em *A. nidulans*, envolvendo a resistência ao benomil num caso e ao imazalil em outro. Por outro lado, a não ocorrência de efeitos aditivos foi constatada por GEORGOPOULOS (1963a,b) em *Hypomyces solani* f. *cucurbitae* onde a presença dentro de um mesmo núcleo de duas mutações para resistência a hidrocarbonetos aromáticos não alterou o nível de resistência conferido por uma única mutação.

A mutação que atribui resistência a um determinado inibidor, examinada ao longo de sucessivas investigações abrangendo diferentes espécies de fungos (tanto fitopatogênicos como inócuos) e uma gama de substâncias antifúngicas (fungici

das ou inibidores atípicos), tem evidenciado comportar-se como recessiva em alguns casos, semidominante em outros e, mais raramente, como dominante. Assim, dentre 3 mutações distintas que conferiam resistência à acriflavina em *A. nidulans*, ROPER e KÄFER (1957) chegaram à conclusão de que duas delas eram semidominantes em contraposição com a terceira que se mostrou recessiva. Para a mesma espécie, WARR e ROPER (1965) identificaram uma mutação dominante (resistência ao iodoacetato), uma semidominante (ao actidione) e 3 recessivas (verde malaquita, teoquil e *p*-fluorofenilalanina). Resistência ao oxatin revelou-se semidominante em *Ustilago maydis* e dominante em *U. ordei* (BEN-YEPHET, 1974). De 3 genes que proporcionavam resistência a esse mesmo inibidor em *A. nidulans*, 2 mostraram-se semidominantes e, o último, dominante (TUYL, 1977). Em *Saccharomyces cerevisiae* WILKIE e LEE (1965) discriminaram com relação à resistência à cicloheximida um gene dominante, 3 semidominantes e 2 recessivos. Resistência a esse mesmo fungicida foi relatada como recessiva por CROUZET e col. (1978) em 3 linhagens distintas de *Podospora anserina*. THRELFALL (1968) encontrou uma mutação recessiva dando resistência ao pentacloronitrobenzeno em *A. nidulans*. Uma mutação semidominante responsável pela resistência ao brometo de etídio foi descrita por SCARAZZATTI e col. (1979) ainda em *A. nidulans* e mapeada no grupo de ligação II. WILLIAMS (1978) distinguiu mutações dominantes e recessivas determinando resistência ao cloreto de cobalto em *Dictyostelium discoideum*.

SANT'ANA (1974) isolou um mutante de *A. nidulans* que tinha adquirido resistência ao dodine. A mutação mostrou-se claramente recessiva e o teste do heterocário (JINKS, 1963) acusou que o fenótipo estava na dependência de fatores extracromossômicos. A existência de genes extranucleares em *A. nidulans* já foi cogitada para explicar a tolerância a antibióticos como a oligomicina (ROWLANDS e TURNER, 1973; 1977; MASON e TURNER, 1975) e o cloranfenicol (MASON e TURNER, 1975;

GUNATILLEKE e col., 1975). COLSON e col. (1979) descobriram que mutações para resistência a diferentes inibidores eram alélicas em 2 locos distintos do genoma mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*.

A possibilidade de que alguns fungicidas também desempenhem o papel de agentes mutagênicos tem sido fortalecida por algumas observações: HASTIE (1970) e KAPPAS e col. (1974) verificaram que o benzimidazol e o tiofanato têm a propriedade de provocar instabilidade mitótica em colônias diplóides de *A. nidulans*. Foi também notado que resistentes ao benomil puderam ser selecionados quando a população sensível foi posta a crescer em meio de cultura contendo a droga; o número de resistentes mostrou-se apreciavelmente maior do que seria de se esperar em decorrência de mutação espontânea (HASTIE e GEORGOPOULOS, 1971). Comportamento semelhante em relação ao benomil foi descrito por DASSENOY e MEYER (1973) em *Fusarium oxysporum*.

O interesse pela fenomenologia subjacente ao fato da resistência foi inspirado pela necessidade de se estudar o problema além do terreno empírico. Assim, PARTRIDGE e RICH (1962) idealizaram uma "enzima adaptativa" para justificar o aumento da tolerância de *Penicillium notatum* ao gliodin e ao captan. Uma compilação a respeito dos presumíveis mecanismos responsáveis pelo aparecimento de resistência a fungicidas foi apresentada por DEKKER (1972, 1977). A tendência mais acentuada é imaginar-se que o mecanismo de resistência se estabelece conforme alguma estratégia que procure neutralizar ou atenuar o papel da molécula inibidora contra o seu ponto de ataque na célula. Isto pode acontecer através de alteração na permeabilidade da membrana, aumento na destoxificação da droga, desenvolvimento de uma via metabólica alternativa, incremento da produção de alguma enzima que venha concorrer para os processos de resistência ou ainda através da redução da afinidade da molécula fungitóxica pelo seu ponto de ligação.

Um exemplo deste último modelo foi fornecido por DAVIDSE (1973) estudando aspectos da resistência de linhagens de *A. nidulans* ao carbendazim. Esta substância, ao que tudo indica, liga-se às subunidades protéicas dos microtúbulos do fuso mitótico do fungo (à semelhança do que faz o anti mitótico colchicina em células humanas em cultura). Trabalhando com extratos celulares de colônias de *A. nidulans* sensíveis à droga e que tinham crescido em contato com ela, Davidse detectou que as partículas de carbendazim apareciam ligadas a macromoléculas muito semelhantes às das proteínas do fuso. Nos extratos de um mutante super-sensível observou-se que essa ligação era intensa ao passo que era quase inexistente no material obtido a partir de uma linhagem resistente. Então, a mutação teria alterado a estrutura molecular de algum componente do fuso, reduzindo a sua afinidade pela molécula de carbendazim.

Ultimamente muitas informações têm sido apuradas em situações específicas. Assim, CROUZET e col. (1978) constataram que num mutante de *Podospora anserina* resistente à cicloheximida esta substância deixou de inibir a elongação da cadeia polipeptídica ao nível dos ribossomos. Os autores acreditam que a resistência teria surgido em consequência de alterações na subunidade 60S daquelas organelas. Um mutante de *Neurospora crassa* resistente à 6-metilpurina mostrou-se deficiente quanto à adenina fosforibosiltransferase e com atividade reduzida da hipoxantina fosforibosiltransferase (PENDYALA e col., 1979). Diferença na mobilidade eletroforética da fosfoglicomutase de variantes de *Eimeria maxima* sensíveis e resistentes a algumas drogas foi descoberta por ROLLINSON e col. (1979). A aquisição de resistência em duas etapas consecutivas foi averiguada por GEESON (1978) em *Botrytis cinerea*. Os mutantes coletados no campo ou induzidos por luz ultravioleta mostraram-se apenas parcialmente tolerantes ao carbendazim. Uma irradiação posterior permitiu então a obtenção de alto

grau de resistência. WAXMAN e col. (1979) mapearam 4 genes nucleares supressores da resistência ao cloranfenicol (de natureza mitocondrial) em *Saccharomyces cerevisiae*. SPITHILL e col. (1979) verificaram alterações nas propriedades dos ribossomos de indivíduos dessa espécie que haviam se tornado resistentes à neomicina e à paramomicina. KUNS e BALL (1977) descobriram, mediante tratamento com brometo de etídio, que o fator responsável pela resistência à glucosamina, localizado na mitocôndria de *S. cerevisiae*, não se situa ao nível do DNA mitocondrial.

Considerando-se especificamente o fungicida cloroneb deve-se destacar que o seu trajeto e a sua ação no organismo do fungo ainda não estão perfeitamente esclarecidos e conseqüentemente não se pode pretender explicações concisas para os mecanismos de resistência. Contudo, algumas informações fragmentárias podem concorrer para a compreensão de alguns aspectos do problema. Assim, HOCK e SISLER (1969) descobriram que essa substância na dose de 5 a 8 ppm inibe o crescimento de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia rolfsii* ao passo que é muito menos ativa com relação à *S. pastorianus* e *Neurospora crassa*. Posteriormente verificaram que essa diferença de atividade não poderia ser explicada com base exclusivamente em diferenças na absorção ou transformação metabólica do cloroneb visto que *S. pastorianus* e *S. rolfsii* mostraram-se incapazes de metabolizar a substância, ao contrário do que ocorreu com *R. solani* e *N. crassa*. Descobriram também que a inibição do crescimento micelial de *R. solani* ocorria na proporção em que o cloroneb ia sendo metabolizado, dando lugar ao composto 2,5-dicloro-4-metoxifenol. Perceberam que a respiração em *R. solani* não chegou a ser inibida pelo cloroneb até a dose de 20 ppm. Já a incorporação de timidina no DNA das hifas foi afetada: houve de 65 a 90% de inibição em presença de um nível de 8 ppm da substância. Paralelamente foi evidenciado que os processos de incorporação de uridina no RNA e fênil

alanina na síntese de proteínas também foram parcialmente reprimidos. Os resultados da investigação de TILLMAN e SISLER (1973) com *Ustilago maydis* imprimiram nova direção na tentativa de explicação do problema. Verificaram eles que o cloroneb a 8 ppm matava conídios em meio de cultura mas não o fazia em tampão fosfato. Nesta condição o número de conídios permanecia inalterado mas, em contraposição, o peso seco e os montantes de proteína, RNA e DNA da cultura aumentavam com o passar do tempo. Observação importante foi conseguida quando se trabalhou com cultura de conídios sincronizados e tratados com cloroneb: acontecia a duplicação da quantidade de DNA e a perfeita divisão nuclear. Entretanto, a divisão celular deixava de acontecer, fazendo com que os conídios se tornassem binucleados. Estes fatos indicaram que a ação inibitória da substância se deu efetivamente a nível de citocinese e, conseqüentemente, as interferências sobre as sínteses de ácidos nucleicos e proteínas representariam tão somente efeitos colaterais.

Em que pese a consistência desse modelo, outras hipóteses foram aventadas com base nas verificações de GEORGOPOULOS e col. (1976) e AZEVEDO e SANT'ANA (1975) de que o cloroneb em doses adequadas perturba a estabilidade de linhagens diplóides de *A. nidulans* provocando um grande número de aneuploidias. A generalidade desse fenômeno levou os últimos autores a recomendar o fungicida como agente haploidizante em procedimentos de análise genética. Este papel da droga seria análogo ao descrito para o benomil em linhagens diplóides de *A. nidulans* por HASTIE (1970) e UPSHALL e col. (1977). Estes últimos estabeleceram a dose do fungicida de 1,5 ppm como discriminativa da ploidia das colônias: as haplóides crescem enquanto que as diplóides são inibidas, provavelmente por serem mais susceptíveis aos distúrbios provocados pela substância no fuso mitótico. Confrontando-se as duas situações torna-se plausível que o cloroneb possa exercer o papel de

antagonista da polimerização das subunidades do fuso, da mesma forma que o benomil, e essa poderia ser então a sua ação primária (DEKKER, 1977). Descobertas interessantes de outras linhas de pesquisa devem ser examinadas. HOCK (1968) analisando extratos de colônias de *Neurospora crassa* resistentes ao cloroneb e crescidas em contato com ele encontrou um composto de adição, provavelmente um glicosídeo, ligado às moléculas do fungicida. Por outro lado, a hidrólise de um dos grupos metoxi da estrutura molecular do cloroneb, dando origem ao produto não-tóxico 2,5-dicloro-4-metoxifenol, verificada por HOCK (1968) em *Rhizoctonia solani* sugere um mecanismo de destoxificação através do qual algumas linhagens podem adquirir resistência. Contudo, não parece que esta via de destoxificação se constitua na única fórmula para o mecanismo de resistência ao cloroneb, desde que não foi detectado nenhum metabólito do fungicida em material proveniente de culturas de *Saccharomyces pastorianus* altamente resistentes ao cloroneb e desenvolvidas em contato com ele (LUKENS, 1971). Pode-se imaginar também que a adaptação aos fungicidas aromáticos - grupo ao qual pertence o cloroneb - seja devida à mobilização de um sistema bioquímico que degrade o núcleo benzênico como ponderou Lukens. Tal hipótese é reforçada pelo número considerável de registros de resistência cruzada envolvendo integrantes desse grupo de fungicidas. GEORGOPOULOS e VOMVOYANNI (1965) já haviam preconizado que esse acontecimento deveria ser corriqueiro dentro do grupo. Na revisão de ROSSI (1979) pode-se encontrar uma farta relação de publicações que corroboram essa hipótese.

Cuidando-se propriamente do surgimento de mutantes de *A. nidulans* resistentes ao cloroneb tem-se que AZEVEDO e col. (1977) isolaram duas linhagens que além de resistentes também se mostraram parcialmente dependentes do fungicida. Em uma delas o gene mutante foi mapeado no grupo de li-

gação IV, revelou-se semidominante em relação ao alelo para a sensibilidade e demonstrou segregação mendeliana quando foi reunido a ele num diplóide heterozigoto. Mais 10 linhagens resistentes foram obtidas por TUYL (1977) através de mutação espontânea ou indução por luz ultravioleta. Submetidas à análise genética permitiram o mapeamento do gene mutante no grupo de ligação III. Ao mesmo tempo o pesquisador constatou a ocorrência de resistência cruzada para o cloroneb e o pentacloronitrobenzeno em todas as linhagens, fato que o levou a supor que todas as 10 mutações fossem alélicas. Indo além, aliando essa consideração à probabilidade de coincidência na posição desse loco único com a daquele que havia sido apontado por THRELFALL (1968) como responsável pela resistência ao cloroneb e ao pentacloronitrobenzeno, Tuyl admitiu que ambas as situações se relacionavam com um mesmo loco gênico. ROSSI (1979) isolou 5 mutantes espontâneos, resistentes e ao mesmo tempo parcialmente dependentes do cloroneb. Todas as mutações se portaram como recessivas e 4 delas foram mapeadas no grupo de ligação III distando, cada uma delas, por volta de 32 unidades de mapa do gene *galA*₁, marcador da linhagem testadora. Diante da coincidência a pesquisadora admitiu a hipótese de tratar-se de um único loco, atitude semelhante à de TUYL (1977) em face de quadro semelhante com as suas 10 mutações. Rossi acredita ainda que possa haver alelismo para as 14 mutações, lembrando que o próprio Tuyl houvera prognosticado, com algumas reservas, que toda resistência ao cloroneb em *A. nidulans* deveria estar vinculada ao mesmo loco do grupo de ligação III.

GROSSI (1980) analisou 6 variantes morfológicas resultantes de conídios de uma das linhagens obtidas por Rossi (CHL-13) tratados com raios-X ou raios-gama. Em todos os casos localizou o gene para a resistência no grupo de ligação III, a uma distância média de 34 unidades do marcador *galA*₁. Este achado reafirma o acerto do mapeamento feito por

Rossi.

3.2. Sistemas para averiguação e quantificação de efeitos mutagênicos em *A. nidulans*

Ao lado de métodos para avaliação de capacidade recombinogênica (KÄFER e col., 1976; BIGNAMI e col., 1977; KAPPAS, 1978; NORMANSELL e col., 1979) a literatura tem registrado alguns sistemas destinados à sondagem de mutações de ponto induzidas por agentes físicos ou químicos, empregando-se *A. nidulans* como material biológico (ROPER, 1971; CLUTTERBUCK, 1974; HOLLSTEIN e col., 1979).

A indução de mutantes resistentes à *p*-fluorofenilalanina e ao mesmo tempo dependentes parciais de tirosina constitui a base do sistema proposto por MORPURGO (1962). Para a seleção de portadores de mutações reversas o autor recomendou a adição de aminotirosina e ácido fenilalanílico ao meio de cultura. Tais compostos têm a propriedade de aumentar a dependência de tirosina nos portadores da mutação direta, restringindo, em consequência, o desenvolvimento das suas colônias, detalhe que facilita a seleção visual dos revertentes. CALVORI e MORPURGO (1966) e SINHA (1967) comprovaram a eficiência desse método.

Certamente o sistema mais utilizado para ensaios de mutagenicidade empregando *A. nidulans* é o proposto por SIDDIQI (1962) e LILLY (1965). Baseia-se na obtenção de prototróficos em consequência da indução de reversão verdadeira ou supressão no loco *methG*₁. ALDERSON e CLARK (1966), ALDERSON e SCAZZOCCHIO (1967), GAJEWSKI e LITWINKA (1968), DUARTE (1968, 1971, 1972), AYLING (1969), PUTRAMENT e col. (1970), KLINCZUK (1970), SCOTT e col. (1973) e PASZEWSKI e GRABSKI (1973) tiveram a oportunidade de por em prática esse sistema e obter resultados coerentes.

O fenômeno da resistência à 8-azaguanina foi consubstanciado num sistema de ensaio (MORPURGO, 1962; STRIGINI, 1963; ARLETT, 1966). Através dele se procurou detectar ação mutagênica por parte de 13 pesticidas (BIGNAMI e col., 1977a), alguns derivados halogenados de hidrocarbonetos (BIGNAMI e col., 1977b) e alguns fungicidas (KAPPAS, 1977).

A possibilidade de seleção visual de mutantes defectivos quanto à enzima xantina desidrogenase permitiu a elaboração de mais um sistema (DARLINGTON e SCAZZOCCHIO, 1967; ALDERSON e SCAZZOCCHIO, 1967; ALDERSON, 1969; ALDERSON e HARTLEY, 1969; HARTLEY, 1970). Acrescentando-se 2-tioxantina ao meio de cultura os conídios normais se apresentam amarelos enquanto que as colônias mutantes aparecem verdes. Nestas mesmas condições é possível apurar os revertentes quando se permite a germinação de conídios mutantes.

OLIVEIRA (1978) apresentou um sistema opcional que se resume na indução de resistência à arginina em linhagens *lys⁻*. Visando avaliar o método a autora trabalhou com 2 agentes mutagênicos convencionais (luz ultravioleta e metano-sulfonato de etila) e uma substância, o brometo de etídio, até então não ensaiada quanto ao seu poder mutagênico em fungos filamentosos. Encontrou resultados consistentes que lhe autorizaram a propor o seu método para a verificação de efeitos mutagênicos de agentes físicos ou químicos.

A resistência ao cloroneb foi também sugerida como indicador de ação mutagênica em *A. nidulans* (AZEVEDO e col., 1977; ROSSI, 1979; GROSSI, 1980). Os autores idealizaram um sistema onde os mutantes resistentes ao fungicida se evidenciariam sob a forma de setores viçosos que iriam se destacar a partir da colônia sensível, inibida pela presença da droga no meio de cultura. Para registrar as reversões iria se valer da propriedade da dependência parcial de cloroneb apresentada por todas as linhagens resistentes caracterizadas pe-

los pesquisadores. Esta semidependência faz com que as colônias resistentes cresçam menos na ausência do fungicida, atingindo um desenvolvimento melhor quando uma pequena dose de cloroneb é adicionada ao meio de cultura. A ocorrência de mutações para a sensibilidade seria então detectada pela manifestação de setores desinibidos emergindo das colônias resistentes ligeiramente retraídas.

Nas publicações de ROPER (1971), CLUTTERBUCK (1974) e LEGATOR (1976) figuram outros sistemas idealizados com a mesma finalidade de fornecer instrumentação para se aferir a capacidade efetiva de mutagênicos potenciais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens utilizadas

4.1.1. Linhagem MSE ("Master Strain E")

Apresenta conídios de coloração branca e é dotada de marcadores genéticos em cada um dos 8 grupos de ligação (McCULLY e FORBES, 1965). V. Figura 1.

GRUPOS DE LIGAÇÃO	MARCADORES GENÉTICOS
I	$suA_1 adE_{20}$ $yA_2 adE_{20}$
II	wA_3
III	$galA_1$
IV	$pyroA_4$
V	$facA_{303}$
VI	sB_3
VII	$nícB_8$
VIII	$riboB_2$

FIGURA 1: Marcadores genéticos da linhagem MSE.

Para esta e também para as Figuras 2 e 3 os fenótipos correspondentes a cada um dos marcadores assinalados estão explicitados no item 4.1.6. Os centrômeros dos grupos de ligação nos quais eles já foram mapeados aparecem representados pelo símbolo "o". Os tamanhos relativos dos grupos de ligação e as posições dos marcadores genéticos (incluindo os centrômeros) não estão em escala.

4.1.2. Linhagem $proA_1; pabaA_6; yA_2$

Apresenta conídios de coloração amarela e 2 marcadores genéticos nutricionais conforme pode ser visto na Figura 2.

GRUPO DE LIGAÇÃO	MARCADORES GENÉTICOS
I	$proA_1$ $pabaA_6$ yA_2

Figura 2: Marcadores genéticos da linhagem $proA_1; pabaA_6; yA_2$.
V. legenda da Figura 1.

4.1.3. Linhagem $biA_1; methG_1$

Apresenta conídios verdes e 2 marcadores genéticos nutricionais conforme consta na Figura 3.

GRUPO DE LIGAÇÃO	MARCADORES GENÉTICOS
I	biA_1
IV	$methG_1$

Figura 3: Marcadores genéticos da linhagem $biA_1; methG_1$.
V. legenda da Figura 1.

4.1.4. Linhagem CHL-1

Esta linhagem foi obtida por SANT'ANA (1974) através de mutação espontânea a partir da linhagem $biA_1; methG_1$. Além destes marcadores genéticos apresenta resistência e dependência parcial em relação ao cloroneb. As colônias se apresentam verdes quando se desenvolvem em meio de cultura contendo o fungicida e cor-de-areia na ausência dele.

4.1.5. Linhagem CHL-13

Esta linhagem foi obtida por ROSSI (1979) através de mutação espontânea a partir da *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂. Juntamente com esses marcadores genéticos apresenta resistência e dependência parcial em relação ao cloroneb. Desenvolve colônias de cor amarelo-pálido quando cultivada em meio completo e amarelo-vivo quando a droga é acrescentada ao meio.

Todas as linhagens mencionadas pertencem ao estoque do Setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP. As 3 linhagens originais são procedentes do Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra.

4.1.6. Símbolos dos marcadores genéticos das linhagens supracitadas e correspondentes fenótipos

MARCADOR	FENÓTIPO
<i>adE</i> ₂₀	Auxotrofia para adenina.
<i>facA</i> ₃₀₃	Incapacidade de crescer em meio contendo acetato de amônio como única fonte de carbono.
<i>galA</i> ₁	Incapacidade de crescer em meio contendo galactose como única fonte de carbono.
<i>nicB</i> ₈	Auxotrofia para ácido nicotínico.
<i>pabaA</i> ₆	Auxotrofia para ácido <i>p</i> -aminobenzóico.
<i>proA</i> ₁	Auxotrofia para prolina.
<i>pyroA</i> ₄	Auxotrofia para piridoxina.
<i>riboB</i> ₂	Auxotrofia para riboflavina.
<i>sB</i> ₃	Auxotrofia para tiosulfato de sódio.
<i>suA</i> ₁ <i>adE</i> ₂₀	Supressor da mutação <i>adE</i> ₂₀ .
<i>wA</i> ₃	Conídios brancos.
<i>yA</i> ₂	Conídios amarelos.

4.2. Meios de cultura e soluções utilizados

4.2.1. Meio mínimo sólido (PONTECORVO e col., 1953b)-
modificado

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Ágar.	15,0 g
Água destilada.	1.000,0 ml

4.2.2. Meio completo sólido (PONTECORVO e col., 1953b)
- modificado

Meio mínimo (item 4.2.1.)	1.000,0 ml
Peptona	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Extrato de leveduras.	0,5 g
Solução de vitaminas.	1,0 ml
Ácido nucléico de leveduras hidrolisa <u>do</u> do	2,5 ml

4.2.3. Meio de acetato de amônio (APIRION, 1962)

Acetato de amônio	12,0 g
KH_2PO_4	3,0 g
NaCl	2,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
FeSO_4	0,01 g
ZnSO_4	0,01 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1.000,0 ml

4.2.4. Meio de galactose

Preparado de maneira análoga ao meio mínimo descrito no item 4.2.1., substituindo-se glicose por galactose.

4.2.5. Meio mínimo líquido acrescido de 2% de meio completo

Ao meio mínimo líquido (item 4.2.1. com exclusão do ágar) adicionou-se 2% de meio completo (item 4.2.2. com exclusão do ágar).

4.2.6. Meios de análise

Nos procedimentos de análise genética foram utilizadas placas de Petri contendo meio completo (MC), meio mínimo (MM), meio mínimo suplementado com todos os requisitos nutricionais exigidos pelas linhagens cruzadas (M + T), meio mínimo de galactose também suplementado com todos os requisi-

tos (GAL), meio mínimo de acetato de amônio suplementado com todos os requisitos (AC) e meio mínimo suplementado com todos os requisitos exceto aquele que estivesse sob análise naquela placa (M + T - nic, por exemplo). As inoculações foram feitas obedecendo-se a 26 pontos prefixados na superfície externa da metade-base da placa e a transferência das 26 colônias foi feita coletivamente com o emprego do replicador multifio (AZEVEDO e col. , 1976).

4.2.7. Suplementos adicionados ao meio mínimo

Foi preparado um estoque de suplementos destinados a serem acrescentados ao meio mínimo nas placas de análise. O solvente em todos os casos foi água destilada e esterilizada e as soluções, após preparadas, foram esterilizadas em banho-maria durante 15 minutos e guardadas em refrigerador a 4°C.

Solução estoque para 100 ml de água		Quantidade adicionada por placa de Petri contendo cerca de 20 ml de meio de cultura	Concentração final no meio de cultura
Adenina	500,0 mg	0,1 ml	25,00 µg/ml
Ácido nicotínico	10,0 mg	0,1 ml	0,50 µg/ml
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	5,0 mg	0,1 ml	0,25 µg/ml
Biotina	4,0 mg	0,1 ml	0,20 µg/ml
Metionina	1,0 g	0,1 ml	50,00 µg/ml
Piridoxina	5,0 mg	0,1 ml	0,25 µg/ml
Prolina	1,0 g	0,1 ml	50,00 µg/ml
Riboflavina	10,0 mg	0,1 ml	0,50 µg/ml
Tiosulfato de sódio	2,0 g	0,1 ml	100,00 µg/ml

4.2.8. Solução de vitaminas

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

4.2.9. Hidrolisado de ácido nucléico de leveduras

- a) Ácido nucléico de leveduras - 2 g em 15 ml de solução de HCl 1 N.
- b) Ácido nucléico de leveduras - 2 g em 15 ml de solução de NaOH 1 N.

As duas soluções foram aquecidas a 100°C durante 20 minutos. Então foram misturadas e o pH ajustado para 6,0 com NaOH a 4%. O material foi filtrado e o volume completado com água destilada até atingir 40 ml.

4.2.10. Solução salina (0,85%)

Cloreto de sódio	8,5 g
Água destilada	1.000,0 ml

Geralmente essa solução foi distribuída em frascos (9 ml por frasco) com a finalidade de facilitar diluições de razão 1:10.

4.2.11. Solução de "tween 80" - (0,1% - V/V)

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

4.2.12. Solução de p-fluorofenilalanina (p-FA)

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

4.2.13. Solução de benlate

Metil-1-(butilcarb moil)2-benzimida- zol carbamato (benlate)	100,0 mg
Água destilada esterilizada	100,0 ml

Esta solução foi preparada com o produto bruto que encerrava 50% de produto ativo. Todas as estimativas de concentração da solução foram feitas com base no valor do produto ativo.

4.2.14. Soluções de cloroneb - (Du Pont, 65% de P.A.)
(1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno)

a) Para ser usada como haploidizante

Cloroneb	1,0 g
Água destilada	50,0 ml

b) Para ensaios de resistência

Preparou-se instantes antes da utilização, atendendo-se à concentração requerida em cada situação. Para as soluções mais concentradas, visando-se facilitar a dissolução da droga aplicou-se uma fase de pré-solvência, com vigorosa agitação do produto em tubo de ensaio com metanol ou acetona, cujo volume nunca ultrapassou a 1% do volume final da solução. Obtida dessa forma uma papa homogênea, completou-se o volume final com água destilada e aplicou-se nova agitação. Todos os títulos de concentração foram estimados com base no produto ativo que correspondia a 65% do material manipulado.

4.2.15. Solução de nitrito de sódio 0,5 M

NaNO ₂	345,0 mg
Água destilada esterilizada	10,0 ml

4.2.16. Solução fosfato pH 7,0

KH ₂ PO ₄	5,304 g
K ₂ HPO ₄	10,614 g
Água destilada	1.000,0 ml

Esta solução foi distribuída em tubos de ensaio (9 ml por tubo).

4.2.17. Solução acetato pH 4,4

SOLUÇÃO A

Ácido acético	1,1 ml
Água destilada	100,0 ml

SOLUÇÃO B

Acetato de sódio 1,64 g
Água destilada 100,0 ml

As duas soluções foram misturadas no momento da utilização, atendendo-se à seguinte proporção: 12,75 ml da solução A para 12,25 ml da solução B.

4.2.18. Solução de metano-sulfonato de etila (EMS)

EMS 0,1 ml
Solução de "tween 80" 0,1% V/V 4,9 ml

4.2.19. Solução de dietilsulfato (DES)

DES 0,1 ml
Solução de "tween 80" 10% V/V 4,9 ml

4.2.20. Solução de 8-metoxipsoraleína (8-MOP)

8-MOP 50,0 mg
Álcool 95% 10,0 ml

4.3. Condições de preparo, esterilização e conservação das soluções e dos meios de cultura

SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA	CONDIÇÕES OBSERVADAS
Solução de vitaminas	B, D, E
Hidrolisado de ác. nucléico de leveduras. .	D, E
Solução de cloroneb (haploidizante)	B, F
Soluções de cloroneb (para ensaios de resis- tência)	B, F
Solução salina	A, C
Solução de "tween"	A, C
Solução de pFA	B, D
Solução de benlate.	B, D
Solução de nitrito de sódio	F
Solução fosfato pH 7,0	A, D
Solução acetato pH 4,4 (soluções <u>A</u> e <u>B</u>) . .	A, D
Solução de EMS	F
Solução de DES	F
Solução de 8-MOP	F
Suplementos adicionados ao meio mínimo . .	B, D, E
Meio mínimo	A, C, G
Meio completo	A, C, G
Meio de acetato de amônio	A, C, H
Meio de galactose	A, C, H
Meio mínimo mais 2% de meio completo . . .	A, C

Código:

- A - Autoclavado a 1 atm de pressão por tempo superior a 15 minutos.
- B - Mantido em banho-maria por tempo superior a 15 minutos.
- C - Conservado à temperatura ambiente.
- D - Conservado a 4°C.
- E - Conservado sob clorofórmio.
- F - Preparado no momento da utilização.
- G - pH ajustado em 6,8.
- H - pH ajustado em 6,1.

4.4. Esterilização da vidraria e instrumental

Os cuidados de esterilização dos utensílios de vidro destinados a entrar diretamente em contato com o material biológico, soluções ou meios de cultura incluíram o confinamento dos acessórios em forno elétrico com temperatura mantida em torno de 140°C por tempo superior a duas horas. Para esse procedimento as pipetas foram acondicionadas dentro de cilindros metálicos fechados (pipeteiros) enquanto que as placas foram empilhadas fechadas no interior de recipientes apropriados (porta-placas). Os invólucros somente foram abertos na ocasião do uso das placas e pipetas.

Com o mesmo objetivo os frascos providos de tampa rosqueada e os tubos de ensaio foram autoclavados sob pressão de 1 atm durante mais de 15 minutos.

Igualmente, os fios e alças de níquel-cromo, antes de todas as operações de transferência de conídios, foram aquecidos até a incandescência pela aproximação da chama de um bico de Bunsen e em seguida foram resfriados por imersão em solução salina. As alças de Drigalski receberam a esterilização mediante o mergulho da extremidade do dispositivo em álcool, seguindo-se a combustão da porção de álcool que aderiu à superfície da alça. Portanto, doravante quando for mencionada neste texto qualquer manipulação com esses instrumentos fica subentendida a esterilização prévia conforme descrita aqui.

4.5. Inoculação

Conforme a finalidade do procedimento em particular, as linhagens foram inoculadas no meio de cultura através de um destes métodos: semeadura, inoculação-por-ponto e transferência de colônias monospóricas. Nas operações de se-

medura pipetou-se um dado volume (em geral 0,1 ml) de uma suspensão de conídios ou ascósporos e fez-se fluir esse material sobre a superfície do meio de cultura contida numa placa de Petri. Logo em seguida foi executado o espalhamento da suspensão sobre a superfície de meio com o auxílio de uma alça de Drigalski. Nos procedimentos de inoculação-por-ponto a colônia ou suspensão que deveria fornecer os conídios foi tocada pela extremidade de um fio de níquel-cromo. Imediatamente após esse ato a extremidade que houvera entrado em contato com o material foi levemente espetada contra a superfície do meio de cultura destinado a receber a inoculação. Já a técnica da transferência-de-colônias-monospóricas exigiu uma prévia semeadura da suspensão de conídios ou ascósporos em meio completo. O volume semeado e a concentração da suspensão deviam estar relacionados através de valores tais que se pudessem esperar um total de conídios ou ascósporos em torno de 50 por placa. No intervalo compreendido entre 16 e 24 horas de incubação as placas foram sistematicamente examinadas com o auxílio de um estereomicroscópio, objetivando-se visualizar a emergência de jovens colônias, compostas tão somente de micélio. Então, manejando-se um fio de níquel-cromo fez-se recortes na camada de meio de cultura, obtendo-se pequenos discos de ágar contendo cada um deles uma colônia monospórica incrustada na sua face superior. O passo seguinte consistiu em transferir-se com uma alça de níquel-cromo cada uma dessas colônias para o centro de uma placa de Petri contendo meio de cultura.

4.6. Incubação

Todas as incubações referidas neste texto foram realizadas à temperatura de 37°C.

4.7. "Purificação" de linhagens

Esta operação se resume na coleta de pequeno número de conídios de uma colônia ou setor, acompanhada pelo espalhamento dos mesmos com grande distanciamento entre eles sobre um novo meio de cultura. Para tanto, aplicou-se um toque sutil com a extremidade do fio de níquel-cromo na região fornecedora de conídios. Movimentos em ziguezague da ponta do fio sobre a superfície do meio de cultura destinado a receber a sementeira fizeram com que os poucos conídios aderentes ao instrumento se depositassem suficientemente afastados uns dos outros sobre o meio, a ponto de permitir que boa parcela deles germinasse separadamente dando colônias monoconidiais. Identificadas as colônias mais homogêneas, extraiu-se delas conídios "purificados" com vistas a etapas ulteriores.

4.8. Obtenção de mutantes espontâneos

4.8.1. Mutantes resistentes ao cloroneb

Transferiu-se colônias monospóricas, conforme descrito no item 4.5., para o centro de placas de Petri contendo meio completo acrescido de cloroneb na concentração de 100 µg/ml. As placas foram então incubadas. No período compreendido entre 3 e 7 dias de incubação elas foram examinadas diariamente, objetivando-se encontrar setores vigorosos se projetando para além dos contornos da colônia visivelmente inibida pela ação do fungicida. Tais setores, tidos como prováveis mutantes resistentes ao cloroneb, foram então purificados conforme descrito no item 4.7. e submetidos a testes específicos de resistência.

4.8.2. Mutantes sensíveis ao cloroneb

As linhagens resistentes ao cloroneb utilizadas no presente trabalho são também parcialmente dependentes da substância, crescendo melhor quando o meio é enriquecido com uma pequena dose de cloroneb. Colônias monospóricas das linhagens resistentes foram incubadas em meio completo. O crescimento foi em geral precário exceto em determinados pontos da periferia onde se destacaram setores mais desinibidos. Estes setores foram purificados (item 4.7.) e efetivamente ensaiados quanto à sensibilidade ao fungicida.

4.9. Curvas de dose-resposta

O efeito da presença e da dose do fungicida sobre o crescimento de colônias de cada uma das linhagens com as quais se trabalhou foi apurado através da medida do diâmetro das colônias incubadas por 96 horas e submetidas a concetrações crescentes de cloroneb, variando desde zero $\mu\text{g/ml}$ (controle) até 3.200 $\mu\text{g/ml}$, passando pelos valores 50, 100, 200, 400, 800 e 1.600 $\mu\text{g/ml}$. Aplicou-se de 4 a 6 repetições para cada linhagem em cada dose. Registradas as medidas dos diâmetros foi elaborada a representação gráfica do efeito inibitório de concentrações crescentes do fungicida sobre o desenvolvimento de cada uma das diferentes linhagens. Para cada uma delas foi determinado o valor do parâmetro ED_{50} que é dado numericamente pela concentração do fungicida que faz com que as colônias cresçam somente a metade do que crescem na ausência dele.

4.10. Técnicas de análise genética

4.10.1. Obtenção de heterocários

Heterocário é uma estrutura constituída por 2 núcleos geneticamente diferentes mergulhados num mesmo citoplasma. Para a obtenção de heterocários utilizou-se o método descrito por PONTECORVO e col. (1953b) com algumas modificações (AZEVEDO, 1971). Grande quantidade de conídios de duas linhagens com requerimentos nutricionais não-coincidentes foi misturada em 2,5 ml de meio mínimo líquido enriquecido com 2% de meio completo. O tubo que encerrava esse sistema foi agitado intensamente e incubado. Decorridos 2 a 3 dias começou a se evidenciar uma película refringente e elástica na superfície do meio de cultura. Tratava-se do heterocário que teria surgido conforme a seguinte seqüência: os conídios auxotróficos começaram a se desenvolver em hifas às custas da pequena parcela de meio completo. Com o esgotamento desse componente o crescimento tenderia a cessar. Entretanto, devido à proximidade das hifas em formação, algumas delas eventualmente se anastomosaram. Nos pontos onde as duas hifas assim fundidas eram originárias de uma e de outra linhagem, aconteceu que 2 núcleos complementares nas suas incapacidades metabólicas acabaram instalados num citoplasma comum. E a estrutura assim constituída foi capaz de se desenvolver em meio mínimo apenas, produzindo a película heterocariótica. A transferência dessa película para meio mínimo possibilitou, depois de 3 dias de incubação, o aparecimento de colônias heterocarióticas.

4.10.2. Teste do heterocário (JINKS, 1963)

O teste do heterocário foi aplicado a todas as linhagens resistentes obtidas no experimento, tendo a finalidade de discriminar se a herança do caráter era subordinada a fatores cromossômicos ou citoplasmáticos. Tomou-se as colônias heterocarióticas obtidas de acordo com o item 4.10.1. (misturando-se neste caso conídios da linhagem resistente em estudo e de uma linhagem sensível) e coletou-se conídios das mesmas com uma alça de níquel-cromo. Transferiu-se esses conídios para uma solução de "tween" contida num tubo de ensaio que então foi submetido a intensa agitação. O material foi sucessivamente diluído em solução salina até o ponto em que 0,1 ml da suspensão espalhado em uma placa de Petri contendo meio completo, depois de 3 dias de incubação, desse origem a um número de colônias que permitisse que elas crescessem razoavelmente distanciadas umas das outras. A esta altura tomou-se uma placa de Petri com meio completo mais cloroneb na dosagem de 100 µg/ml e assinalou-se 26 pontos na superfície externa da base da placa. Inoculou-se na posição desses pontos uma e outra das linhagens que tinham dado origem ao heterocário e mais 24 colônias resultantes da sementeira descrita acima. Aguardou-se 3 dias de incubação, reservando-se as seguintes hipóteses alternativas e correspondentes conclusões sobre os resultados: se o fenótipo "resistência" fosse determinado por fatores cromossômicos, alguns conídios do heterocário dariam origem a colônias resistentes e outros a colônias sensíveis. Se, por outro lado, o caráter estivesse subordinado a fatores citoplasmáticos, as colônias nascidas deveriam ser monomórficas, todas sensíveis ou todas resistentes.

4.10.3. Segregação meiótica

Com o objetivo de averiguar as bases genéticas do caráter resistência-ao-cloroneb provocou-se o cruzamento de linhagens portadoras desse fenótipo com a MSE, de acordo com o método de PONTECORVO e col. (1953b). Depois de retirada do interior do tubo onde se formou, a película heterocariótica foi esquartejada sobre uma superfície de meio mínimo contido numa placa de Petri e as porções resultantes foram afastadas para cada um dos quadrantes da placa. A comissura entre a base e a tampa da placa foi vedada pela fixação de fita adesiva e então incubou-se por 8 a 10 dias. Passado esse tempo o material voltou a ser examinado, procurando-se com o auxílio de um estereomicroscópio os corpos de frutificação (cleistotécios) que deveriam ter se desenvolvido nas colônias heterocarióticas. Localizados, extraiu-se então alguns dentre os maiores cleistotécios (BARACHO e col., 1970) que foram transferidos para a superfície de meio mínimo contido numa placa. Impulsionando-se por meio do fio de níquel-cromo fez-se com que cada cleistotécio fosse rolado por alguns minutos até se observar que ele tinha sido despojado de estruturas aderentes, mostrando agora a superfície completamente homogênea. Verificada essa condição, cada cleistotécio foi levado para o interior de um tubo de ensaio contendo solução de "tween" e depositado contra a superfície interna da parede do tubo, que foi mantido ligeiramente inclinado. Nessa posição o cleistotécio foi esmagado pela introdução de uma pipeta no tubo, com a qual se exerceu pressão contra o pequeno grânulo. Com a ruptura do cleistotécio os ascóporos se viram libertados. O sistema foi submetido a agitação e diluído convenientemente em solução salina. Uma alíquota do último ciclo de diluição foi semeada em meio completo mais cloroneb na concentração de 100 µg/ml e a placa foi incubada por 3 dias. Findo esse tempo foi possível discriminar se o cleistotécio esmaga-

do era híbrido ou autofecundado, reconhecendo-se o aspecto dimórfico ou homogêneo das colônias surgidas. Constatada a primeira alternativa, o frasco contendo a suspensão de ascósporos foi guardado em refrigerador com vistas a posteriores utilizações.

4.10.4. Isolamento de diplóides

A partir das colônias heterocarióticas referidas no item 4.10.1. foi possível isolar linhagens diplóides encerrando os genomas das duas linhagens envolvidas no cruzamento, seguindo-se o método de ROPER (1952). Coletou-se uma grande quantidade de conídios do heterocário, com o uso de uma alça de níquel-cromo, transferindo-os para solução de "tween". Depois de vigorosa agitação a suspensão foi vertida para dentro de placas de Petri contendo meio mínimo, estimando-se um montante de 10^6 a 10^7 conídios por placa. Os conídios haplóides não conseguiriam se desenvolver dado que as duas linhagens eram auxotróficas. Fortuitamente, numa frequência baixíssima, poderiam ter se constituído conídios com núcleos diplóides. Os núcleos diplóides e também híbridos possibilitariam o desenvolvimento dos conídios, mesmo em meio mínimo, produzindo colônias diplóides. Isto é o que teria acontecido para fazer com que aparecessem algumas poucas colônias depois de 3 dias de incubação. Para uma confirmação adicional da diploidia foram efetuadas comparações entre medidas de diâmetro de conídios. É sabido que conídios de linhagens diplóides são sensivelmente maiores do que os das correspondentes linhagens haplóides. Os conídios das 3 linhagens foram cuidadosamente retirados das respectivas colônias e passados para uma gota de solução aquosa de lisol (1:10) depositada sobre uma lâmina de microscopia. O lisol tende a manter os conídios agregados em cadeias lineares, situação que diminui o erro

das medições (PONTECORVO e col., 1953a). Com a adaptação de uma ocular micrométrica ao microscópio registrou-se os comprimentos de cadeias de 5 conídios e comparou-se os valores dos haplóides com os do presumível diplóide.

4.10.5. Análise mitótica

Este procedimento baseia-se na ocorrência do ciclo parassexual em *A. nidulans*, descoberto por PONTECORVO e ROPER (1952) e através do qual pode ocorrer recombinação genética sem que haja meiose (FORBES, 1959). Inicialmente a linhagem diplóide descendente do cruzamento da linhagem MSE (ou *ppy* nos casos em que a mutação para a resistência estivesse na própria MSE) com a resistente ao cloroneb foi haploidizada. Este fenômeno foi provocado fazendo-se com que colônias diplóides crescessem em meio completo adicionado de uma substância haploidizante: *p*-fluorofenilalanina na concentração de 40 µg/ml (LHOAS, 1961 e MORPURGO, 1961), benlate na concentração de 1 µg/ml (HASTIE, 1970) e o próprio cloroneb a 20 µg/ml (AZEVEDO e SANT'ANA, 1975). Estes agentes causam perturbações na segregação anafásica dos cromossomos nas células diplóides acarretando não-disjunções que determinam aneuploidias nas células filhas. Aneuploidias sucessivas podem culminar com a volta ao estado haplóide (KÄFER, 1961). As células haplóides (que podem encerrar qualquer combinação possível em que haja um exemplar de cada par de cromossomos homólogos do antigo núcleo diplóide) proliferam na forma de setores que se destacam da colônia original pelo crescimento desinibido, pela coloração dos conídios ou então pela textura. Para obtê-los inoculou-se conídios diplóides em 4 pontos equidistantes na superfície de meio completo acrescido do agente haploidizante na dosagem especificada e incubou-se por 7 a 10 dias. Os setores haplóides que se manifestaram foram purificados em meio com-

pleto (V. item 4.7.) e então inoculados em placas-mestras. Estas, consistiram de 26 inoculações bem esquadrihadas sobre a superfície de meio completo acrescido de cloroneb a 20 µg/ml (destinado a favorecer o desenvolvimento das colônias resistentes-dependentes da droga). Cada inoculação foi originária de um setor diferente e, depois de 3 dias de incubação, a placa-mestra foi replicada para as placas-de-análise (V. item 4.2.6.) através do replicador multifio. Além das placas de praxe, introduziu-se nessa bateria a placa (M + T + Chl) constituída pelos componentes de (M + T) com a adição de 100 µg/ml de cloroneb. As placas de análise foram sistematicamente observadas depois de 1, 2 e 3 dias de incubação, objetivando-se constatar o crescimento ou não de cada colônia em cada placa. O aspecto das colônias em (M + T) serviu de controle para as discriminações e na placa (M + T + Chl) distinguiu-se as colônias resistentes e as inibidas. De posse dos resultados procurou-se encontrar um paralelismo entre a placa (M + T + Chl) e uma das demais placas-de-análise, ou seja: coincidência em que todas as colônias que se mostraram resistentes, ao mesmo tempo deixaram de crescer nas respectivas réplicas no meio-de-análise. Encontrada esta correspondência, concluiu-se que a marca "resistência" pertence ao mesmo grupo de ligação que o marcador da linhagem MSE associado à placa-de-análise.

4.10.6. Análise meiótica

A análise meiótica das mutações responsáveis pela resistência ao cloroneb foi desenvolvida de acordo com PONTECORVO e col., (1953b). Foram examinados os ascósporos de cleistotécios híbridos dos mesmos cruzamentos entre linhagens resistentes e a MSE, explorados na análise mitótica. Da suspensão diluída de ascósporos semeou-se 0,1 ml em placas com meio completo mais cloroneb a 20 µg/ml (para favorecer o crescimento

to das colônias resistentes-dependentes). As colônias que se evidenciaram após 3 dias de incubação foram uma a uma inoculadas em placas-mestras. Estas, passados mais 3 dias de incubação, foram replicadas em um sistema de placas-de-análise análogo ao empregado no item 4.10.5. A leitura dessas placas, depois de 3 dias de incubação, também se fez de maneira análoga, procurando-se verificar se as marcas da linhagem MSE segregavam independentemente ou não do loco relacionado à resistência (placa M + T + Chl). Para os casos em que não ocorreu a segregação livre admitiu-se a existência de ligação genética entre o marcador em questão e o gene para a resistência. O valor da ligação genética foi estimado através da equação: $C = r/n$, onde r representou o número de recombinantes e n , o total de ascósporos analisados. O desvio-padrão foi obtido através da fórmula: $s = \sqrt{p(1-p)/n}$, onde p foi a frequência de recombinantes e n assumiu o mesmo significado da fórmula anterior.

4.10.7. Teste de alelismo

Foi aplicado para revelar se duas mutações para resistência, mapeadas no mesmo grupo de ligação, pertencem ou não ao mesmo loco. Inicialmente provocou-se o cruzamento da linhagem encerrando uma das mutações com a linhagem portadora da segunda mutação. Identificado um cleistotécio híbrido desse cruzamento (V. item 4.10.3.), uma alíquota da suspensão de seus ascósporos foi semeada em meio completo acrescido de cloroneb a 100 µg/ml. Passados 3 dias de incubação, o exame das placas permitiu a conclusão: se as colônias nascidas fossem monomórficas, todas denotando resistência ao fungicida, admitir-se-ia a hipótese de alelismo; caso se distinguísse colônias sensíveis ao lado das resistentes, iria se pensar em locos distintos.

4.10.8. Relações de dominância-recessividade

Esta informação foi inferida mediante a observação do comportamento de diplóides heterozigotos, preparados a partir de uma linhagem portadora do gene para a resistência em observação e de uma linhagem sensível. Construiu-se curvas de dose-resposta (conforme descrito no item 4.9.) para os 2 haplóides constituintes e para o diplóide correspondente. O confronto da curva deste último com as curvas dos haplóides permitiu, em face da semelhança ou não com uma delas, classificar a mutação como dominante, recessiva ou intermediária.

4.11. Indução de mutantes através de tratamentos mutagênicos

Conídios procedentes de linhagens sensíveis e resistentes foram submetidos a tratamentos mutagênicos na expectativa de se induzir mutações para resistência e sensibilidade ao cloroneb, respectivamente. Aplicou-se 3 tratamentos químicos e um misto, cujas descrições figuram nos itens seguintes.

4.11.1. Tratamento com ácido nitroso

Seguiu-se o método descrito por SIDDIQI (1962) com algumas modificações (PIZZIRANI, 1977). Trabalhou-se com 2 tubos de ensaio mantidos à temperatura de 37°C em banho-maria, um deles destinado ao tratamento propriamente dito e o outro reservado para o controle. Ao início da aplicação do tratamento introduziu-se em cada um dos tubos os componentes abaixo especificados:

MATERIAL	TRATAMENTO	CONTROLE
Solução de NaNO_2 0,5 M	0,33 ml	-
Solução acetato pH 4,4	9,17 ml	9,50 ml
Suspensão de conídios em "tween"	0,50 ml	0,50 ml

Os 2 tubos permaneceram em banho-maria pelo tempo de 60 minutos. Durante esse período, ao se atingir 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 minutos retirou-se uma alíquota de 1 ml do conteúdo do tubo-tratamento. Cada retirada foi convenientemente diluída em sucessivos tubos de ensaio contendo 9 ml de solução fosfato pH 7,0. Feito isto, semeou-se em meio completo 0,1 ml da diluição tida como adequada e incubou-se por 3 dias. Então, computou-se o número de colônias que se manifestaram em cada placa e, a partir desse dado, estimou-se a porcentagem de conídios sobreviventes ao final de cada tempo parcial de aplicação do tratamento. Procedimento semelhante foi desdobrado em relação ao tubo-controle ao final de 60 minutos de banho-maria. O número de conídios viáveis por ml do conteúdo desse tubo foi associado ao nível de 100% de sobrevivência. O confronto dos resultados de cada tempo de tratamento com esse valor-referência permitiu a construção da curva de sobrevivência.

4.11.2. Tratamento com metano-sulfonato de etila (EMS)

Aplicou-se o método seguido por ROSATO (1973) com a introdução de algumas modificações. Trabalhou-se com 2 tubos de ensaio: um para o tratamento e o outro destinado ao controle. No tubo-tratamento misturou-se 5,0 ml de solução de EMS (item 4.2.18.) com 1 ml da suspensão de conídios que deveriam receber o tratamento. Agitou-se ativamente e encerrou-se o tubo no interior de uma estufa mantida a 28°C. A cada 60 minutos, até que se atingisse a 6^a hora, retirou-se 1 ml do conteúdo do tubo e diluiu-se imediatamente em frascos contendo 9 ml de solução salina. Atendida a diluição considerada conveniente, semeou-se 0,1 ml dela em algumas placas contendo meio completo e aguardou-se 3 dias de incubação para então contar-se o número de colônias aparecidas naquelas placas. No tubo-controle misturou-se 5,0 ml de solução de "tween" com 1,0 ml da mesma suspensão de conídios utilizada para o tratamento. Agitou-se e colocou-se o tubo no interior de uma estufa mantida a 28°C. Transcorridas 6 horas pipetou-se 1 ml do conteúdo do tubo. Este material foi igualmente diluído e semeado em porções de 0,1 ml em placas com meio completo que foram; a seguir, incubadas por 3 dias. O número de conídios viáveis por ml do tubo-controle, estimado com base no número de colônias germinadas, forneceu o valor-base de 100% de sobrevivência, em relação ao qual se estimou os percentuais correspondentes aos diferentes tempos de tratamento. Estes dados permitiram a elaboração da curva de sobrevivência ao EMS.

4.11.3. Tratamento com dietilsulfato (DES)

A aplicação desse tratamento obedeceu às recomendações de DUARTE (1968) com a introdução de algumas modi

ficações. Constituiu-se os sistemas destinados ao tratamento e ao controle conforme o esquema: 5,0 ml de solução de DES (item 4.2.19.) mais 1,0 ml de suspensão de conídios e 5,0 ml de solução aquosa de "tween" a 10% V/V mais 1,0 ml da mesma suspensão de conídios, respectivamente. Depois de ser bem agitado o tubo-tratamento foi encerrado em uma estufa a 28°C. Retiradas consecutivas foram executadas nos tempos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Tais amostras foram sucessivamente diluídas em frascos contendo 9 ml de solução salina até que, chegada à concentração tida como adequada, semeou-se 0,1 ml da mesma em algumas placas preenchidas com meio completo. Por outro lado, o tubo-controle foi mantido na mesma estufa pelo tempo de 60 minutos, findo os quais procedeu-se a diluições e sementeiras, de maneira análoga ao que foi feito com o material do tratamento. Passados 3 dias de incubação, os números de colônias encontradas nas placas correspondentes ao controle e aos vários tempos de tratamento forneceram os dados para a construção da curva de sobrevivência da linhagem em estudo em relação ao DES.

4.11.4. Tratamento com 8-metoxipsoraleína associada à luz ultravioleta longa (8-MOP + UVL)

Para essa aplicação tomou-se por base o protocolo do experimento de BIAGI (1977) introduzindo-se ligeiras modificações. Foi montado o seguinte aparato:

MATERIAL	TRATAMENTO	CONTROLE
Solução de 8-MOP (item 4.2.20.).	0,4 ml	-
Álcool a 95%	-	0,4 ml
Solução fosfato pH 7,0 (item 4.2.16.).	8,8 ml	8,8 ml
Suspensão de conídios	0,8 ml	0,8 ml

Os tubos "tratamento" e "controle", assim que foram constituídos, permaneceram 120 minutos sob a temperatura de 37°C no escuro. Então, pipetou-se 1 ml do conteúdo do tubo-controle, diluiu-se gradativamente em frascos contendo 9 ml de solução salina até chegar à concentração que permitisse que 0,1 ml da mesma, espalhados em meio completo presente numa placa de Petri e depois de 3 dias de incubação, fizessem aparecer um número de colônias que pudessem ser reconhecidas e contadas uma a uma. Enquanto isso, o conteúdo do tubo-tratamento foi inteiramente vertido dentro de um béquer de 7,5 cm de diâmetro por 15 cm de altura. Ato contínuo, a fonte de luz ultravioleta longa (aparelho Burton, modelo 9322, intensidade de corrente de 17 amperes e comprimento de onda de 360 nm) foi colocada apoiada sobre as bordas do béquer e o dispositivo foi ligado. O tratamento foi interrompido nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos, ocasiões em que se pipetou 1 ml do conteúdo do béquer, diluiu-se, semeou-se e incubou-se da mesma forma que foi descrito para o material-controle. Associando-se a sobrevivência de conídios neste último sistema ao valor de 100%, estimou-se a porcentagem de sobreviventes ao cabo de cada tempo parcial de aplicação do tratamento e construiu-se a curva de sobrevivência.

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção de mutantes espontâneos

5.1.1. Mutantes resistentes ao cloroneb

5.1.1.1. A partir da linhagem MSE

Foram incubadas 13 placas de Petri com meio completo mais 100 µg/ml de cloroneb e colônias monospóricas da linhagem MSE transferidas para o centro de cada uma delas. Entre 3 e 7 dias de incubação começaram a ser observados setores viçosos que contrastavam, pelo maior desenvolvimento e pela textura, com as colônias de origem, visivelmente inibidas pelo fungicida. Todos esses setores presumivelmente resistentes foram a seguir purificados (V. item 4.7.) e efetivamente ensaiados com respeito ao caráter. Feito isto, escolheram-se os 3 setores mais representativos quanto aos aspectos grau de resistência, estabilidade e conidiação. Estas linhagens serão doravante simbolizadas por CHL-16, CHL-17 e CHL-18.

5.1.1.2. A partir da linhagem *proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂ (*ppy*)

Colônias monospóricas dessa linhagem foram transferidas uma a uma para 16 placas com meio completo mais cloroneb na concentração de 100 µg/ml. Até o 7º dia de incubação se manifestaram alguns setores com aspecto de resistentes. Depois de purificados e reexaminados com respeito à resistência, escolheram-se 3 dentre eles que em presença de cloroneb haviam revelado melhor estabilidade, crescimento e conidiação, reservando-os para as etapas subseqüentes do experimento. A eles fez-se corresponder as notações CHL-19, CHL-20 e CHL-21.

5.1.2. Mutantes sensíveis ao cloroneb

5.1.2.1. A partir da linhagem CHL-1 (V. item 4.1.4.)

Quarenta e três colônias monospóricas da linhagem CHL-1 foram transferidas individualmente para o centro de placas de Petri contendo meio completo e que foram incubadas a seguir. A linhagem é parcialmente dependente de cloroneb e, sendo assim, o desenvolvimento das colônias foi moderado. Entretanto, até o 7º dia de incubação algumas colônias deram origem a setores mais desenvolvidos do que elas. Dado as condições em que tais setores se manifestaram podia-se supor que eles seriam variantes que tinham deixado de ser dependentes e provavelmente também teriam sofrido reversão para sensibilidade ao cloroneb. Purificados e submetidos a testes de inibição, foram escolhidos os 3 setores que se afiguravam mais promissores para as finalidades do trabalho e que serão aqui designados por CHL-1(Chl₁^S), CHL-1(Chl₂^S) e CHL-1(Chl₃^S).

5.1.2.2. A partir da linhagem CHL-₁₃ (V. item 4.1.5.)

Incubou-se 43 placas com meio completo e um transplante de uma colônia monospórica da linhagem CHL-₁₃ no centro de cada uma. Este mutante é parcialmente dependente de cloroneb, condição que sugeriu que os setores que despontaram da colônia que crescia lentamente ao longo dos 7 dias de incubação estariam portando mutação no sentido da sensibilidade à substância. Os setores foram em seguida purificados e examinados com respeito à sensibilidade. Dois deles, aqui designados por CHL-₁₃(Chl₁^S) e CHL-₁₃(Chl₂^S) foram reservados para a caracterização e outros estudos.

5.2. Caracterização dos mutantes resistentes

5.2.1. Inibição em presença de cloroneb

O crescimento em diâmetro das colônias de cada um dos mutantes resistentes selecionados, tomado em relação a dosagens crescentes de cloroneb, pode ser visto na Tabela 1 onde figuram também os dados relativos às linhagens que deram origem aos mutantes. Os mesmos valores, convertidos em porcentagens, podem ser encontrados na Tabela 2.

Este conjunto de informações permitiu a elaboração das curvas de dose-resposta (item 4.9.) para cada uma das linhagens. E, diante de cada curva, foi possível determinar o valor do ED₅₀ (V. o mesmo item) para a linhagem correspondente.

A Figura 4 estampa as curvas de dose-resposta das linhagens ensaiadas e a Tabela 3 registra os valores do ED₅₀ para cada uma delas.

TABELA 1 - Diâmetros (em milímetros) de colônias de 8 linhagens desenvolvidas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas.

DOSE DE CLORONEB EM µg/ml DE MEIO DE CULTURA	MSE	ppy	DIÂMETRO MÉDIO DE 4 A 6 REPETIÇÕES					
			CHL-16	CHL-17	CHL-18	CHL-19	CHL-20	CHL-21
0	56,83±1,44	55,62±1,75	35,40±3,13	20,50±2,50	41,31±1,88	24,67±2,14	23,60±1,80	15,22±1,75
50	20,32±1,79	19,44±2,52	39,88±1,75	21,09±1,96	47,50±2,04	38,30±1,90	32,61±2,14	16,13±1,74
100	11,30±0,80	10,65±3,20	49,07±2,04	26,36±2,74	50,32±3,16	44,16±3,48	42,35±1,10	21,68±2,40
200	7,80±1,25	7,09±2,35	52,16±1,80	35,33±1,28	47,33±1,45	43,42±2,20	39,38±1,65	19,70±1,88
400	5,65±2,04	5,46±1,47	53,85±2,00	34,33±2,04	32,88±1,87	41,90±1,17	46,18±2,74	19,62±2,14
800	4,46±1,56	5,02±0,96	52,69±4,30	35,16±3,12	28,34±1,02	38,10±2,43	38,20±2,44	18,02±1,76
1.600	3,38±1,11	4,65±1,12	28,33±2,41	15,60±1,85	13,66±2,20	24,04±1,15	25,89±1,29	14,97±2,24
3.200	0	2,54±1,23	16,33±1,09	5,66±0,75	7,74±1,14	7,42±1,46	13,06±0,80	9,08±1,67

TABELA 2 - Crescimento percentual das colônias de cada linhagem de cada linhagem da Tabela 1 em relação a concentrações crescentes de cloroneb. O nível de 100% foi atribuído ao maior diâmetro atingido pela linhagem no ensaio. Os cálculos foram efetuados com base nos dados da Tabela 1.

DOSE DE CLORONEB EM µg/ml DE MEIO DE CULTURA	MSE	ppy	PORCENTAGEM RELATIVA DE CRESCIMENTO							
			CHL-16	CHL-17	CHL-18	CHL-19	CHL-20	CHL-21		
0	100,00	100,00	65,74	58,02	82,09	55,86	51,10	70,20		
50	35,76	34,95	74,06	59,44	94,40	86,73	70,61	74,40		
100	19,88	19,15	91,12	74,61	100,00	100,00	91,71	100,00		
200	13,72	12,75	96,86	100,00	94,06	98,32	82,27	90,88		
400	10,29	9,82	100,00	97,17	65,34	94,88	100,00	90,45		
800	7,85	9,02	97,86	99,52	56,32	86,28	82,72	83,12		
1.600	5,95	8,36	52,61	44,15	27,15	54,44	56,06	69,05		
3.200	0	4,57	30,32	16,02	15,38	16,80	28,28	41,88		

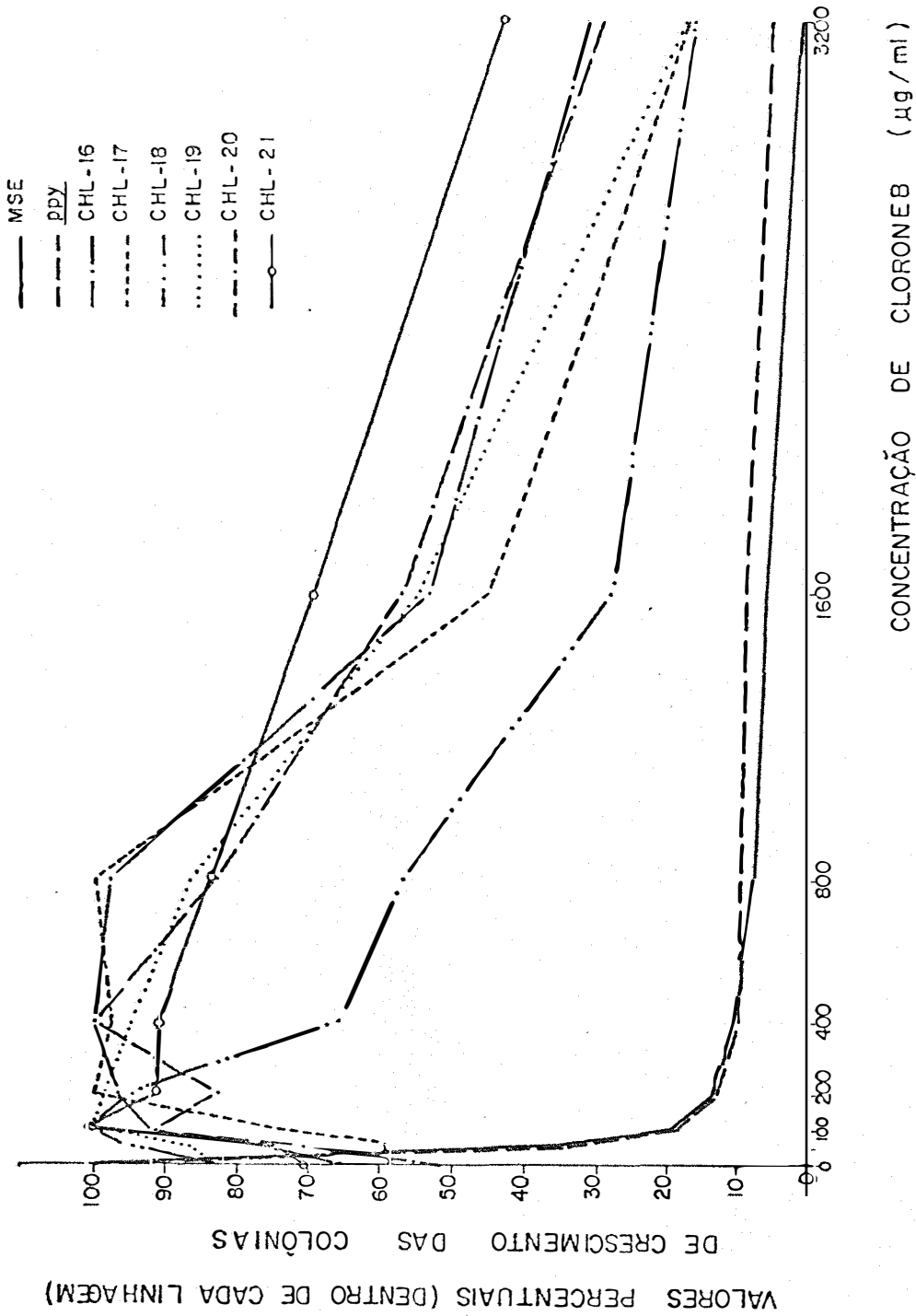


FIGURA 4 - Curvas de dose-resposta das linhagens MSE, ppy (sensíveis) e CHL-16, CHL-17, CHL-18, CHL-19, CHL-20, CHL-21 (resistentes). As curvas foram traçadas com base nos dados da Tabela 2.

TABELA 3 - Valores do ED_{50} das linhagens caracterizadas nas Tabelas 1 e 2 e também na Figura 1. As estimativas foram obtidas através de extrapolações das curvas da Figura 1.

LINHAGENS	MSE	<i>ppy</i>	CHL-16	CHL-17	CHL-18	CHL-19	CHL-20	CHL-21
ED_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	38,92	38,43	1787,35	1515,48	973,33	1788,73	1949,03	2545,16

5.2.2. Relações de dominância-recessividade

Em cada linhagem em particular, as relações alélicas no loco responsável pela resistência foram inferidas mediante o confronto das curvas de dose-resposta do diplóide preparado a partir da linhagem resistente em observação e uma outra sensível, com as curvas destes 2 haplóides. A semelhança da curva do diplóide com a da linhagem resistente ou com a da sensível permitiu reconhecer a mutação como dominante ou recessiva, respectivamente. Quando o diplóide heterozigoto evidenciou uma curva distinta, aproximadamente intermediária, concluiu-se pela ocorrência de semidominância.

Toda a elaboração que conduziu às conclusões para cada um dos mutantes pode ser acompanhada nas Tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9 e também nas Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10.

TABELA 4 - Diâmetros (em mm) de colônias das linhagens CHL-16//MSE, CHL-16 e MSE ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas.

CONCENTRAÇÃO DE CLORONEB EM µg/ml	LINHAGENS (DIÂMETRO MÉDIO DE 4 A 6 REPETIÇÕES)		
	CHL-16//MSE	CHL-16	MSE
0	57,40±1,87	35,40±3,13	56,83±1,44
50	45,55±2,14	39,88±1,75	20,32±1,79
100	40,18±2,43	49,07±2,04	11,30±0,80
200	30,54±1,90	52,16±1,80	7,80±1,25
400	22,06±1,80	53,85±2,00	5,85±2,04
800	17,74±2,12	52,69±4,30	4,46±1,56
1.600	11,06±1,55	28,33±2,14	3,38±1,11
3.200	5,34±1,40	16,33±1,09	0

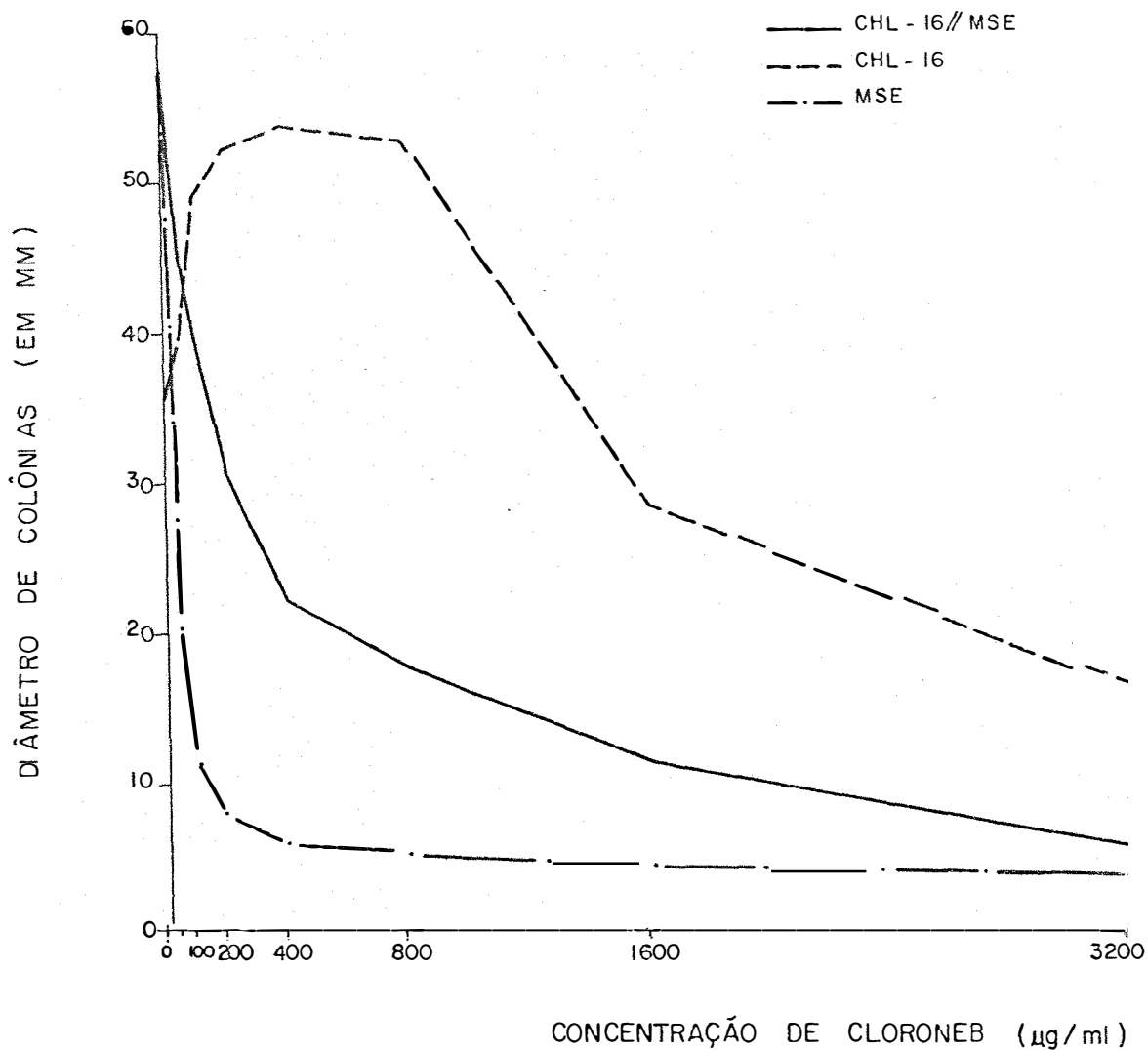


FIGURA 5 - Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-16//MSE, CHL-16 e MSE, construídas com base nos dados da Tabela 4.

TABELA 5 - Diâmetros (em mm) de colônias das linhagens CHL-17//MSE, CHL-17 e MSE ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas.

CONCENTRAÇÃO DE CLORONEB EM $\mu\text{g/ml}$	LINHAGENS (DIÂMETRO MÉDIO DE 4 A 6 REPETIÇÕES)		
	CHL-17//MSE	CHL-17	MSE
0	49,23 \pm 2,74	20,50 \pm 2,50	56,83 \pm 1,44
50	47,82 \pm 1,88	21,09 \pm 1,96	20,32 \pm 1,79
100	45,54 \pm 1,14	26,36 \pm 2,74	11,30 \pm 0,80
200	45,03 \pm 1,73	35,33 \pm 1,28	7,80 \pm 1,25
400	42,52 \pm 2,19	34,33 \pm 2,04	5,85 \pm 2,04
800	34,07 \pm 3,17	35,16 \pm 3,12	4,46 \pm 1,56
1.600	27,12 \pm 2,11	15,60 \pm 1,85	3,38 \pm 1,11
3.200	19,50 \pm 1,35	5,66 \pm 0,75	0

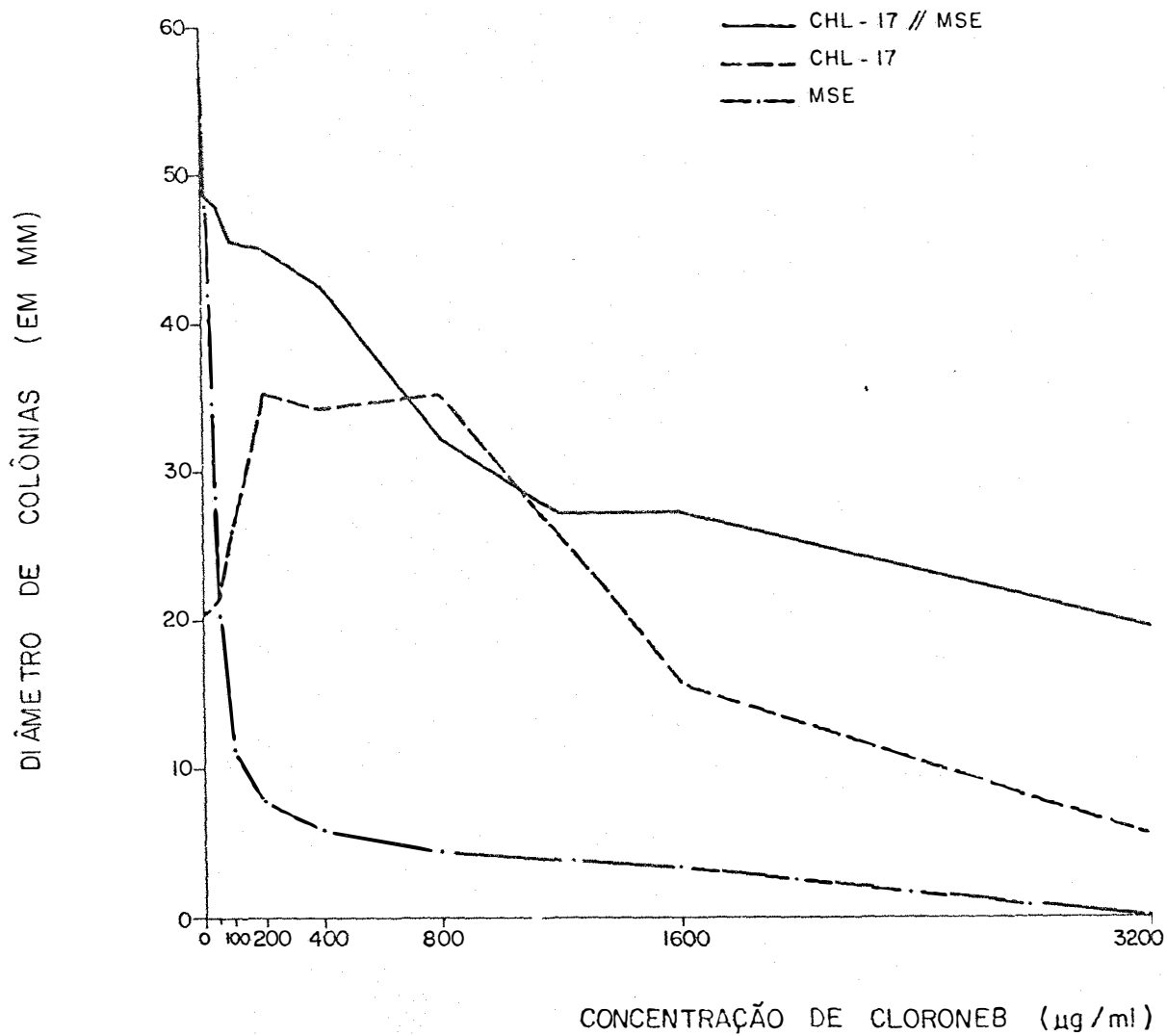


FIGURA 6 - Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-17//MSE, CHL-17 e MSE, construídas com base nos dados da Tabela 5.

TABELA 6 - Diâmetros (em mm) de colônias das linhagens CHL-18//MSE, CHL-18 e MSE ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas.

CONCENTRAÇÃO DE CLORONEB		LINHAGENS (DIÂMETRO MÉDIO DE 4 A 6 REPETIÇÕES)		
		CHL-18//MSE	CHL-18	MSE
EM	µg/ml			
	0	49,23±2,74	41,31±1,88	56,83±1,44
	50	48,05±2,04	47,50±2,04	20,32±1,79
	100	51,52±1,63	50,32±3,16	11,30±0,80
	200	42,60±2,01	47,34±1,45	7,80±1,25
	400	42,52±2,19	32,88±1,87	5,85±2,04
	800	34,04±3,17	28,34±1,02	4,46±1,56
	1.600	27,12±2,11	13,66±2,20	3,38±1,11
	3.200	19,50±1,35	7,74±1,14	0

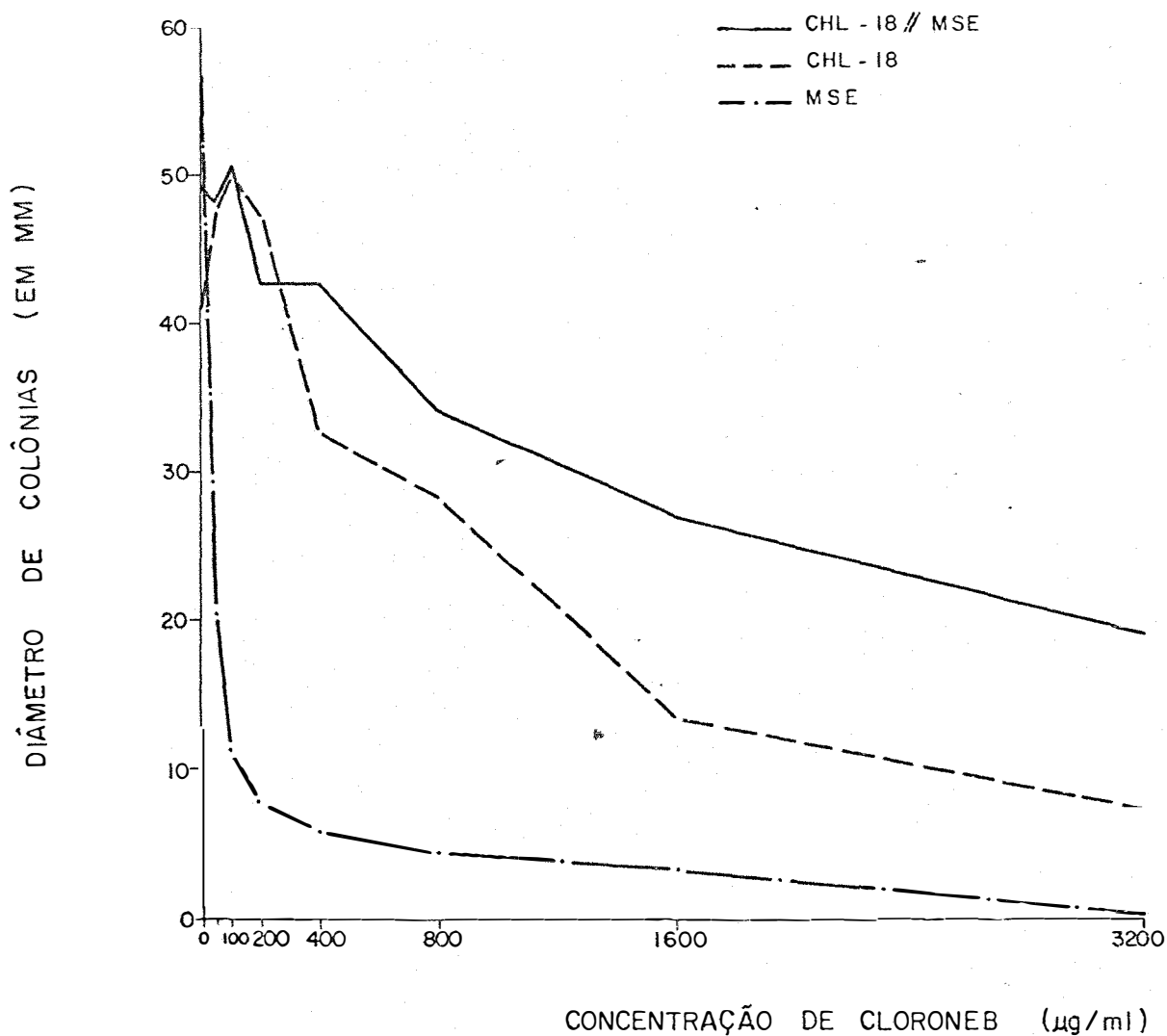


FIGURA 7 - Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-18//MSE, CHL-18 e MSE, construídas com base nos dados da Tabela 6.

TABELA 7 - Diâmetros (em mm) de colônias das linhagens CHL-19//ppy, CHL-19 e ppy ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas.

CONCENTRAÇÃO DE CLORONEB EM $\mu\text{g/ml}$	LINHAGENS (DIÂMETRO MÉDIO DE 4 A 6 REPETIÇÕES)		
	CHL-19//ppy	CHL-19	ppy
0	52,39 \pm 3,17	24,67 \pm 2,14	55,62 \pm 1,75
50	22,77 \pm 2,75	38,30 \pm 1,90	19,44 \pm 2,52
100	12,24 \pm 1,87	44,16 \pm 3,48	10,65 \pm 3,20
200	10,17 \pm 1,66	43,42 \pm 2,20	7,09 \pm 2,35
400	8,26 \pm 0,74	41,90 \pm 1,17	5,46 \pm 1,47
800	7,30 \pm 1,88	38,10 \pm 2,43	5,02 \pm 0,96
1.600	6,05 \pm 0,77	24,04 \pm 1,15	4,65 \pm 1,12
3.200	3,29 \pm 1,34	7,42 \pm 1,46	2,54 \pm 1,23

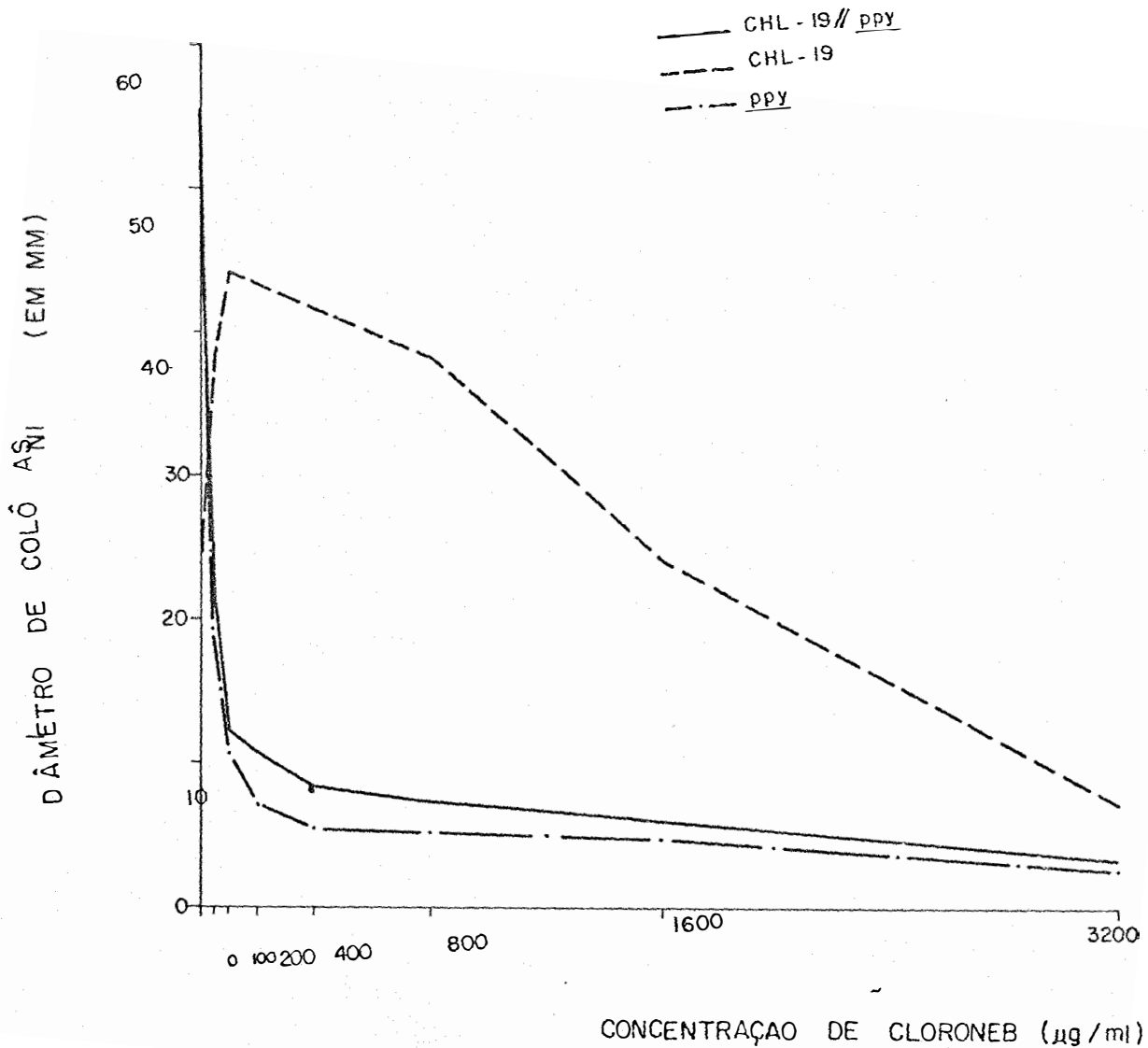


FIGURA 8 - Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-19//ppy, CHL-19 e ppy, construídas com base nos dados da Tabela 7.

TABELA 8 - Diâmetros (em mm) de colônias das linhagens CHL-20//ppy, CHL-20 e ppy ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas.

CONCENTRAÇÃO DE CLORONEB EM $\mu\text{g/ml}$	LINHAGENS (DIÂMETRO MÉDIO DE 4 A 6 REPETIÇÕES)		
	CHL-20//ppy	CHL-20	ppy
0	50,84 \pm 2,18	23,60 \pm 1,80	55,62 \pm 1,75
50	45,52 \pm 1,66	32,61 \pm 2,14	19,44 \pm 2,52
100	39,50 \pm 3,44	42,35 \pm 1,10	10,65 \pm 3,20
200	45,00 \pm 1,52	39,38 \pm 1,65	7,09 \pm 2,35
400	42,45 \pm 2,22	46,18 \pm 2,74	5,46 \pm 1,47
800	34,32 \pm 4,77	38,20 \pm 2,44	5,02 \pm 0,96
1.600	28,73 \pm 2,04	25,89 \pm 1,29	4,65 \pm 1,12
3.200	19,05 \pm 1,16	13,06 \pm 0,80	2,54 \pm 1,23

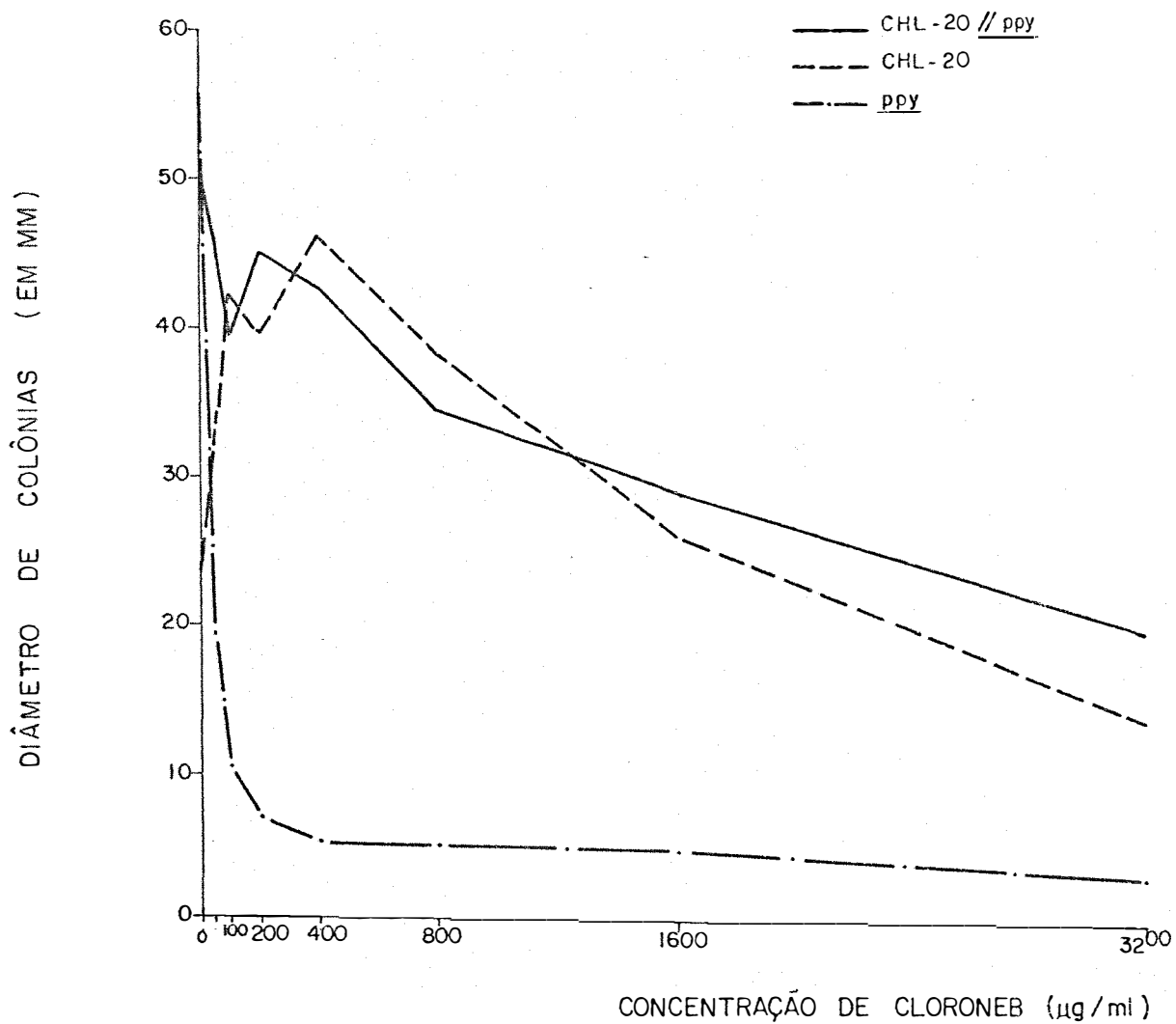


FIGURA 9 - Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-20//ppy, CHL-20 e ppy, construídas com base nos dados da Ta bela 8.

TABELA 9 - Diâmetros (em mm) de colônias das linhagens CHL-21//ppy, CHL-21 e ppy ensaiadas em concentrações crescentes de cloroneb. Tempo de incubação: 96 horas.

CONCENTRAÇÃO DE CLORONEB		LINHAGENS (DIÂMETRO MÉDIO DE 4 A 6 REPETIÇÕES)		
		CHL-21//ppy	CHL-21	ppy
EM	µg/ml			
	0	48,92±2,13	15,22±1,75	55,62±1,75
	50	37,22±1,75	16,13±1,74	19,44±2,52
	100	33,55±2,14	21,68±2,40	10,65±3,20
	200	39,61±3,24	19,70±1,88	7,09±2,35
	400	32,41±2,29	19,62±2,14	5,46±1,47
	800	21,77±1,84	18,02±1,76	5,02±0,96
	1.600	8,64±2,37	14,97±2,24	4,65±1,12
	3.200	3,40±0,90	9,08±1,67	2,54±1,23

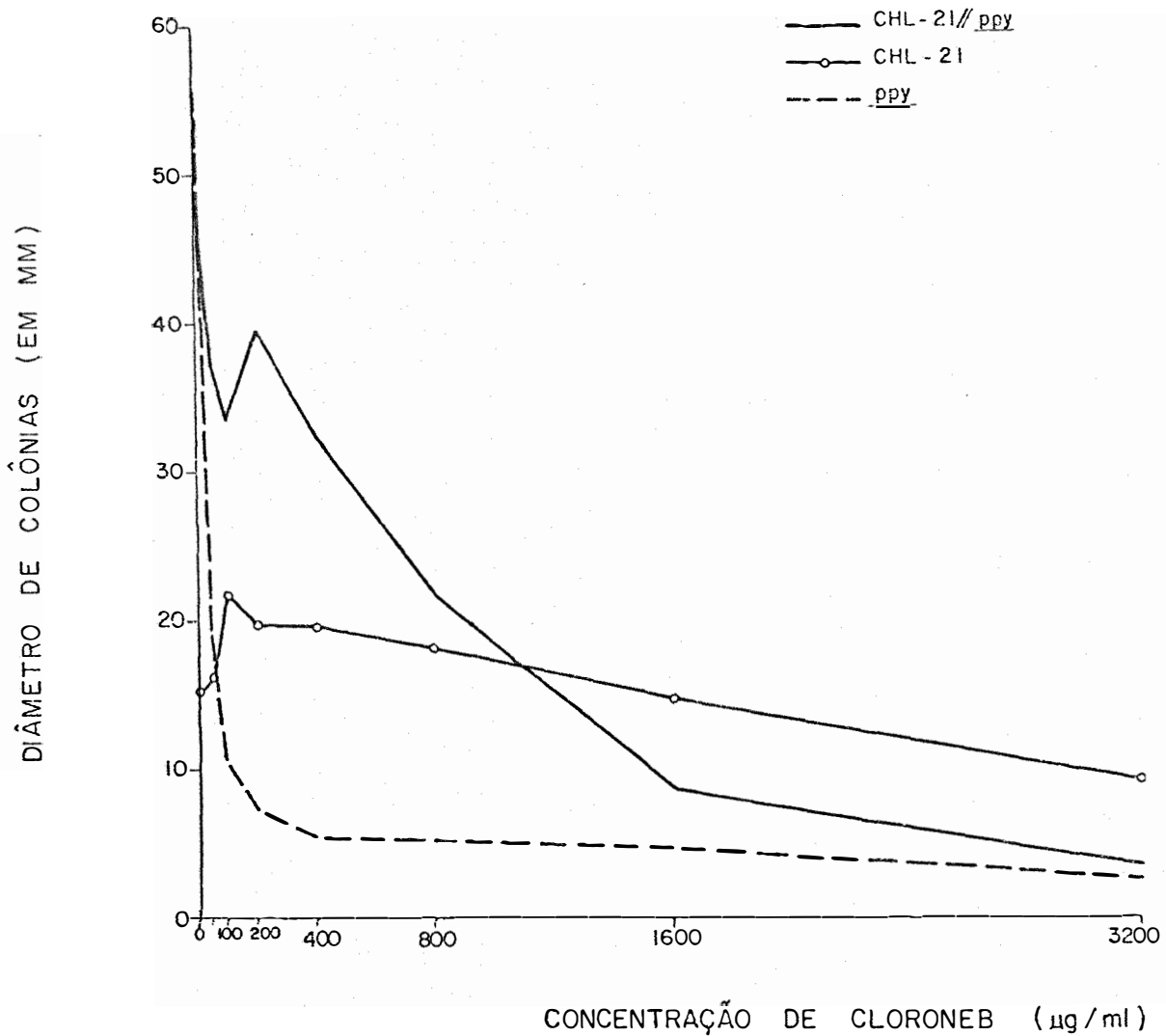


FIGURA 10- Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-21//ppy, CHL-21 e ppy, construídas com base nos dados da Tabela 9.

5.3. Análise genética dos mutantes resistentes

5.3.1. Teste do heterocário

Para a aplicação desse teste cada linhagem resistente foi cruzada com a MSE, exceto as resistentes originárias da própria MSE, que foram cruzadas com a *ppy*. As descrições desses procedimentos se encontram nos itens 4.10.1. e 4.10.2.

Em cada cruzamento, a semeadura da suspensão de conídios originários das colônias heterocarióticas, em meio completo acrescido de 100 µg/ml de cloroneb evidenciou, após 3 dias de incubação, 4 tipos de colônias: umas de crescimento desinibido denotando resistência e as restantes com aspecto retraído, aparentando ser sensíveis ao inibidor; independentemente dessa característica cerca da metade apresentou conídios brancos e as demais produziram conídios amarelos. Colônias pertencentes a cada um dos 4 tipos foram replicadas em pares de placas-mestras (uma contendo apenas meio completo e outra com o meio mais cloroneb a 100 µg/ml). Confrontadas após 3 dias de incubação, as placas propiciaram uma verificação inequívoca, conforme pode se constatar na Tabela 10.

Ficou evidente, portanto, que todas as resistências investigadas se comportavam conforme o modelo de herança cromossômica.

TABELA 10 - Resultados do teste do heterocáριο aplicado às linhagens resistentes.

COLÔNIA HETEROCÁRIO TICA	CONÍDIOS ENSAIADOS				TOTAL
	SENS.-BRANCOS	SENS.-AMARELOS	RES.-BRANCOS	RES.-AMARELOS	
CHL-16 + MSE	112	0	0	125	237
CHL-17 + MSE	118	0	0	128	246
CHL-18 + MSE	132	0	0	114	246
CHL-19 + <i>ppy</i>	135	0	0	113	248
CHL-20 + <i>ppy</i>	116	0	0	128	244
CHL-21 + <i>ppy</i>	112	0	0	128	240

5.3.2. Determinação do número de locos responsáveis pela resistência

Foram utilizados os produtos meióticos do cruzamento de cada uma das linhagens resistentes com uma sensível, conforme consta no item 4.10.6. As colônias provenientes de ascósporos originários de cleistotécios híbridos, examinadas em placas com 100 µg/ml de cloroneb acrescentando ao meio completo, foram discriminadas como resistentes ou sensíveis e os valores numéricos agrupados na Tabela 11. O teste do χ^2 , aplicado sobre a hipótese da proporção 1:1 não acusou significância nos desvios em qualquer dos casos, fato que permitiu a aceitação da hipótese de ocorrência de herança monogênica em todos eles.

Os genes que conferem resistência às linhagens CHL-16, CHL-17, CHL-18, CHL-19, CHL-20 e CHL-21 passaram então a ser simbolizados por *Chl*₁₆, *Chl*₁₇, *Chl*₁₈, *chl*₁₉, *Chl*₂₀ e *Chl*₂₁, respectivamente.

5.3.3. Localização dos genes para resistência nos respectivos grupos de ligação

Para esta finalidade desenvolveu-se a análise de segregantes (item 4.10.5.) oriundos de diplóides entre linhagens portadoras da marca resistência-ao-cloroneb com a MSE ou então com a *ppy* (nos casos em que a resistência se encontrava em mutante derivado da própria MSE).

Os resultados permitiram associar a marca sob investigação ao grupo de ligação III em todos os 6 mutantes, conforme está expresso na Tabela 12.

TABELA 11 - Segregação meiótica nos cruzamentos das linhagens resistentes com a MSE ou *ppy*.

CRUZAMENTOS	SEGREGANTES		TOTAL	χ^2 (1:1)	SIGNIFICÂNCIA A NÍVEL DE 5%
	SENSÍVEIS	RESISTENTES			
CHL-16 x MSE	233	252	485	0,74	n.s.
CHL-17 x MSE	240	237	477	0,02	n.s.
CHL-18 x MSE	261	232	493	3,08	n.s.
CHL-19 x <i>ppy</i>	227	265	492	2,93	n.s.
CHL-20 x <i>ppy</i>	250	218	468	2,19	n.s.
CHL-21 x <i>ppy</i>	251	241	492	0,20	n.s.

χ^2 aplicado em função da segregação 1:1.

n.s.: não significativo.

TABELA 12 - Análise mitótica dos segregantes haplóides das linhagens CHL-16//MSE, CHL-17//MSE, CHL-18//MSE, CHL-19//ppy, CHL-20//ppy e CHL-21//ppy.

GRUPOS DE LIGAÇÃO	MARCADORES		CHL-16//MSE		CHL-17//MSE		CHL-18//MSE		CHL-19//ppy		CHL-20//ppy		CHL-21//ppy	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
I	<i>pro⁺</i>	3	5	2	14	0	9	2	13	3	7	1	9	
	<i>paba⁺</i>	0	13	0	6	2	10	1	4	1	10	2	10	
II	<i>w⁺</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>w</i>	3	18	2	20	2	19	3	17	4	17	3	19*	
III	<i>gal⁺</i>	3	0	2	0	0	0	0	17	0	17	0	19**	
	<i>gal</i>	0	18	0	20	2	19	3	0	4	0	3	0	
IV	<i>pyro⁺</i>	1	7	1	10	0	15	2	9	3	13	2	9	
	<i>pyro</i>	2	11	1	10	2	4	1	8	1	4	1	10	
V	<i>fac⁺</i>	2	10	0	11	1	7	2	10	2	9	1	12	
	<i>fac</i>	1	8	2	9	1	12	1	7	2	8	2	7	
VI	<i>Δ⁺</i>	2	7	2	10	2	12	1	9	3	5	1	9	
	<i>Δ</i>	1	11	0	10	0	7	2	8	1	12	2	10	
VII	<i>nic⁺</i>	1	9	2	11	1	8	1	11	1	7	2	11	
	<i>nic</i>	2	9	0	9	1	11	2	6	3	10	1	8	
VIII	<i>ribo⁺</i>	1	10	1	12	2	11	2	9	1	9	2	10	
	<i>ribo</i>	2	8	1	8	0	8	1	8	3	8	1	9	

A combinação (*gal*/S) é própria da linhagem MSE e (*gal⁺*/S) da *ppy*. (*gal*/R) é genótipo de resistentes oriundos da MSE e (*gal⁺*/R) corresponde a mutantes procedentes da linhagem *ppy*.

*O fato das colônias diplóides possuírem conídios amarelos teria feito com que os possíveis setores haplóides dessa cor fossem mascarados. Em consequência, o exame visual permitiu a discriminação unicamente dos setores brancos. Eis a razão porque toda a análise com relação ao grupo II se fez através de segregantes brancos (*w*).

**O loco relacionado com a resistência mostrou pertencer ao grupo de ligação III.

5.3.4. Mapeamento dos genes para resistência dentro dos grupos de ligação

A verificação de possível ligação genética entre o gene *Chl* de cada um dos mutantes e o *galA₁*, marcador genético do grupo de ligação III, foi levada a efeito através da análise meiótica (item 4.10.6.) abrangendo ascósporos de cleistotécios híbridos, vindos do cruzamento da linhagem resistente com a MSE ou *ppy*.

Os resultados da análise estão sumarizados na Tabela 13.

Tendo em vista a proximidade dos valores para a distância genética entre os 2 locos e principalmente os resultados do teste de alelismo relatado no item 5.3.5., totalizou-se os dados provenientes dos 6 cruzamentos numa amostra única, ao pé da Tabela 13.

5.3.5. Sondagem de alelismo

A possibilidade de alelismo entre os vários genes *Chl* foi examinada através de cruzamento entre segregantes meióticos, confrontando-se duas a duas, as mutações de diferentes linhagens resistentes. Marcas auxotróficas e morfológicas não-coincidentes também fizeram parte do sistema dentro da exigência justificada no item 4.10.7.

Os 5 testes realizados estão sumarizados na Tabela 14.

Os resultados nela encontrados indicam que as 6 mutações *Chl* são alélicas, ou, numa hipótese remota, não-alélicas intimamente ligadas.

TABELA 13 - Análise meiótica das mutações para a resistência.

CRUZAMENTO	GRUPO DE LIGAÇÃO	MARCADOR GENÉTICO	NÚMERO DE ASCÓSPOROS ANALISADOS	LIGAÇÃO GENÉTICA	S (%)
CHL-16 x MSE	III	<i>gal</i>	202	32,18	3,29
CHL-17 x MSE	III	<i>gal</i>	196	33,67	3,37
CHL-18 x MSE	III	<i>gal</i>	212	37,26	3,32
CHL-19 x <i>ppy</i>	III	<i>gal</i>	193	36,27	3,42
CHL-20 x <i>ppy</i>	III	<i>gal</i>	191	29,32	3,29
CHL-21 x <i>ppy</i>	III	<i>gal</i>	170	29,77	3,51
(Amostra como um todo)	III	<i>gal</i>	1.927	34,04	1,08

TABELA 14 - Teste de alelismo aplicado às 6 mutações para a resistência.

CRUZAMENTO	NÚMERO DE ASCÓSPOROS ANALISADOS	SENSÍVEIS	RESISTENTES
CHL-16 (nic y chl ^R) x CHL-17 (ribo w chl ^R)	144	0	144
CHL-16 (nic y chl ^R) x CHL-18 (pyto w chl ^R)	140	0	140
CHL-16 (nic y chl ^R) x CHL-19 (ribo w chl ^R)	139	0	139
CHL-19 (ribo w chl ^R) x CHL-20 (nic y chl ^R)	148	0	148
CHL-19 (ribo w chl ^R) x CHL-21 (nic y chl ^R)	145	0	145

As notações entre parênteses representam, por ordem: o requerimento nutricional do segregante, a coloração dos seus conídios e o fenótipo resistência-ao-cloroneb.

5.4. Caracterização e análise genética dos mutantes sensíveis

As linhagens CHL-₁(Chl₁^S), CHL-₁(Chl₂^S) e CHL-₁(Chl₃^S), oriundas da CHL-₁ e também CHL-₁₃(Chl₁^S) e CHL-₁₃(Chl₂^S), procedentes da CHL-₁₃, inicialmente isoladas como possíveis revertentes sensíveis, quando foram examinadas através das respectivas curvas de dose-resposta revelaram as situações expressas nas Tabelas 15 e 16 e também nas Figuras 11 e 12. Na realidade, somente o mutante CHL-₁₃(Chl₂^S) se mostrou tipicamente sensível. Os demais se diferenciaram da linhagem de origem através de um decréscimo no grau de resistência e ou dependência da droga. Em resumo:

CHL-₁(Chl₁^S): menos dependente e menos resistente do que a CHL-₁;

CHL-₁(Chl₂^S): menos dependente e tão resistente quanto a CHL-₁;

CHL-₁(Chl₃^S): tão dependente e menos resistente do que a CHL-₁;

CHL-₁₃(Chl₁^S): pouco dependente e tão resistente quanto a CHL-₁₃.

Desde que essas 4 linhagens ainda manifestaram resistência, elas também foram submetidas à análise genética com vistas à localização do gene responsável pelo fenótipo. As informações da análise mitótica estão esquematizadas na Tabela 17 onde ficou patente que, em todos os casos, o loco relacionado com a resistência integra o grupo de ligação III. Uma situação particular foi revelada pela linhagem CHL-₁₃(Chl₁^S) na qual a mutação foi relacionada simultaneamente aos grupos III e VIII.

A análise meiótica, sintetizada na Tabela 18, apontou ligação genética da marca resistência com o gene *galA*₁, ao mesmo tempo em que descartou a hipótese de ligação

com o gene *riboB*₂, marcador do grupo VIII.

A mesma tabela confirmou ainda uma vez a ligação dos locos para resistência das outras 3 linhagens com o marcador *galA*₁.

5.5. Teste de alelismo entre os gene *Chl*₁ e *chl*₁₃

A localização das 3 mutações CHL-₁(Chl^S) no grupo de ligação III causou estranheza visto que SANT'ANA (1974) e AZEVEDO e col. (1977) haviam atribuído o loco responsável pela resistência da linhagem CHL-₁ ao grupo de ligação IV.

Com o objetivo de esclarecer o impasse foi aplicado um teste de alelismo envolvendo as linhagens CHL-₁ e CHL-₁₃. Todos os segregantes meióticos examinados, num total de 241, apresentaram-se resistentes ao cloroneb, indicando que as duas mutações devem ser alélicas ou, quando muito, estreitamente ligadas.

TABELA 15 - Desenvolvimento de colônias das linhagens CHL-₁ (resistente) , *bia*₁; *methG*₁ (sensível) e CHL-₁(Chl₁^S), CHL-₁(Chl₂^S), CHL-₁(Chl₃^S) (derivadas da primeira) ensaiadas sob doses crescentes de cloroneb. Na tabela constam, para cada concentração do fungicida, o diâmetro médio e o correspondente valor percentual dentro da linhagem. Tempo de incubação: 96 horas.

DOSE DE CLORONEB EM µg/ml DE MEIO DE CULTURA	LINHAGENS (DIÂMETRO MÉDIO DE 4 A 6 REPETIÇÕES)					
	CHL- ₁	<i>bia</i> ₁ ; <i>methG</i> ₁	CHL- ₁ (Chl ₁ ^S)	CHL- ₁ (Chl ₂ ^S)	CHL- ₁ (Chl ₃ ^S)	
0	∅	23,35±2,17	51,70±3,15	34,10±2,20	29,05±2,73	20,02±1,27
	%	57,51	100,00	90,21	79,98	59,67
50	∅	32,16±1,49	21,41±2,10	37,80±1,50	36,32±1,95	24,37±1,80
	%	82,76	41,41	100,00	100,00	72,64
100	∅	38,86±2,54	12,17±1,54	32,58±2,75	33,40±2,80	33,55±2,19
	%	100,00	23,54	86,19	91,96	100,00
200	∅	25,57±1,94	8,75±1,40	27,40±1,88	27,83±1,44	24,74±1,83
	%	65,80	16,92	72,49	76,62	73,74
400	∅	23,88±2,33	5,19±1,06	17,20±1,52	22,60±1,60	16,64±0,70
	%	61,45	10,04	45,50	62,22	49,60
800	∅	18,39±2,05	3,42±1,25	9,62±2,14	16,53±1,46	11,50±1,26
	%	47,32	6,61	25,45	45,51	34,28
1.600	∅	14,15±1,35	1,57±0,95	4,33±1,15	13,61±1,08	7,45±0,85
	%	36,41	3,04	11,45	37,47	22,21
3.200	∅	10,24±1,13	0	2,48±1,10	8,15±1,64	4,42±1,35
	%	20,35	0	6,59	22,44	13,17

∅ - Diâmetro medido em mm.

% - Valor percentual dentro da linhagem.

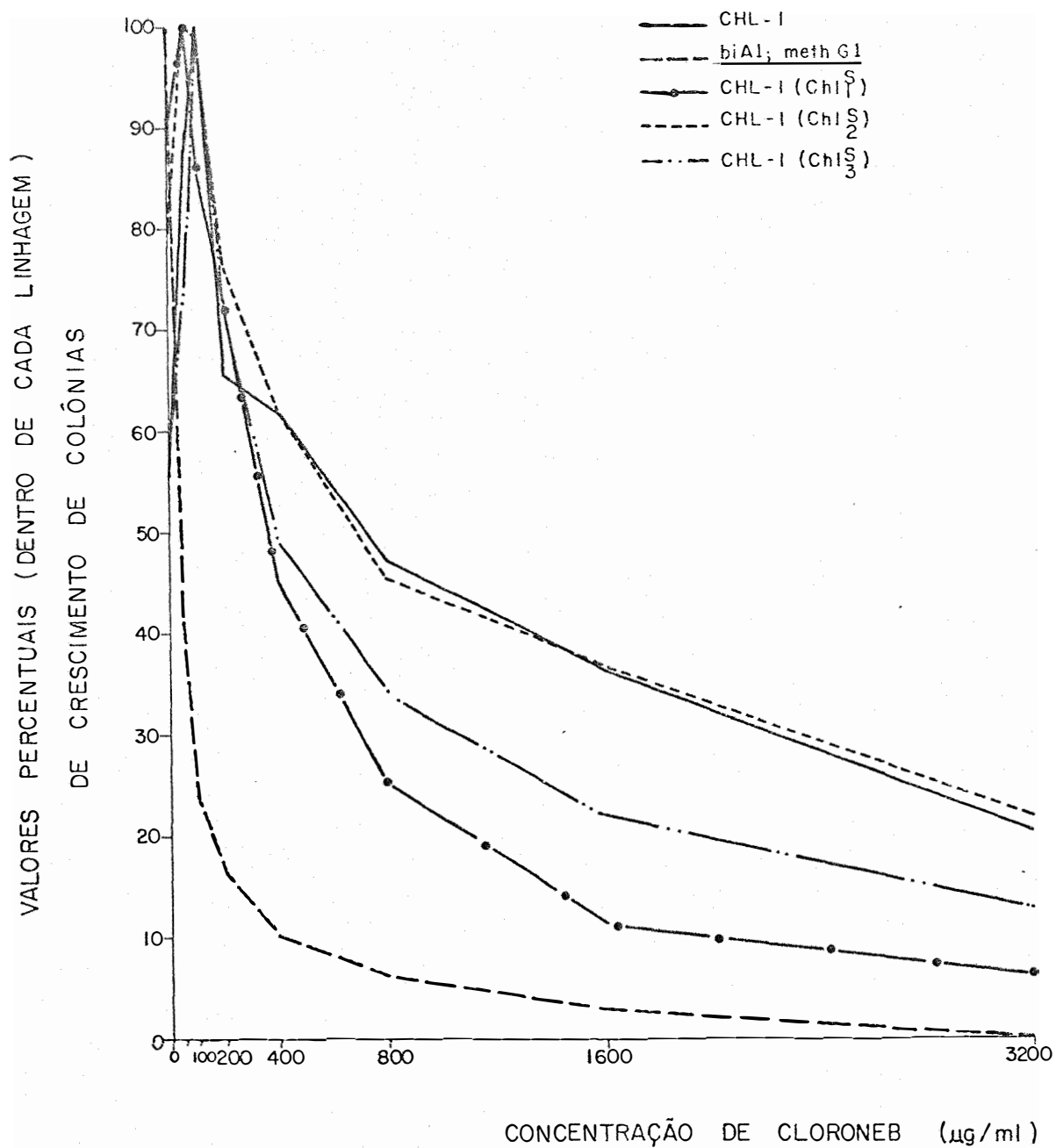


FIGURA 11- Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-₁ (resistente), $biA_1; methG_1$ (sensível), CHL-₁(Chl_1^S), CHL-₁(Chl_2^S) e CHL-₁(Chl_3^S). As curvas foram traçadas com base nos dados da Tabela 15.

TABELA 16 - Desenvolvimento de colônias das linhagens CHL-13 (resistente), *ppy* (sensível) e CHL-13(Chl₁^S), CHL-13(Chl₂^S) (derivadas da primeira) ensaiadas sob doses crescentes de cloroneb. Na tabela constam, para cada concentração do fungicida, o diâmetro médio e o correspondente valor percentual dentro da linhagem. Tempo de incubação: 96 horas.

DOSE DE CLORONEB EM µg/ml DE MEIO DE CULTURA		LINHAGENS (DIÂMETRO MÉDIO DE 4 A 6 REPETIÇÕES)			
		CHL-13	<i>ppy</i>	CHL-13(Chl ₁ ^S)	CHL-13(Chl ₂ ^S)
0	∅	24,70 ± 2,61	55,62 ± 1,75	39,50 ± 2,48	58,50 ± 3,20
	%	55,49	100,00	91,73	100,00
50	∅	43,27 ± 2,12	19,44 ± 2,52	43,06 ± 2,90	27,00 ± 1,10
	%	97,21	34,95	100,00	46,15
100	∅	44,51 ± 1,66	10,65 ± 3,20	41,37 ± 1,60	20,00 ± 1,86
	%	100,00	19,15	96,07	34,19
200	∅	36,30 ± 1,53	7,09 ± 2,35	37,30 ± 2,24	15,88 ± 1,14
	%	81,55	12,75	86,62	27,14
400	∅	24,56 ± 1,22	5,46 ± 1,47	26,35 ± 1,75	12,38 ± 1,66
	%	55,18	9,82	61,19	21,16
800	∅	15,73 ± 0,88	5,02 ± 0,96	17,30 ± 1,09	9,46 ± 1,87
	%	35,34	9,02	40,18	16,17
1.600	∅	13,20 ± 0,90	4,65 ± 1,12	15,55 ± 1,66	3,75 ± 0,85
	%	29,66	8,36	36,11	6,41
3.200	∅	6,47 ± 0,65	2,54 ± 1,23	8,60 ± 0,66	0
	%	14,54	4,57	19,97	0

∅ - Diâmetro medido em mm.

% - Valor percentual dentro da linhagem.

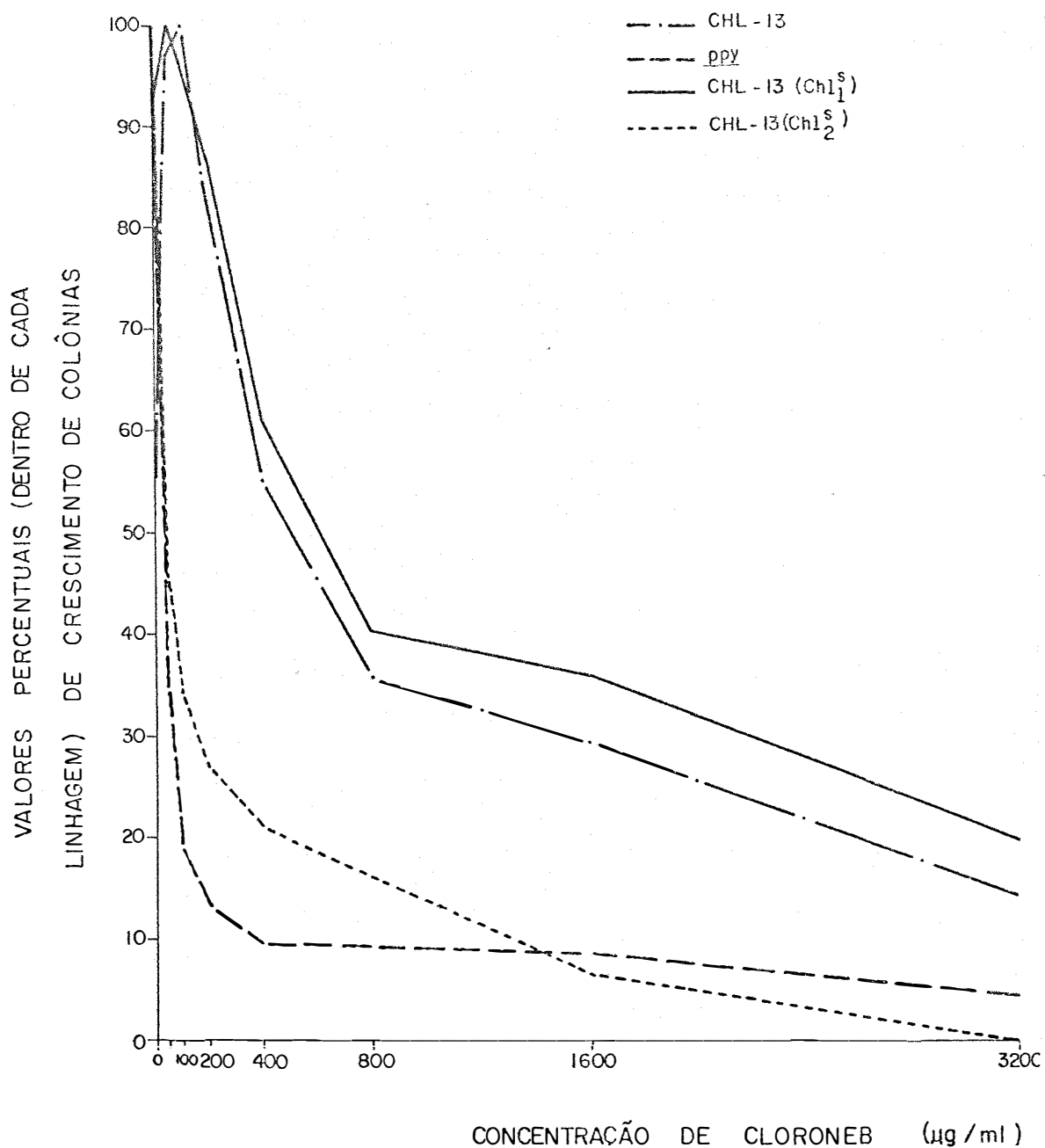


FIGURA 12- Curvas de dose-resposta das linhagens CHL-13 (resistente), ppy (sensível) e CHL-13(Chl_1^S), CHL-13(Chl_2^S) (ambas derivadas da primeira). As curvas foram traçadas com base nos dados da Tabela 16.

TABELA 17 - Análise mitótica dos segregantes haplóides das linhagens CHL-1(CH1₁^S)/MSE, CHL-1(CH1₂^S)/MSE, CHL-1(CH1₃^S)/MSE e CHL-13(CH1₁^S)/MSE.

GRUPOS DE LIGAÇÃO	MARCADORES	CHL-1(CH1 ₁ ^S)/MSE		CHL-1(CH1 ₂ ^S)/MSE		CHL-1(CH1 ₃ ^S)/MSE		CHL-13(CH1 ₁ ^S)/MSE	
		R	S	R	S	R	S	R	S
I	<i>pro</i> ⁺	2	5	0	9	2	4	0	7
	<i>paba</i> ⁺	1	6	2	3	2	6	2	4
II	<i>w</i> ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0*
	<i>w</i>	3	11	2	12	4	10	2	11*
III	<i>gal</i> ⁺	3	0	2	0	4	0	2	0
	<i>gal</i>	0	11	0	12	0	10	0	11***
IV	<i>pyro</i> ⁺	2	4	1	7	3	3	1	6
	<i>pyro</i>	1	7	1	5	1	7	1	5
V	<i>lac</i> ⁺	1	6	2	7	3	4	1	6
	<i>lac</i>	2	5	0	5	1	6	1	5
VI	<i>Δ</i> ⁺	2	6	0	6	2	7	2	4
	<i>Δ</i>	1	5	2	6	2	3	0	7
VII	<i>nic</i> ⁺	3	9	1	9	3	2	1	7
	<i>nic</i>	0	2	1	3	1	8	1	4
VIII	<i>ribo</i> ⁺	2	4	2	8	2	5	2	0
	<i>ribo</i>	1	7	0	4	2	5	0	11***

*O fato das colônias diplóides das 3 primeiras linhagens apresentarem confídios verdes e as da linhagem CHL-13(CH1₁^S)/MSE possuírem coloração amarela teria feito com que os possíveis setores haplóides dessa cor fossem mascarados. Em consequência, o exame visual permitiu a discriminação unicamente dos setores brancos. Eis a razão porque toda a análise com relação ao grupo II se fez através de segregantes brancos (*w*).

**O loco relacionado com a resistência mostrou pertencer ao grupo de ligação III em todas as linhagens.

***A linhagem CHL-13(CH1₁^S) evidenciou o mesmo loco associado simultaneamente aos grupos de ligação III e VIII.

TABELA 18 - Análise meiótica das linhagens CHL-1(Ch1^S), CHL-1(Ch1₂^S), CHL-1(Ch1₃^S) e CHL-13(Ch1^S).

CRUZAMENTO	GRUPO DE LIGAÇÃO	MARCADOR GENÉTICO	NÚMERO DE ASCÓSPOROS ANALISADOS	LIGAÇÃO GENÉTICA	S (%)
CHL-1(Ch1 ₁ ^S) x MSE	III	<i>gal</i>	143	32,64	3,61
CHL-1(Ch1 ₂ ^S) x MSE	III	<i>gal</i>	139	30,26	3,29
CHL-1(Ch1 ₃ ^S) x MSE	III	<i>gal</i>	148	31,43	3,20
CHL-13(Ch1 ₁ ^S) x MSE	III	<i>gal</i>	141	36,82	2,91
CHL-13(Ch1 ₁ ^S) x MSE	VIII	<i>rábo</i>	169	48,79	4,14

5.6. Tratamentos mutagênicos

5.6.1. Sobrevivência de conídios

As Tabelas 19 a 34 registram, especificamente, para cada linhagem e cada tratamento nos seus diferentes tempos, o número e a porcentagem relativa de conídios sobreviventes (V. itens 4.12.1., 4.12.2., 4.12.3. e 4.12.4.).

5.6.2. Curvas de sobrevivência

Nas Figuras 13 a 16 estão reproduzidas as curvas de sobrevivência de conídios, das 4 linhagens, submetidos a cada um dos 4 tratamentos mutagênicos. Os traçados foram elaborados conforme o exposto nos itens 4.12.1. a 4.12.4.

TABELA 19 - Sobrevivência de conídios da linhagem MSE submetidos ao tratamento com ácido nitroso.

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1 ^a repetição	2 ^a repetição	1 ^a repetição	2 ^a repetição	
controle	$1,9 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	100,0	100,0	100,0
5	$1,3 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	68,4	65,2	66,8
10	$1,1 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$	5,8	3,9	4,8
15	$4,4 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$	0,23	0,11	0,17
20	$2,5 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$	0,013	0,003	0,08
25	$1,0 \times 10^1$	0	0,0005	0	0,00025
30	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0

TABELA 20 - Sobrevivência de conídios da linhagem *ppy* submetidos ao tratamento com ácido nitroso.

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
	repetição	repetição	repetição	repetição	
controle	$1,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	100,0	100,0	100,0
5	$8,2 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	74,5	67,9	71,2
10	$3,9 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	3,5	1,4	2,5
15	$2,4 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$	0,022	0,0029	0,012
20	$4,0 \times 10^1$	0	0,00036	0	0,00018
25	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0

TABELA 21 - Sobrevivência de confídios da linhagem CHL-13 submetidos ao tratamento com ácido nitroso.

Tempo (minutos)	Confídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1 ^a repetição	2 ^a repetição	1 ^a repetição	2 ^a repetição	
controle	$9,3 \times 10^7$	$5,2 \times 10^7$	100,0	100,0	100,0
5	$6,5 \times 10^7$	$3,8 \times 10^7$	73,1	69,9	71,5
10	$1,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	1,3	2,5	1,9
15	$1,3 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$	0,0014	0,015	0,008
20	$1,4 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2$	0,00015	0,0011	0,0006
25	$1,0 \times 10^1$	0	0,00001	0	5×10^{-6}
30	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0

TABELA 22 - Sobrevivência de conídios da linhagem CHL-1 submetidos ao tratamento com ácido nitroso.

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1 ^a repetição	2 ^a repetição	1 ^a repetição	2 ^a repetição	
controle	$6,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	100,0	100,0	100,0
5	$4,6 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	73,0	77,3	75,2
10	$1,9 \times 10^6$	$8,9 \times 10^5$	3,0	4,0	3,5
15	$2,7 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	0,042	0,064	0,053
20	0	$2,0 \times 10^2$	0	0,0009	0,00045
25	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0

TABELA 23 - Sobrevivência de conídios da linhagem MSE submetidos ao tratamento com metano-sulfonato de etila (EMS).

Tempo (horas)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
	repetição	repetição	repetição	repetição	
controle	$1,2 \times 10^7$	$4,8 \times 10^7$	100,0	100,0	100,0
1	$9,8 \times 10^6$	$3,8 \times 10^7$	81,7	79,2	80,4
2	$7,1 \times 10^6$	$3,1 \times 10^7$	59,2	64,4	61,9
3	$2,7 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	22,5	27,1	24,8
4	$8,8 \times 10^5$	$5,1 \times 10^6$	7,3	10,6	8,9
5	$5,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	4,4	4,8	4,6
6	$3,7 \times 10^5$	$8,6 \times 10^5$	3,1	1,8	2,5
7	$8,5 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	0,7	0,3	0,5

TABELA 24 - Sobrevivência de conídios da linhagem *ppy* submetidos ao tratamento com metano-sulfonato de etila (EMS).

Tempo (horas)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Média
	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
	repetição	repetição	repetição	repetição	
controle	$4,2 \times 10^7$	$8,8 \times 10^6$	100,0	100,0	100,0
1	$3,2 \times 10^7$	$6,4 \times 10^6$	76,2	72,7	74,5
2	$2,7 \times 10^7$	$5,5 \times 10^6$	64,3	62,5	63,4
3	$1,4 \times 10^7$	$3,5 \times 10^6$	33,3	39,8	36,6
4	$8,5 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	20,2	20,5	20,4
5	$3,1 \times 10^6$	$9,4 \times 10^5$	7,4	10,7	9,1
6	$1,4 \times 10^6$	$5,6 \times 10^5$	3,3	6,4	4,9
7	$2,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	0,5	1,2	0,9

TABELA 25 - Sobrevivência de conídios da linhagem CHL-13 submetidos ao tratamento com metano-sulfonato de etila (EMS).

Tempo (horas)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Total
	1 ^a repetição	2 ^a repetição	1 ^a repetição	2 ^a repetição	
controle	$3,1 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	100,0	100,0	100,0
1	$2,4 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$	77,4	72,0	74,4
2	$2,1 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	67,7	60,0	63,9
3	$1,3 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	41,9	46,0	44,0
4	$6,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	21,3	36,0	28,7
5	$3,4 \times 10^6$	$9,1 \times 10^6$	11,0	18,2	14,6
6	$8,8 \times 10^5$	$3,2 \times 10^6$	2,8	6,4	4,6
7	$7,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	0,2	2,2	1,2

TABELA 26 - Sobrevivência de conídios da linhagem CHL-1 submetidos ao tratamento com metano-sulfonato de etila (EMS).

Tempo (horas)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Total
	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
	repetição	repetição	repetição	repetição	
controle	$4,3 \times 10^7$	$8,6 \times 10^6$	100,0	100,0	100,0
1	$3,7 \times 10^7$	$6,4 \times 10^6$	86,0	74,4	80,2
2	$7,1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	16,5	40,7	28,6
3	$5,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	11,9	31,4	21,7
4	$1,2 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	2,8	24,4	13,6
5	$1,6 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	0,4	11,6	6,0
6	$5,7 \times 10^4$	$2,7 \times 10^5$	0,1	3,1	1,6
7	$3,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	0,07	1,5	0,8

TABELA 27 - Sobrevivência de conídios da linhagem MSE submetidos ao tratamento com dietilsulfato (DES).

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Total
	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
	repetição	repetição	repetição	repetição	
controle	$2,8 \times 10^8$	$3,3 \times 10^7$	100,0	100,0	100,0
10	$1,8 \times 10^8$	$1,9 \times 10^7$	64,3	57,6	61,0
20	$1,1 \times 10^8$	$8,9 \times 10^6$	39,3	27,0	33,1
30	$2,0 \times 10^7$	$5,9 \times 10^6$	7,1	17,9	12,5
40	$1,2 \times 10^6$	$6,5 \times 10^5$	0,43	2,0	1,2
50	$2,0 \times 10^4$	$4,2 \times 10^4$	0,007	0,1	0,05
60	0	0	0	0	0

TABELA 28 - Sobrevivência de conídios da linhagem *ppy* submetidos ao tratamento com dietilsulfato (DES).

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Total
	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
	repetição	repetição	repetição	repetição	
controle	$3,6 \times 10^6$	$2,6 \times 10^7$	100,0	100,0	100,0
10	$3,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$	86,1	73,1	79,6
20	$1,3 \times 10^6$	$9,4 \times 10^6$	36,1	36,1	36,1
30	$8,4 \times 10^5$	$6,9 \times 10^6$	23,3	26,5	24,9
40	$1,3 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5$	3,6	2,1	2,9
50	$2,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	0,6	0,5	0,6
60	0	$2,1 \times 10^3$	0	0,0081	0,004

TABELA 29 - Sobrevivência de conídios da linhagem CHL-13 submetidos ao tratamento com dietilsulfato (DES).

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Total
	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
	repetição	repetição	repetição	repetição	
controle	$2,5 \times 10^7$	$7,6 \times 10^6$	100,0	100,0	100,0
10	$1,9 \times 10^7$	$6,8 \times 10^6$	76,0	89,5	82,8
20	$8,3 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	33,2	35,5	34,3
30	$6,6 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	26,4	18,4	22,4
40	$7,8 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	3,1	3,3	3,2
50	$7,6 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	0,3	0,5	0,4
60	0	$9,0 \times 10^2$	0	0,01	0,005

TABELA 30 - Sobrevivência de conídios da linhagem CHL-1 submetidos ao tratamento com dietilsulfato (DES).

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Total
	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
	repetição	repetição	repetição	repetição	
controle	$8,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	100,0	100,0	100,0
10	$6,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	68,2	80,0	74,1
20	$3,3 \times 10^6$	$7,1 \times 10^5$	37,5	47,3	42,4
30	$1,3 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	14,8	11,3	13,1
40	$7,1 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	0,8	0,9	0,9
50	$4,9 \times 10^2$	$3,7 \times 10^2$	0,006	0,02	0,01
60	0	0	0	0	0

TABELA 31 - Sobrevivência de conídios da linhagem MSE submetidos ao tratamento com 8-metoxipsoraleína associada à luz ultravioleta longa (8-MOP + UVL).

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Total
	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
	repetição	repetição	repetição	repetição	
controle	$7,2 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	100,0	100,0	100,0
30	$1,9 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$	26,4	20,6	23,5
60	$3,8 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	0,05	0,3	0,2
90	$2,6 \times 10^3$	$4,4 \times 10^3$	0,004	0,03	0,02
120	$1,3 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	0,0002	0,002	0,001

TABELA 32 - Sobrevivência de conídios da linhagem *ppy* submetidos ao tratamento com 8-metoxipsoraleína associada à luz ultravioleta longa (8-MOP + UVL).

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Total
	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
	repetição	repetição	repetição	repetição	
controle	$7,0 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	100,0	100,0	100,0
30	$2,0 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	28,6	16,5	22,6
60	$1,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	0,2	0,5	0,4
90	$8,4 \times 10^4$	$9,4 \times 10^3$	0,1	0,04	0,07
120	$1,6 \times 10^3$	$5,6 \times 10^2$	0,002	0,002	0,002

TABELA 33 - Sobrevivência de conídios da linhagem CHL-13 submetidos ao tratamento com 8-metoxipsoraleína associada à luz ultravioleta longa (8-MOP + UVL).

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Total
	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
	repetição	repetição	repetição	repetição	
controle	$7,2 \times 10^7$	$1,9 \times 10^6$	100,0	100,0	100,0
30	$1,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	1,8	12,1	7,0
60	$7,5 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4$	0,1	2,7	1,4
90	$2,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	0,03	0,6	0,3
120	$1,8 \times 10^3$	$7,5 \times 10^2$	0,003	0,04	0,02

TABELA 34 - Sobrevivência de conídios da linhagem CHL-1 submetidos ao tratamento com 8-metoxipsoraleína associada à luz ultravioleta longa (8-MOP + UVL).

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobreviventes		Total
	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
	repetição	repetição	repetição	repetição	
controle	$7,2 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$	100,0	100,0	100,0
30	$3,3 \times 10^6$	$8,8 \times 10^5$	4,6	1,7	3,2
60	$3,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	0,05	0,03	0,04
90	$2,5 \times 10^3$	$4,4 \times 10^3$	0,003	0,009	0,006
120	$1,6 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	0,0002	0,0006	0,0004

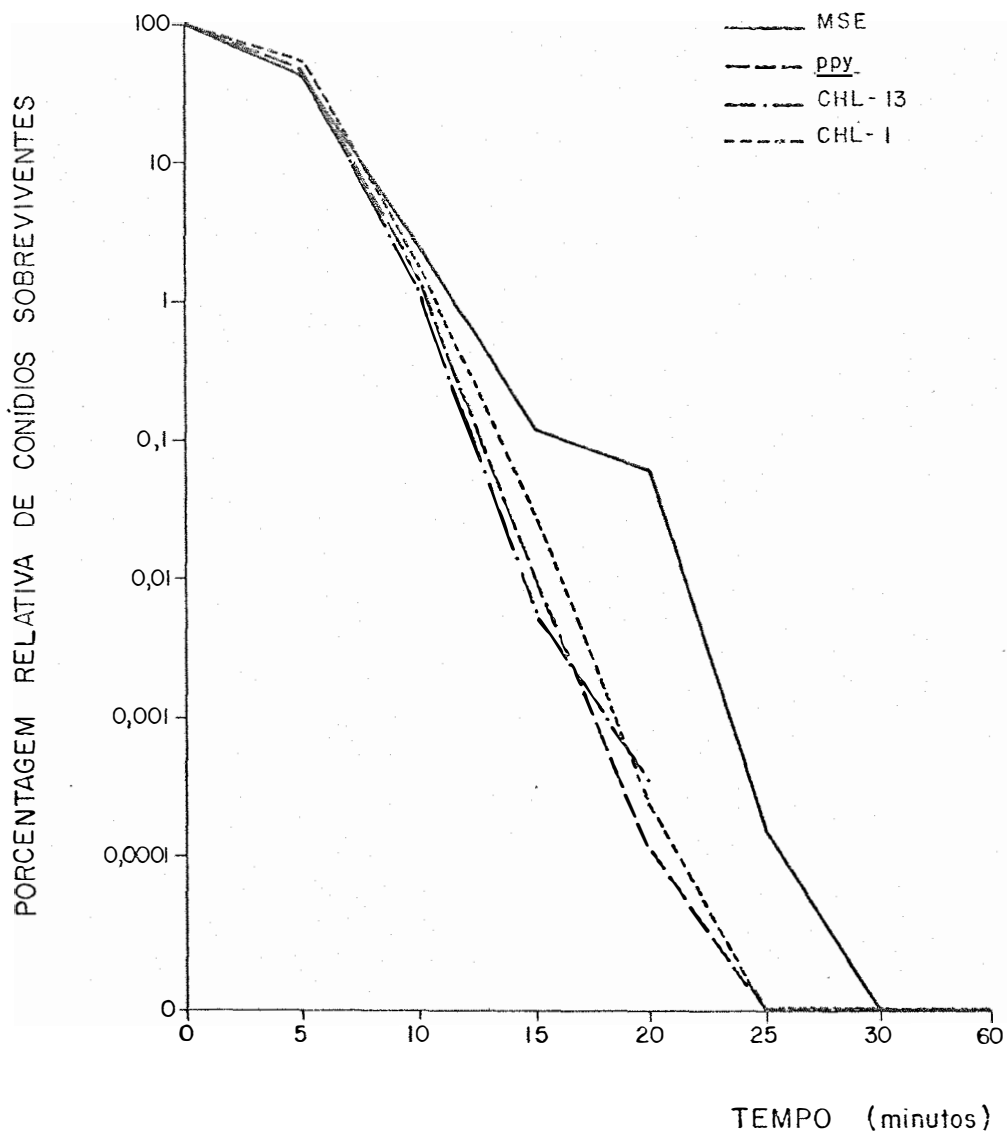


FIGURA 13- Curvas de sobrevivência de conídios das linhagens MSE, ppy, CHL-13 e CHL-1 submetidos ao tratamento com ácido nitroso.

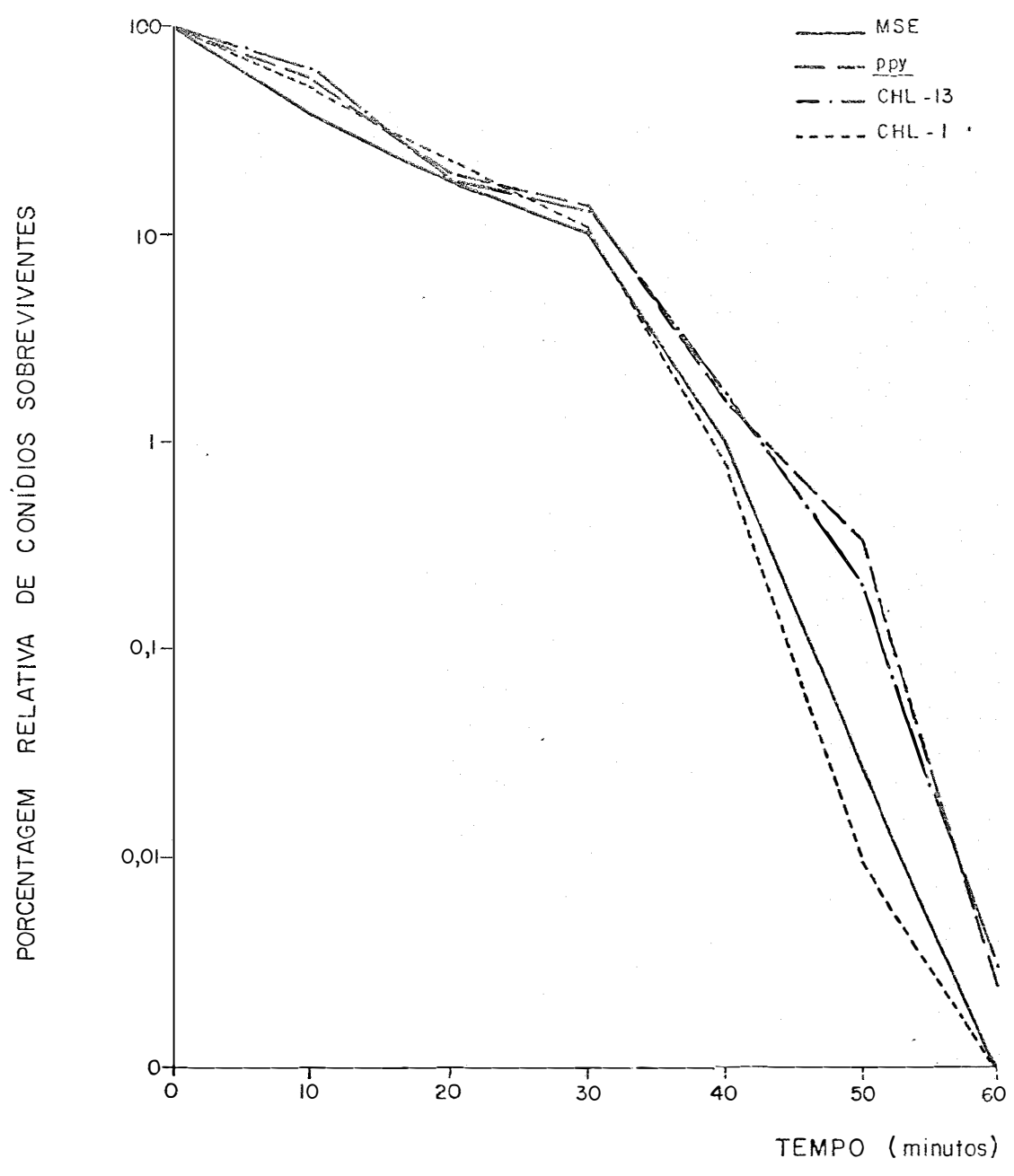


FIGURA 14- Curvas de sobrevivência de conídios das linhagens MSE, ppy, CHL-13 e CHL-1 submetidos ao tratamento com metano-sulfonato de etila (EMS).

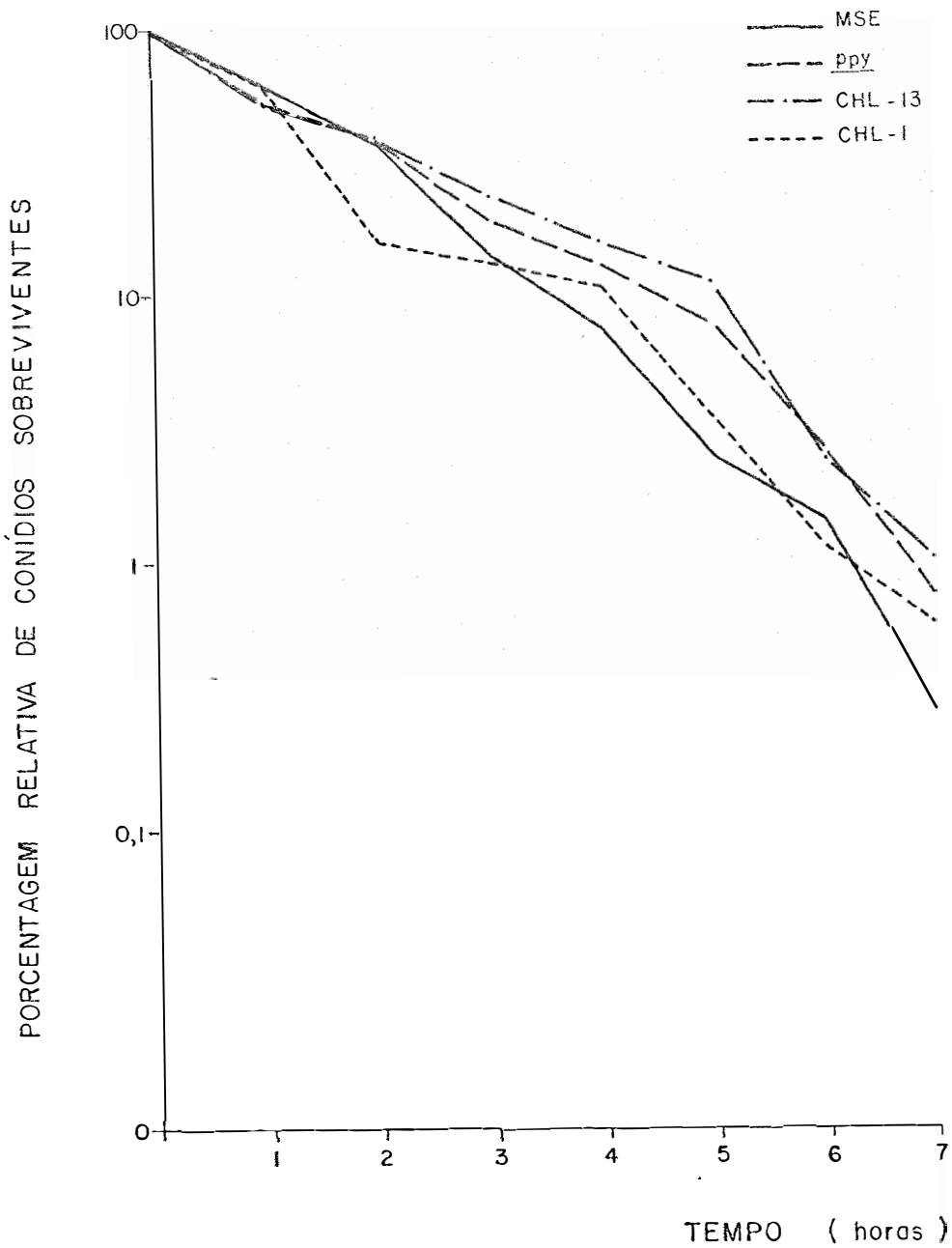


FIGURA 15- Curvas de sobrevivência de conídios das linhagens MSE, ppy, CHL-13 e CHL-1 submetidos ao tratamento com dietilsulfato (DES).

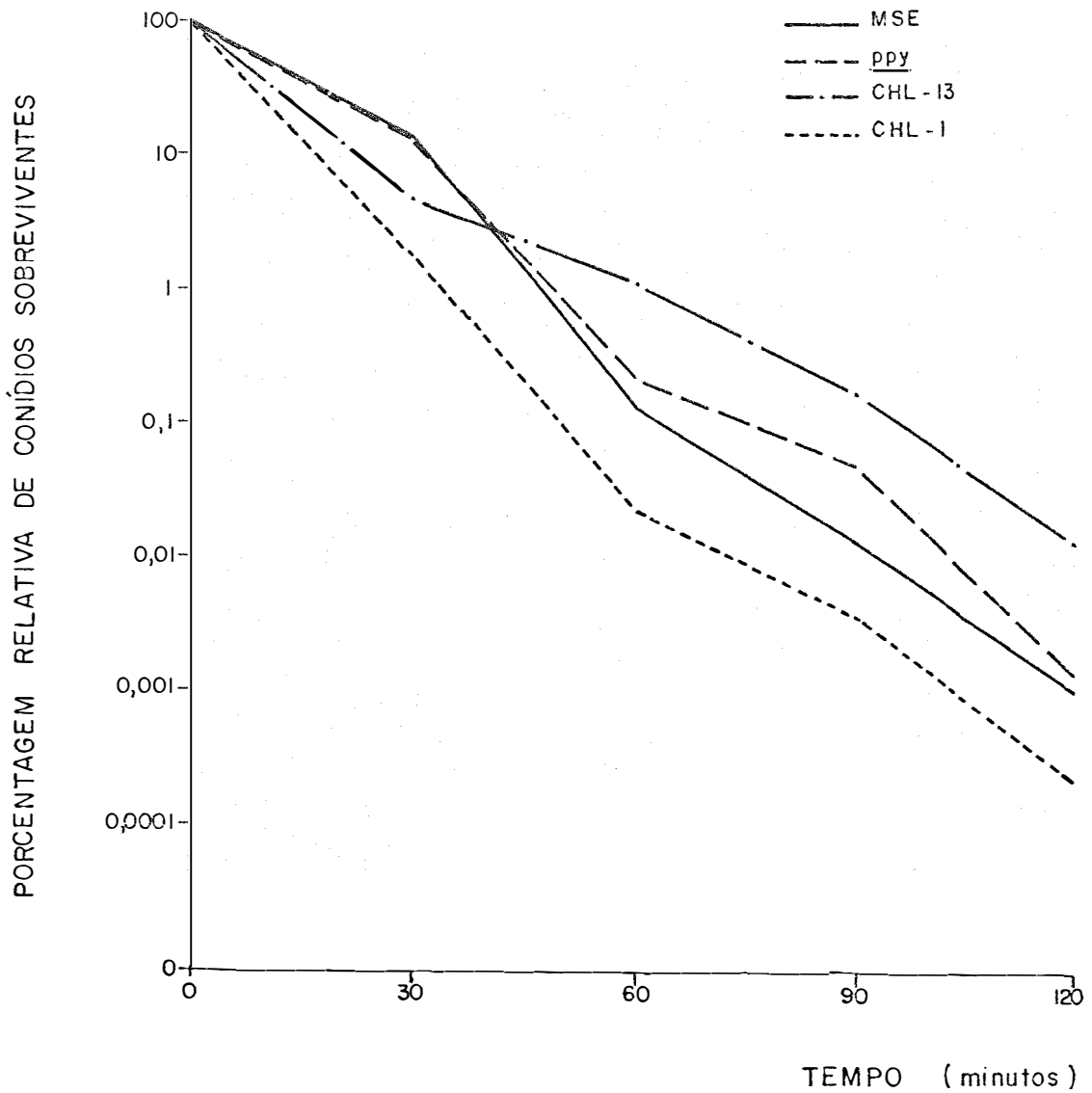


FIGURA 16- Curvas de sobrevivência de conídios das linhagens MSE, *ppy*, CHL-13 e CHL-1 submetidos ao tratamento com 8-metoxipsoralena associada à luz ultravioleta longa (8-MOP + UVL).

5.6.3. Obtenção de mutantes

5.6.3.1. Por meio de colônias monospóricas

Conídios tratados pelo mais longo tempo de ação do mutagênico que ainda permitiu sobrevivência foram semeados em meio completo e, após algumas horas de incubação, quando já começavam a germinar, foram transplantados sob a forma de colônias monospóricas (V. item 4.5.). As colônias das linhagens sensíveis foram transferidas para meio completo acrescido de cloroneb (V. item 4.8.1.) enquanto que as das linhagens resistentes foram levadas para placas contendo apenas meio completo (V. item 4.8.2.). O material de cada linhagem submetido a cada um dos 4 tratamentos mutagênicos foi considerado separadamente.

A Tabela 35 encerra os dados relativos ao registro de setores mutantes nessa fase do experimento.

5.6.3.2. Por sementeira de um grande número de conídios

Conídios das linhagens sensíveis, depois de tratados, foram semeados em placas com meio completo e 1.600 µg/ml de cloroneb. Cada placa recebeu cerca de 10^6 conídios viáveis. Placas-controle com conídios não-tratados foram também providenciadas. Todo o material foi incubado por 20 dias. Dado a elevada concentração do fungicida e a grande quantidade de conídios em competição, estes produziram colônias pontuais que no conjunto constituíram uma crosta irregular dentro de cada placa. Em contraste, as colônias resistentes ao cloroneb apresentaram discreta conidiação. Na linhagem

MSE, em alguns pontos os salpicos da conidiação se confundiram com as minúsculas colônias sensíveis inibidas, tornando difícil quantificar com segurança o número exato de colônias resistentes. Tratando-se da linhagem *ppy* os mutantes resistentes se apresentaram conspícuos devido à pigmentação mais intensa dos seus conídios. Com o escopo de dar maior exatidão à contagem, as placas foram examinadas com o emprego de um estereomicroscópio e os presumíveis resistentes foram purificados e efetivamente ensaiados com respeito ao caráter. Nos casos específicos dos tratamentos com EMS e DES que fizeram aparecer um número elevado de colônias supostamente mutantes, tomou-se aleatoriamente 100 delas em cada tratamento e ensaiou-se. O percentual de indivíduos que responderam positivamente ao teste de resistência permitiu a introdução de um fator de correção que foi aplicado ao número total de colônias "com aspecto de resistente", fornecendo uma estimativa do número das realmente resistentes.

A Tabela 36 sintetiza os resultados destes últimos procedimentos.

TABELA 35 - Frequência de setores mutantes observados em colônias monospóricas das linhagens MSE, *ppy* (sensíveis) e CHL-13, CHL-1 (resistentes). Os conídios que deram origem às colônias haviam sido submetidos aos tratamentos mutagênicos indicados na tabela. Meios de cultura: meio completo para as linhagens resistentes e meio completo acrescido de cloroneb a 200 µg/ml para as sensíveis. Tempo de incubação: 7 dias.

TRATAMENTO/ LINHAGEM					TOTAL DOS 4	
	HNO ₂	EMS	DES	8-MOP	TRATAMENTOS	CONTROLE
MSE	0,1765 (3/17)	0,1875 (3/16)	0,4286 (6/14)	0,4444 *(8/18)	0,3077 (20/65)	0,1765 (3/17)
<i>ppy</i>	0,1429 *(4/28)	0,2500 (5/20)	0,0000 (0/25)	0,0909 *(2/22)	0,1157 (11/95)	0,3333 (6/18)
CHL-13	0,2174 *(5/23)	0,2000 (4/20)	0,2000 (5/25)	0,5000 *(10/20)	0,2727 (24/88)	0,2222 (4/18)
CHL-1	0,1818 (4/22)	0,1905 (4/21)	0,0833 (2/24)	0,0500 (1/20)	0,1264 (11/87)	0,2500 (5/20)

As frações ordinárias indicam o número de setores mutantes detectados (numerador) e o de colônias ensaiadas (denominador).

O símbolo (*) assinala a ocorrência de setores iniciais (que tiveram início no centro geométrico da colônia).

TABELA 36 - Obtenção de colônias resistentes a partir de conídios da linhagem *ppy* tratados com os mutagênicos indicados. Os conídios foram espalhados em grande número em placas de Petri contendo meio completo acrescido de cloroneb a 1.600 µg/ml. Tempo de incubação: 20 dias.

TRATAMENTO MUTAGÊNICO	NÚMERO DE CONÍDIOS VIÁVEIS SEMEADOS	NÚMERO DE COLÔNIAS RESISTENTES OBTIDAS (NCR)	NCR/10 ⁶ CONÍDIOS VIÁVEIS	NCR/NCR (controle)
HNO ₂	1,05 x 10 ⁷	93	8,857	6,7
EMS	1,98 x 10 ⁷	1.074,24*	54,254	40,9
DES	1,10 x 10 ⁷	508,71*	46,246	34,8
8-MOP	1,60 x 10 ⁶	54	33,750	25,5
CONTROLE	0,98 x 10 ⁷	13	1,326	1,0

* Tendo em vista o grande número de colônias presumivelmente resistentes obtidas nestes 2 tratamentos, escolheu-se 100 colônias de cada um para o teste de resistência ao cloroneb. Este forneceu então os resultados de 96% para o tratamento com EMS e 93% para o DES. Estes fatores de correção, multiplicados pelo número de colônias "com aspecto de resistente" em cada caso, deram origem aos valores constantes na tabela.

6. DISCUSSÃO

6.1. Obtenção de mutantes espontâneos

O número apreciável de setores resistentes con seguidos por meio da estratégia de se fazer uma colônia sensí vel desenvolver-se em meio de cultura contendo uma dose par- cialmente inibitória de cloroneb evidenciou a eficiência do método. Tal procedimento já havia sido efetuado e recomendado por AZEVEDO e col. (1977) sendo repetido com sucesso por ROS- SI (1979) e GROSSI (1980).

A utilização no presente trabalho de colônias originárias de um único confídio permitiu maior homogeneização do material biológico de onde emergiram os setores. Seguramen- te esse detalhe concorreu para conferir maior fidedignidade aos resultados desde que as inoculações-por-ponto depositam um número variável de confídios sobre o novo meio de cultura e, nesta situação, poder-se-ia questionar a homogeneidade genéti ca da colônia que se desenvolve a partir da picada.

As dosagens de cloroneb de 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$ de meio de cultura, usadas aqui para a obtenção de setores resis tentes, demonstraram ser das mais adequadas para tal finalida- de. Conforme pode ser visto na Tabela 2, as linhagens sensí-

veis expostas a essas concentrações do fungicida crescem entre 12 e 20% do que o fazem na ausência da droga. Em compensação, 3 das linhagens resistentes, dado o fenômeno da semidependência, atingiram o desenvolvimento máximo ao nível de 100 µg/ml enquanto que as outras 3 que o fizeram sob outras concentrações, ao menos responderam favoravelmente a essa dose, acusando um efeito positivo da mesma sobre o crescimento das suas colônias. Esse conjunto de informações parece sugerir que efetivamente os melhores resultados devem ser conseguidos com a concentração de cloroneb na faixa de 100 a 200 µg/ml. A propósito, ROSSI (1979) que ensaiou a linhagem *ppy* em 8 concentrações bem escalonadas entre zero e 2.869,0 µg/ml obteve as mais elevadas freqüências de setores resistentes ao cloroneb nos níveis de 103,5 e 205,9 µg/ml que, aproximadamente, correspondem aos extremos do intervalo que estamos indicando.

As freqüências de setores mutantes obtidos espontaneamente (controles da Tabela 35) demonstram que não há diferenças marcantes entre as 4 linhagens ensaiadas. Apesar dessas linhagens diferirem amplamente quanto a aspectos morfológicos e necessidades nutricionais, o fenômeno da produção de setores resistentes (ou sensíveis) ao cloroneb não foi quantitativamente afetado. Saliente-se ainda em face da mesma tabela que o surgimento de setores resistentes a partir de colônias sensíveis e de setores sensíveis a partir de colônias resistentes aconteceu segundo freqüências razoavelmente próximas.

6.2. Caracterização dos mutantes

6.2.1. Resistentes

As curvas de dose-resposta encontradas nas Figuras 5 a 10 mostram que cada mutante tem praticamente um perfil próprio de variação de crescimento no intervalo de zero a 3.200 µg/ml. Igualmente, a caracterização de cada diplóide e das linhagens que deram origem a cada um deles revelou largas variações nas relações de dominância-recessividade. Assim, com algumas reservas, pode-se admitir que a mutação *Chl*₂₀ se revelou dominante (Figura 9), a *Chl*₁₆, semidominante (Figura 5) e a *chl*₁₉, recessiva (Figura 8). Já o gene *Chl*₁₈ (Figura 7) demonstrou dominância com uma ligeira tendência, talvez, para sobredominância. Tendência semelhante apareceu bem mais acentuada nas curvas do mutante CHL-17 e seu correspondente diplóide (Figura 6). A mutação *Chl*₂₁ evidenciou um comportamento peculiar: ensaiada nas doses mais baixas ela poderia ser tida como sobredominante; no intervalo entre 400 e 1.600 µg/ml as curvas sugerem dominância e começam a dar idéia de recessividade nas suas porções finais (Figura 10).

A técnica da comparação das curvas de dose-resposta tem sido adotada como a mais plausível para o estabelecimento das relações alélicas nos casos de resistência a agentes inibidores (DEKKER, 1976, 1977; TUYL, 1977). Parece entre tanto que quando as linhagens resistem a uma ampla variação de concentrações da droga sem sofrer inibição completa, conforme aconteceu nos casos aqui discutidos, torna-se possível a ocorrência de alternâncias peculiares no traçado das curvas. Acrescente-se ainda o fenômeno da dependência parcial que fez com que houvesse ganho de crescimento até o nível de 400 µg/ml em algumas linhagens. Todos esses efeitos tornam te

merária qualquer tentativa de interpretação definitiva a respeito das relações alélicas que envolvem mutações de comportamento informal como foi o caso da *Chl*₂₁. Contudo, como nas situações práticas há mais interesse sobre as respostas dadas às concentrações mais baixas do inibidor, seria mais recomendável ater-se aos resultados correspondentes às doses de até 200 ou 400 µg/ml para se obter uma interpretação de valor operacional.

O mutante CHL-21 apresentou adicionalmente a particularidade de se constituir na linhagem de pior crescimento e ao mesmo tempo na de mais alto grau de resistência. Ocorrência deste tipo já tinha sido discutida em bases teóricas por BERGAMIN e col. (1975) os quais admitiam que uma mutação que traz resistência juntamente com redução de crescimento deve afetar algum processo muito importante para o metabolismo do microrganismo. E, assim sendo, a magnitude da resistência conferida tenderia a ser proporcional à redução do desenvolvimento. Por esta via, quanto mais resistente se tornasse uma linhagem mais desadaptada ela tenderia a ficar, prognóstico que foi verificado no CHL-21.

As Figuras 5 a 10 demonstram também que todos os resistentes são, em graus variáveis, parcialmente dependentes do fungicida. O CHL-18, o CHL-19 e o CHL-21 atingiram o desenvolvimento máximo com a dose de 100 µg/ml; o CHL-17 o fez na dose de 200 µg/ml e o CHL-16 juntamente com o CHL-20 necessitaram 400 µg de cloroneb por ml de meio de cultura para alcançar o maior diâmetro médio. Note-se que esta última concentração reduziu cerca de 10 vezes o crescimento das linhagens sensíveis. Este fenômeno da semidependência em linhagens de *A. nidulans* resistentes ao cloroneb já foi apontado por AZEVEDO e col. (1977) e ROSSI (1979) enquanto que TUYL (1977) não verificou essa propriedade em nenhum dos resistentes que estudou.

A semidependência parece estar diretamente associada com a resistência, uma vez que quando esta é perdida por reversão a linhagem sensível que então surge não exibe mais nenhum sinal de dependência. Esta observação foi relatada com bastante ênfase por ROSSI (1979) e GROSSI (1980). No presente trabalho, na única linhagem que permitiu um estudo dessa natureza, a CHL-13(Chl₂^S), a observação foi confirmada, conforme pode-se verificar na Tabela 12.

Já foi suposto que a molécula tóxica para um indivíduo sensível passa a assumir o papel de metabólito quando esse sensível sofre mutação para a resistência-dependência (LUKENS, 1971; AZEVEDO e col., 1977).

Os valores determinados para o parâmetro ED₅₀ (Tabela 3) se prestaram muito bem para discriminar as linhagens sensíveis das resistentes e também para mostrar que estas se distinguem entre si de acordo com diferentes graus de resistência. Seguramente é possível destacar 3 faixas de resistência em função do ED₅₀: uma inferior, em torno de 1.000 µg/ml onde se situaria o mutante CHL-18; outra, por volta de 1.700 µg/ml onde se poderia caracterizar o nível intermediário com as linhagens CHL-16, CHL-17, CHL-19 e CHL-20; o nível mais alto de resistência estaria associado ao valor-base de 2.500 µg/ml e incluiria a CHL-21. A pesquisa de TUYL (1977) apurou um valor próximo a 1.500 µg/ml para 3 resistentes ensaiados e ROSSI (1979) encontrou 4 níveis, centrados nos valores 500, 1.500, 2.000 e 3.000 µg/ml. Todos estes dados tomados englobadamente põem em evidência a variabilidade do fenótipo resistência ao cloroneb em *A. nidulans*.

Toda a gama de variação em face do cloroneb, verificada no comportamento dos resistentes aqui discutidos (desde que se aceite a hipótese de um único loco relacionado com a resistência a esse fungicida) sugere a possibilidade da existência de sítios diferentes dentro do loco. Uma investiga

ção que poderia trazer resultados elucidativos consistiria basicamente em se provocar cruzamentos entre mutantes distintos e então examinar possíveis efeitos intercistrônicos em diplóides ou segregantes meióticos.

6.2.2. Sensíveis

A ocorrência de mutação para a sensibilidade no seu grau mais baixo demonstrou ser um evento de difícil obtenção nas condições deste experimento desde que uma única linhagem efetivamente sensível foi conseguida a partir de 86 colônias resistentes.

Fato interessante foi a variação nos graus de dependência e resistência sem a eliminação desta em 4 das 5 linhagens caracterizadas. Cada uma delas revelou aspectos próprios, que podem ser examinados no item 5.4. e nas Figuras 11 e 12 e que dão a dimensão da complexidade do fenômeno.

Fatores de efeitos genéticos parciais devem estar subjacentes às manifestações observadas. A existência de genes modificadores é bastante plausível e se constitui num aspecto que merece ser melhor estudado. O cruzamento de duas linhagens, cada uma delas encerrando um tipo de "resistência alterada" poderá trazer subsídios para uma investigação mais acurada. Influências citoplasmáticas também podem ser cogitadas assim como supressores parciais e aberrações cromossômicas.

A análise dos revertentes obtidos por ROSSI (1979) acusou a ocorrência de reversão verdadeira em uma linhagem e gene supressor em outra. Houve também um revertente instável que despertou suspeitas de duplicação cromossômica. Estas informações evidenciam que o fenômeno da reversão pode tomar caminhos diferentes e que portanto as discrepâncias en-

contradas entre os mutantes caracterizados na presente investigação devem ser encaradas como fenômeno normal, considerada a grande variabilidade de processos que podem aqui intervir.

6.3. Análise genética

6.3.1. Dos mutantes resistentes

Como procedimento preliminar o teste do heterocáριο descrito no item 5.3.1. eliminou qualquer hipótese de herança extracromossômica.

Depois de ter sido verificado tratar-se de um único gene em cada caso (item 5.3.2.), a análise mitótica atribuiu todas as 6 mutações ao grupo de ligação III (item 5.3.3.) e a análise meiótica (item 5.3.4.) permitiu mapear cada um dos genes *Chl* a uma distância próxima de 34 unidades de mapa do marcador *galA*₁. A sugestiva hipótese de alelismo entre as 6 mutações foi praticamente comprovada através do teste de alelismo relatado no item 5.3.5. O conjunto destas verificações colocaram os achados deste trabalho, neste particular, em concordância com os de ROSSI (1979) e GROSSI (1980) e muito provavelmente com os de TUYL (1977) e THRELFALL (1968). Este último mapeou uma mutação para a resistência ao pentacloronitrobenzeno (*pcnbA*) a 17 unidades do loco *galA*₁ e 15 unidades de mapa do loco *argB* enquanto que TUYL (1977) localizou a mutação para resistência ao cloroneb a 35 unidades do loco *phenA*₂ e aventou a hipótese de alelismo entre as mutações mapeadas por ele e por Threlfall, tendo em vista que a seqüência dos locos no grupo de ligação III deve ser: *phenA*₂, *galA*₁, *chlA-pcnbA*, *argB*.

A hipótese de TUYL (1977) de que um único loco

no grupo de ligação III deveria estar relacionado com a resistência ao cloroneb em *A. nidulans* ficou consolidada mais ainda com os resultados dos mapeamentos levados a efeito aqui neste trabalho. Entretanto há na literatura uma informação em conflito com a tendência geral. Trata-se da mutação da linhagem CHL-1 que foi localizada por AZEVEDO e col. (1977) no grupo de ligação IV, sem ligação genética com o marcador *pyroA₄*. No presente trabalho a análise genética das 3 linhagens da série CHL-1(Chl^S), derivadas da CHL-1, indicou o grupo de ligação III (item 5.4.), fato que colocou definitivamente em dúvida a presença do gene *Chl₁* no grupo IV. Com a finalidade de esclarecer essa incongruência foi provocado o cruzamento entre as linhagens CHL-1 e CHL-13 e o teste de alelismo descrito no item 5.5. deixou patente que as duas mutações devem ser alélicas. É possível que o equívoco de AZEVEDO e col. (1977) tenha se dado porque estes autores tomaram para os procedimentos de análise genética uma subcultura da linhagem CHL-1 que continha uma translocação envolvendo os grupos de ligação III e IV. Nesta hipótese, o fragmento cromossômico transferido teria sofrido ruptura entre os locos *galA₁* e *Chl₁* e se inserido no cromossomo correspondente ao grupo de ligação IV, estabelecendo dessa forma uma peça contendo os genes *Chl₁* e *pyroA₄*. Os autores não mencionam a aplicação de análise meiótica com vistas a detectar ligação entre *galA₁* e *Chl₁*. Se esta possibilidade não foi averiguada é possível até que o segmento translocado contivesse esses 2 marcadores geneticamente ligados mas o fato não foi descoberto porque a análise foi dirigida no sentido do marcador *pyroA₄* desde que o gene *Chl₁* havia sido associado ao grupo de ligação IV na análise mitótica. Translocação constitui-se num evento relativamente frequente em *A. nidulans* (SOUZA, 1979) prova é que dentre as 10 linhagens analisadas na presente investigação descobriu-se uma translocação III/VIII (V. item 5.4.) mesmo não sendo este o objetivo daquele procedimento.

6.3.2. Dos mutantes sensíveis

Os 4 "resistentes alterados", $CHL-1(CH1_1^S)$, $CHL-1(CH1_2^S)$, $CHL-1(CH1_3^S)$ e $CHL-1_3(CH1_1^S)$, desde que ainda mantiveram o caráter resistência, foram submetidos à análise genética revelando as mesmas mutações dos resistentes iniciais (Tabela 17). Esta observação sugere duas hipóteses alternativas: ou o loco em apreço permaneceu intacto e sendo assim as diferenças individuais entre as 4 linhagens são devidas a influências alheias a esse loco ou então ele comporta alguns sítios distintos, conforme já foi cogitado quando se discutiu as mutações para a resistência.

6.4. Tratamentos mutagênicos

A sobrevivência de conídios submetidos a cada um dos tratamentos mutagênicos (Tabelas 19 a 34 e Figuras 13 a 16) mostrou-se, em linhas gerais, compatível com os resultados de ROSATO (1973), PIZZIRANI (1977), OLIVEIRA (1978) e ROSATO e AZEVEDO (1978) para o EMS, DUARTE (1968) com referência ao DES, PIZZIRANI (1977) a respeito do ácido nitroso e BIAGI (1977) para o 8-MOP + UVL.

Apesar de todos esses autores nem sempre terem trabalhado com as mesmas linhagens ensaiadas nesta pesquisa, o conjunto dos resultados (incluindo-se aqueles aqui obtidos) permite concluir que não há diferenças marcantes entre as sobrevivências de conídios. Levando-se em conta que os autores supracitados utilizaram, além de linhagens convencionais dotadas de alguns marcadores genéticos, variantes deteriorados e portadores de aberrações cromossômicas tanto numéricas como estruturais, fica evidente que qualquer um dos 4 tratamentos mutagênicos pode ser aplicado, conforme os respec

tivos protocolos aqui relatados, às mais diferentes linhagens de *A. nidulans*.

De especial interesse são os dados dos tempos mais longos de aplicação de cada mutagênico desde que aí vão se encontrar os sobreviventes mais demoradamente expostos ao tratamento. No experimento com o ácido nitroso observa-se (Tabelas 19 a 22 e Figura 13) um efeito avassalador da droga sobre a sobrevivência de conídios de todas as linhagens durante os primeiros 20 minutos de tratamento. Em consequência, a porcentagem de sobreviventes aos 25 minutos apresentou-se insignificante e, nas duas últimas interrupções (30 e 60 minutos) a mortalidade foi da ordem de 100%. PIZZIRANI (1977) encontrou comportamento semelhante quando aplicou o tratamento a duas linhagens haplóides (MSE e *biA₁*; *methG₁*) e uma diplóide (*biA₁//MSE*). Somente nas duas últimas linhagens a autora detectou sobrevivência além dos 25 minutos. Contudo as porcentagens de sobrevivência foram em geral da ordem de poucos centésimos, o que inutiliza o material obtido nestas condições para a maioria dos propósitos práticos.

Em face dessas considerações pode-se recomendar para experimentos futuros que venham a envolver as linhagens aqui discutidas que o procedimento seja simplificado, cancelando-se as aplicações de 30 e 60 minutos.

O tratamento com EMS sofreu aqui duas modificações em relação aos protocolos de ROSATO (1973), PIZZIRANI (1977) e OLIVEIRA (1978): as interrupções do tratamento foram escalonadas de hora em hora ao invés de acontecer de duas em duas horas e a aplicação estendeu-se até a 7^a hora, ao contrário dos experimentos dessas autoras que demoraram 6 horas. Com a primeira alteração procurou-se caracterizar melhor as curvas de sobrevivência, na expectativa de poder detectar diferenças entre as linhagens e ao mesmo tempo provocar homogeneizações com mais frequência no sistema, já que a cada inter

rupção do tratamento o tubo era submetido a agitação mecânica. A segunda alteração visou a obtenção de conídios sobreviventes em quantidades mais apropriadas para as semeaduras posteriores e ainda com a vantagem de haverem permanecido expostos ao mutagênico por um período de tempo mais longo. Com efeito, as autoras citadas neste parágrafo obtiveram, ao final de 6 horas, entre 2 e 10% de sobrevivência enquanto que neste trabalho, após 7 horas de tratamento, verificou-se porcentagens de sobrevivência compreendidas entre 0,5 e 1,2%. (Tabelas 23, 24, 25 e 26 e Figura 14).

Os resultados dos tratamentos com o DES estão sumarizados nas Tabelas 27 a 30 e Figura 15. O planejamento de 60 minutos de aplicação com interrupções a cada 10 minutos foi inspirado por um experimento-piloto e se ajustou bem para caracterizar o traçado das curvas de sobrevivência. DUARTE (1968) procurou induzir reversões no gene *methG₁* aplicando o mutagênico na mesma dosagem empregada aqui (0,05 M) durante períodos fixos de 20 ou 30 minutos. Nestas condições registrou sobrevivências da ordem de 27 a 31% quando tratou por 20 minutos e 17% no tempo de 30 minutos. Estes valores são sensivelmente compatíveis com os auferidos na presente investigação nos tempos assinalados. As mesmas tabelas mostram ainda que depois de 50 minutos a sobrevivência é desprezível, fato que sugere que o procedimento pode ser simplificado, reduzindo-se o tempo máximo para 50 e, preferivelmente, 40 minutos. Nesta última duração de tratamento verificou-se porcentagens de sobrevivência entre 0,9 e 3,2%, valores razoáveis para facilitar os passos subseqüentes do trabalho.

Os tratamentos com 8-MOP associada à luz ultra violeta longa têm seus resultados sintetizados nas Tabelas 31 a 34 e Figura 16. BIAGI (1977) aplicou esse tratamento a conídios da linhagem MSE e de uma linhagem diplóide (*b₁A₁//MSE*). Após a sensibilização pela 8-MOP expôs o material à luz UVL

pelo tempo de 120 minutos, obtendo, respectivamente, 0,07 e 1,48% de conídios sobreviventes. Para o mesmo período de irradiação os resultados do presente trabalho se mostraram inferiores à porcentagem de sobrevivência estimada pela autora para a linhagem MSE. Entretanto, como os valores foram extremamente baixos, atingindo a ordem de grandeza de centésimo e até milésimo, não se pode cogitar aqui se as diferenças são relevantes ou não. Como no experimento de Biagi não foram elaboradas curvas de sobrevivência não é possível, neste particular, estabelecer uma melhor comparação entre o seu experimento e o nosso. Considerando-se as linhagens aqui ensaiadas, acreditamos que um tempo de tratamento entre 30 e 60 minutos seria recomendável para a indução de mutações. Observe-se que nesse intervalo as porcentagens de sobrevivência exibiram uma larga variação dentro e entre linhagens, fato que torna difícil o estabelecimento de um tempo-padrão adequado para todas elas.

Visando-se efeitos aplicados pode-se tomar material tratado por um tempo relativamente curto, tendo em vista que MATHEWS (1963), IGALI e col. (1970), SCOTT e ALDERSON (1971), TOWSENDO e col. (1971) e JOSEPH e col. (1974) comprovaram que o tratamento com 8-MOP + UVL produz alta freqüência de mutantes mesmo sob condições moderadas de mortalidade.

Examinando-se as curvas de sobrevivência das 4 linhagens ao longo dos 4 tratamentos mutagênicos (Figuras 13, 14, 15 e 16) verifica-se que elas se comportaram de maneira muito semelhante quanto ao aspecto mortalidade. Uma diferença embora questionável poderia ser atribuída à linhagem CHL-1 que evidenciou respostas ligeiramente mais pronunciadas aos efeitos letais dos mutagênicos EMS, DES e 8-MOP + UVL. A julgar como significativas essas diferenças poder-se-ia imaginar que a linhagem CHL-1 fosse dotada de uma maior permeabilidade às substâncias mutagênicas, conforme ponderou PIZZIRANI

(1977) em situação semelhante. Poderia também existir uma menor proteção do DNA dessa linhagem contra a radiação ultravioleta devido a um poder de barreira reduzido por parte de seus pigmentos, conforme é largamente discutido com respeito às aplicações de UV em fungos (D'ARCE, 1972; PIZZIRANI, 1977).

Pretendemos que os dados aqui obtidos sejam de utilidade para futuras investigações envolvendo indução de mutações, não só para a resistência mas também outras categorias de mutação. Para tanto se procurou estabelecer em todos os casos as doses ideais do mutagênico.

A Tabela 35 assinala as frequências de setores produzidos por colônias monospóricas de cada uma das 4 linhagens submetidas a cada um dos 4 tratamentos mutagênicos. Utilizou-se, em cada caso, conídios expostos ao mais longo tempo de tratamento que ainda permitiu a sobrevivência, objetivando-se sujeitar os indivíduos à ação mais demorada possível dos mutagênicos. Os dados constantes nessa tabela permitem concluir que aparentemente não houve efeito persistente dos tratamentos em nenhum caso. Ao mesmo tempo pode-se verificar que o surgimento de mutantes, tanto resistentes como sensíveis, se deu segundo frequências muito próximas.

Uma descoberta interessante nesses resultados foi a ocorrência de setores iniciais (que começam próximo ao centro da colônia, indicando que a mutação se deu numa das primeiras divisões mitóticas do conídio primordial). Poder-se-ia supor que tal acontecimento fosse decorrência do efeito do mutagênico sobre o conídio que se desenvolveu para dar origem à colônia. O fenômeno torna-se mais intrigante quando se percebe que somente 2 dentre os tratamentos (ácido nitroso e 8-MOP) e 3 linhagens (MSE, *ppy* e CHL-13) produziram tal tipo de setor e, principalmente, que nenhum setor foi registrado nos controles. Saliente-se ainda que nos resultados em discussão são os 2 agentes alquilantes (EMS e DES) e também a linhagem

que apresentou maior letalidade em decorrência dos tratamentos (CHL-₁) não deram origem a setores iniciais.

Parece que esses setores iniciais representam um assunto sugestivo para posteriores investigações que deverão também envolver o estudo do mecanismo de ação de cada mutagênico.

Futuramente ao se investigar o poder mutagênico de alguma droga que não seja instável, ao invés de aplicar o método do tratamento de conídios em suspensão poder-se-á predeterminar a dose adequada e acrescentá-la ao meio de cultura. Irá então se contar com a vantagem de se ter a substância ensaiada, permanentemente em contato com a cultura em desenvolvimento, em situação similar à que se verifica em ambientes naturais.

Os setores resistentes obtidos nesta etapa não foram submetidos a exames genéticos. TUYL (1977) não registrou diferenças entre resistentes obtidos espontaneamente e induzidos por UV. Apesar disso seria interessante que se comparasse as características genéticas das mutações provocadas por diferentes mutagênicos ou acontecidas naturalmente.

A técnica da semeadura de grande quantidade de conídios em meio de cultura contendo doses inibitórias da substância antifúngica tem sido utilizada quase que como regra geral para o isolamento de mutantes resistentes (HOLLSTEIN e col., 1979). A descoberta no presente experimento de que sob a concentração de 1.000 µg de cloroneb por ml de meio de cultura as colônias resistentes derivadas da linhagem *ppy* apresentam conidiação amplamente contrastante com a das colônias sensíveis, permite idealizar mais um método para a estimativa da potencialidade de agentes mutagênicos.

A Tabela 36, elaborada com dados auferidos

através do método sugerido no parágrafo anterior, possibilita um claro exame dos efeitos dos diferentes tratamentos sobre o aparecimento de mutantes resistentes ao cloroneb.

Em face dos valores expressos na mesma tabela pode-se estabelecer níveis distintos de eficiência mutagênica, nas condições do experimento: o ácido nitroso seria o tratamento menos efetivo, seguindo-se o 8-MOP com um poder nitidamente maior, aparecendo a seguir o DES e o EMS que seriam os mais poderosos.

Dado a simplicidade da execução e a fidedignidade dos resultados, insistimos em que o sistema "*ppy* - resistência ao cloroneb em *A. nidulans*" é dos mais recomendáveis para a mensuração do poder mutagênico de agentes físicos ou químicos em microrganismos.

6.5. Aspectos a destacar no fenômeno resistência-ao-cloroneb

As investigações envolvendo o caráter resistência-ao-cloroneb possibilitam uma série de estudos genéticos de grande interesse, tais como relações de dominância-recessividade, mutagenicidade, mapeamento, pleiotropia, efeitos de dosagem gênica, supressão gênica, conseqüências de aberrações cromossômicas etc.

É bastante plausível que o fenômeno da reaquisição da sensibilidade à droga, tendo-se em vista as suas peculiaridades, venha abrir muitas perspectivas para investigações futuras, tanto no terreno acadêmico quanto no aplicado.

Lembrando-se os surtos de resistência a antibióticos e inseticidas (GEORGOPOULOS e ZARACOVITIS, 1967) e a preocupação de TOLEDO (1974) quanto a uma possível repetição do fato na área dos fungicidas, o sistema *resistência-ao-clo-*

cloroneb-em-A.nidulans representa um bom modelo para se vislumbrar o que pode estar acontecendo em relação aos fungicidas sistêmicos.

O procedimento de semear-se um grande número de conídios em meio acrescido de cloroneb para se obter resistentes ao fungicida e, até mesmo o método da obtenção de setos em colônias monospóricas, desde que se introduza nele alguns aperfeiçoamentos, poderão perfeitamente ser utilizados com a finalidade de se detectar presumíveis ações mutagênicas em substâncias suspeitas.

O mesmo sistema poderia ainda servir como instrumento para a averiguação de mutações diretas e reversas. Para tanto seria necessário estabelecer uma dose crítica de cloroneb a ser adicionada ao meio de cultura e que viesse viabilizar a distinção visual dos revertentes sensíveis.

Podemos aqui destacar 4 sistemas clássicos que utilizam *A. nidulans* para a sondagem da capacidade de indução de mutações por parte de um dado fator:

- a) mutagenicidade no loco *methG₁* (SIDDIQI, 1962; LILLY, 1965);
- b) resistência ao fluoroacetato associada com a incapacidade em metabolizar acetato (APIRION, 1962, 1965);
- c) deficiência quanto à xantina desidrogenase, possibilitando a seleção visual dos mutantes em meio de cultura acrescido de 2-tio-xantina (DARLINGTON e SCAZZOCCHIO, 1967);
- d) resistência à arginina associada com deficiência na síntese de lisina (OLIVEIRA,

1978).

O sistema que ora discutimos, conforme já foi sugerido por AZEVEDO e col. (1977), ROSSI (1979) e GROSSI (1980), pode ser colocado ao lado desses outros como uma nova opção.

7. CONCLUSÕES

a) O método baseado na produção de setores mutantes por parte de colônias monospóricas mostrou-se eficiente tanto para a obtenção de linhagens resistentes como de sensíveis ao cloroneb. Todos os mutantes resistentes aqui caracterizados mostraram ser também parcialmente dependentes de cloroneb, sugerindo que esses dois fenômenos são estreitamente associados. Por sua vez, a obtenção de revertentes para a sensibilidade mostrou tratar-se de uma ocorrência muito mais rara e complexa do que a mutação direta.

b) A análise genética evidenciou que um único loco no grupo de ligação III é responsável pelo caráter resistência ao cloroneb. No entanto, cada mutante demonstrou um perfil próprio de resistência e dependência em face de doses crescentes do fungicida, sugerindo que sítios distintos dentro do loco tenham sofrido mutação.

c) Com relação aos tratamentos com os mutagênicos, as quatro linhagens ensaiadas apresentaram praticamente a mesma taxa de mortalidade em relação a cada um deles e, nenhum dos tratamentos revelou efeito residual na produção de setores mutantes por parte de colônias monospóricas das linha

gens sensíveis ou resistentes.

d) A semeadura de um grande número de conídios da linhagem *ppy*, na casa de 10^7 , em meio de cultura contendo cloroneb a 1.000 $\mu\text{g/ml}$ permite fácil discriminação das colônias resistentes ao fungicida pois os conídios destas se apresentam mais refringentes nessas condições, contrastando francamente com as colônias sensíveis e tal método é então indicado para a averiguação e até mensuração de propriedades mutagênicas de qualquer tipo de substância-problema.

e) O fenômeno da resistência ao cloroneb em *A. nidulans* se presta muito bem para estudos de genética formal tais como: relações de dominância-recessividade, mutagenicidade, mapeamento, pleiotropia, efeitos de dosagem gênica, supressão gênica etc. Dado algumas dessas propriedades, uma substância, suspeita de ser mutagênica e que possa ser adicionada ao meio de cultura, provavelmente possa ser ensaiada através da verificação da frequência de setores resistentes que emergirem de colônias monospóricas sensíveis que estiverem crescendo em meio de cultura contendo cloroneb e a própria substância sob investigação.

8. SUMMARY

The present research was carried out aiming the genetic study of resistance to the fungicide chloroneb (1,4-dichloro-2,5-dimethoxybenzene) in *Aspergillus nidulans*.

Six chloroneb-resistant mutants, spontaneously obtained from non-resistant strains, were characterized in relation to growth ability in increasing fungicide concentrations. It was shown that all were partially-dependent to chloroneb, requiring the drug for maximum growth. Diploids constructed between resistant and non-resistant strains have shown that the mutation for resistance was recessive in one strain, semidominant in another one and dominant in the remaining four strains. In three of these latter strains it was found signals of overdominance.

Genetic analysis have shown that in six mutants resistance was due to a single gene mutation. Mitotic analysis carried out in all mutant strains indicated that the locus responsible for resistance was located in linkage group III and meiotic analysis have shown that this locus is located about 34 units from the *galA₁* gene. Allelic tests indicated that all six mutants belonged to the same locus.

In order to obtain non-resistant mutants from

two chloroneb-resistant strains (CHL-₁ and CHL-₁₃) it was found one strain non-resistant and other three which were still resistant but which have suffered several alterations in the degrees of resistance and/or semidependence.

Two non-resistant and two resistant strains were submitted to four different mutagenic treatments: nitrous acid, ethylmethanesulphonate, diethylsulphate and δ -methoxy psoralen associated with near ultraviolet light. Survival curves were obtained for each strain and treatment and it was then possible to estimate the appropriate doses for further treatments. It was tried the induction of resistant mutants from non-resistant strains and vice-versa. From the frequencies of mutant sectors emerging from monosporic colonies, originated from conidia which were submitted to the mutagenic treatments it was not detected residual effect of any of the mutagens. One non-resistant strain (*proA*₁; *pabaA*₆; *yA*₂) was shown to be the most appropriate in order to quantify the effects of the mutagenic treatments in relation to induction of chloroneb resistance since the mutants in appropriate culture medium can produce conidia which are easily distinguished from the original non-resistant strain. It was suggested a system for the screening of the mutagenic ability of "suspected" substances based on the induction to chloroneb resistance in *A. nidulans*.

9. LITERATURA CITADA

- ALDERSON, T., 1969. Spontaneous and induced reversion of ICR-170-induced xanthine dehydrogenase mutants of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 8:521-529.
- ALDERSON, T. e A. M. CLARK, 1966. Interlocus specificity for chemical mutagens in *Aspergillus nidulans*. *Nature* (Londres), 210:593-595.
- ALDERSON, T. e C. SCAZZOCCHIO, 1967. A system for the study of interlocus specificity for both forward and reverse mutation in at least eight gene loci in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 5:567-577.
- ALDERSON, T. e M. J. HARTLEY, 1969. Specificity for spontaneous and induced forward mutation at several gene loci in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 8:255-264.
- APIRION, D., 1962. A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice versa in micro-organisms. *Nature* (Londres), 195:959-961.
- APIRION, D., 1965. The two-way selection of mutants and revertants in respect of acetate utilization and resistance to fluoroacetate in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 6:317-329.

- ARLETT, C. F., 1966. The influence of the cytoplasm on mutation in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 3:410-419.
- ASHIDA, J., 1965. Adaptation of fungi to metal toxicants. *Annual Review of Phytopathology*, 3:153-174.
- AYLING, P. D., 1969. Methionine suppressors in *Aspergillus nidulans*: their genetics and behaviour in heterocaryous and diploids. *Genetical Research*, 14:275-289.
- AZEVEDO, J. L., 1970. A pleiotrophic effect of lysine mutants of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus Newsletter*, 11:1.
- AZEVEDO, J. L., 1971. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. Inglaterra, University of Sheffield, 240 p. (Tese de Ph. D.).
- AZEVEDO, J. L. e E. P. SANT'ANA, 1975. The use of chloroneb to obtain haploid segregants from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus Newsletter*, 13:6.
- AZEVEDO, J. L., A. OLIVEIRA e A. J. R. CAMPOS, 1976. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. *Summa Phytopathologica*, 2:237-241.
- AZEVEDO, J. L., E. P. SANT'ANA e R. BONATELLI JR., 1977. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 48:163-172.
- BARACHO, I. R., R. VENCOVSKI e J. L. AZEVEDO, 1970. Correlation between size and hybrid or selfed state of the cleistotecia in *Aspergillus nidulans*. *Transaction of the British Mycological Society*, 54(1):109-116.
- BEN-YEPHET, Y., Y. HENIS e A. DINOOR, 1974. Genetic studies on tolerance of carboxin and benomyl at the asexual phase of *Ustilago hordei*. *Phytopathology*, 64:51-56.

- BEN-YEPHET, Y., A. DINOOR e Y. HENIS, 1975. The physiological basis of carboxin sensitivity and tolerance in *Ustilago hordei*. *Phytopathology*, 65:936-942.
- BERGAMIN FILHO, A., H. KIMATI e J. L. AZEVEDO, 1975. O conceito de força de drogas. *Summa Phytopathologica*, 1:31-42.
- BIAGI, C. M. R., 1977. Mutantes morfológicos induzidos por 8-metoxipsoralaina e luz ultravioleta em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 150 p. (Tese de Mestrado).
- BIGNAMI, M., F. AULICINO, A. VELCICH, A. CARERE e G. MORPURGO, 1977a. Mutagenic and recombinogenic action of pesticides in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 46:395-402.
- BIGNAMI, M., G. CARDAMONE, P. COMBA, V. A. ORTALI, G. MORPURGO e A. CARERE, 1977b. Relationship between chemical structure and mutagenic activity in some pesticides: the use of *Salmonella typhimurium* and *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 46:243-244.
- CALVORI, C. e G. MORPURGO, 1966. Analysis of induced mutations in *Aspergillus nidulans*. I. UV- and HNO_2 - induced mutation. *Mutation Research*, 3:145-151.
- CLUTTERBUCK, A. J., 1974. *Aspergillus nidulans*. In : King, R. C. (ed.), *Handbook of Genetics*, Plenum Press, New York, vol. 1:447-510.
- COLE, H., B. TAYLOR e J. DUTCH, 1968. Evidence of differing tolerances to fungicides among isolates of *Sclerotinia homeocarpa*. *Phytopathology*, 58:683-686.
- COLSON, A. M., G. MICHAELIS, E. PRATJE e P. P. SLONIMSKI, 1979. Allelism relationship between diuron-resistant, antimycin-resistant and fumiculosin-resistant loci of the mitochondrial map in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 167(3):299-300.
- CROUZET, M., M. PERROT, M. NOGUEIRA e J. BERGERET, 1978.

- Genetic and biochemical analysis of cycloheximide resistance in the fungus *Podospora anserina*. *Biochem. Genet.*, 16(3/4):271-286.
- D'ARCE, M. M. C. O., 1972. Contribuição ao estudo de aberrações cromossômicas numéricas em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 50 p. (Tese de Mestrado).
- DARLINGTON, A. J. e C. SCAZZOCCHIO, 1967. Use of analogue and the substrate sensitivity of mutants in analogues of purine uptake and breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 93:937-940.
- DASSENOY, B. e J. A. MEYER, 1973. Mutagenic effect of benomyl on *Fusarium oxysporum*. *Mutation Research*, 21:119-120.
- DAVIDSE, L. C., 1973. Antimitotic activity of methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 3:317-319.
- DEKKER, J., 1972. Resistance. In: Marsh R. W. (ed.), *Systemic fungicides*, 1^a edição, Longman, Londres, p. 156-174.
- DEKKER, J., 1976. Acquired resistance to fungicides. *Annual Review Phytopathology*, 14:405-428.
- DEKKER, J., 1977. Resistance. In: Marsh R. W. (ed.), *Systemic fungicides*, 2^a edição, Longman, Londres, p. 176-197.
- DUARTE, F. A. M., 1968. Efeitos mutagênicos de alguns ésteres de ácidos inorgânicos em *Aspergillus nidulans*. Brasília, U. B., 73 p. (Tese de Doutorado).
- DUARTE, F. A. M., 1971. Genetic and allied effects of certain esters of inorganic acids in *Aspergillus nidulans*. *Experientia*, 27:966-967.
- DUARTE, F. A. M., 1972. Efeitos mutagênicos de alguns ésteres de ácidos inorgânicos em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. *Ciência e Cultura* (São Paulo), 24:42-52.

- FORBES, E., 1959. Use of mitotic segregation for assigning genes to linkage groups in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 13:67-80.
- GAJEWSKI, W. e J. LITWINSKA, 1968. Methionine loci and their suppressors in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, 102:210-220.
- GEESON, J. O., 1978. Mutational tolerance to carbendazim in *Botrytis cinerea*. *An. Appl. Biol.*, 90(1):59-64.
- GEORGOPOULOS, S. G., 1962a. Genetic nature of tolerance of *Hypomyces solani* f. *cucurbitae* to penta- and tetra-chloronitrobenzene. *Nature* (Londres), 194:148-149.
- GEORGOPOULOS, S. G., 1962b. Genetic control of tolerance to tetra- and penta-chloronitrobenzene in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. *Nature* (Londres), 196:359-360.
- GEORGOPOULOS, S. G., 1963a. Pathogenicity of chlorinated-nitrobenzene-tolerant strains of *Hypomyces solani* f. *cucurbitae* race 1. *Phytopathology*, 53:1081-1085.
- GEORGOPOULOS, S. G., 1963b. Tolerance to chlorinated nitrobenzenes in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae* and its mode of inheritance. *Phytopathology*, 53:1086-1093.
- GEORGOPOULOS, S. G. e V. E. VOMVOYANNI, 1965. Differential sensitivity of diphenyl-sensitive and diphenyl-tolerant strains of fungi to chlorinated nitrobenzenes and to some diphenyl derivates. *Canadian Journal of Botany*, 43:765-775.
- GEORGOPOULOS, S. G. e N. J. PANOPOULOS, 1966. The relative mutability of the *cnb* loci in *Hypomyces*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 8:347-349.
- GEORGOPOULOS, S. G. e C. ZARACOVITIS, 1967. Tolerance of fungi to organic fungicides. *Annual Review of Phytopathology*, 5:109-130.

- GEORGOPOULOS, S. G., A. KAPPAS e A. C. HASTIE, 1976. Induced sectoring in diploid *Aspergillus nidulans* as a criterion of fungitoxicity by interference with hereditary processes. *Phytopathology*, 66:217-220.
- GILPATRICK, J. D. e D. R. BLOWERS, 1974. Ascospore tolerance to dodine in relation to orchard control of apple scab. *Phytopathology*, 64:649-652.
- GROSSI, C., 1980. Aspectos genéticos da resistência ao cloroneb em uma linhagem mutante de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 140 p. (Tese de Doutorado).
- HARTLEY, M. J., 1970. The frequency of reverse mutation at the XDII loci of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 10:175-183.
- HASTIE, A. C., 1970. Benlate induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature* (Londres), 226:771.
- HASTIE, A. C. e S. G. GEORGOPOULOS, 1971. Mutational resistance to fungitoxic benzimidazole derivatives in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 67:371-373.
- HOCK, W. K., 1968. Studies of the biodegradation and mode of antifungal action of chloroneb (1,4-dichloro-2,5-dimethoxy benzene). University of Maryland, College Park, 47 p. (Tese de Ph. D.).
- HOCK, W. K. e H. D. SISLER, 1969. Specificity and mechanism of antifungal action of chloroneb. *Phytopathology*, 59:627-632.
- HOLLSTEIN, M., J. McCANN, F. A. ANGELOSANTO e W. W. NICHOLS, 1979. Short-term tests for carcinogens and mutagens. *Mutation Research*, 65:133-226.
- IGALI, S., B. A. BRIDGES, M. J. ASHWOOD-SMITH e B. R. SCOTT, 1970. Mutagenesis in *Escherichia coli*. IV. Photosensitiza-

tion to near ultraviolet light by 8-methoxypsoralen. *Mutation Research*, 9:21-30.

- JINKS, J. L., 1963. Cytoplasmatic inheritance in fungi. In: Burdette, W. J. (ed.), *Methodology in basic genetics*, Holden day, São Francisco, Califórnia, p. 325-354.
- JOSEPH, R., M. S. SHANTHAMMA, F. REHANA e K. NAND, 1974. Induced mutations in *Serratia marcescens* by near UV-light in presence of psoralen. *Experientia*, 30:360-361.
- KÄFER, E., 1961. The process of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46: 1581-1609.
- KÄFER, E., P. MARSHALL e G. COHEN, 1976. Well marked strains of *Aspergillus* for tests of environment mutagens: identification of induced mitotic recombination and mutation. *Mutation Research*, 38:141-146.
- KAPPAS, A., 1977. Genetic effects of fungicides through metabolic activation in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 46:224.
- KAPPAS, A., 1978. On the mechanisms of induced somatic recombination by certain fungicides in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 51:189-197.
- KAPPAS, A. e S. G. GEORGOPOULOS, 1970. Genetic analysis of dodine resistance to *Nectria haematococca* (syn. *Hypomyces solani*). *Genetics*, 66:617-622.
- KAPPAS, A., S. G. GEORGOPOULOS e A. C. HASTIE, 1974. On the genetic activity of benzimidazole and thiophanate fungicides on diploids of *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 26:17-27.
- KLIMCZUCK, J., 1970. Spontaneous and induced reversions of *meth₁* mutant of *Aspergillus nidulans*. *Genetica Polonica*, 11:313-319.

- KUIPER, J., 1965. Failure of hexachlorobenzene to control common bunt of wheat. *Nature* (Londres), 206:1219-1220.
- KUNS, B. A. e A. J. S. BALL, 1977. Glucosamine resistance in yeast. II. Cytoplasmatic determinants conferring resistance. *Mol. Gen. Genet.*, 153{2}:169-177.
- LEGATOR, M. S., 1976. *First annual course in the principles and practices of genetic toxicology*. Galveston, Texas, University of Texas Medical Branch.
- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with p-fluorophenylalanine. *Nature* (Londres), 190:744.
- LILLY, L. J., 1965. An investigation of suitability of the suppressors of *meth*₁ in *Aspergillus nidulans* for the study of induced and spontaneous mutation. *Mutation Research*, 2: 192-195.
- LOCKE, S. B., 1969. Botran tolerance of *Sclerotium cepivorum* isolates from field with different Botran treatment histories. *Phytopathology*, 59:13.
- LUKENS, R. J., 1971. *Chemistry of fungicidal action*. Heidelberg, New York, 136 p.
- MASON, J. R. e G. TURNER, 1975. Transmission and recombination of extranuclear genes during sexual crosses in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, 143:93-99.
- MATHEWS, M. M., 1963. Comparative study of lethal photosensitization of *Sarcina lutea* by 8-methoxypsoralen and by toluidine blue. *Journal of Bacteriology*, 85:322-328.
- McCULLY, K. S. e E. FORBES, 1965. The use of p-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research*, 6: 352-359.

- MORPURGO, G., 1961. Somatic segregation induced by *p*-fluorophenylalanine. *Aspergillus newsletter*, 2:10.
- MORPURGO, G., 1962. A new method of estimating forward mutation in fungi. Resistance to 8-azaguanine and *p*-fluorophenylalanine. *Scientific Reports Instituto Superiore di Sanita*, 2:9-19.
- NISHIJIMA, W. T. e E. B. SMALLEY, 1979. *Ceratocystis ulmi* tolerance to methyl-2-benzimidazole carbamate and other related fungicides. *Phytopathology*, 69(1):69-73.
- NORMANSELL, I. D. e G. HOLT, 1979. The ability of ionizing radiations of different LET to induce chromosomal deletions in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 59: 167-177.
- NORMANSELL, I. D., J. T. WOOD, C. N. IGWE e G. HOLT, 1979. *Aspergillus nidulans* as a test organism for assessing radio-induced chromosomal non-disjunction. *Mutation Research*, 61:29-36.
- OLIVEIRA, L. M. M. B., 1978. Resistência à arginina em linhagens deficientes para a síntese de lisina em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 116 p. (Tese de Mestrado).
- PASZEWSKI, A. e J. GRABSKI, 1973. β -cystathionase and *O*-acetylhomoserine sulphydrylase as the enzymes of alternative methionine biosynthetic pathways in *Aspergillus nidulans*. *Acta Biochimica Polonica*, 17:385-391.
- PARTRIDGE, A. O. e A. E. RICH, 1962. Induced tolerance to fungicides in three species of fungi. *Phytopathology*, 52: 1000-1004.
- PENDYALA, L., J. SMYTH e A. M. WELLMAN, 1979. Nature of 6-methylpurine-resistant mutants of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 137(1):248-255.
- PIZZIRANI, A. A., 1977. Características, propriedades e esta-

bilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 111 p. (Tese de Mestrado).

PONTECORVO, G. e J. A. ROPER, 1952. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 6, VII.

PONTECORVO, G., J. A. ROPER e E. FORBES, 1953a. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, 8:198-210.

PONTECORVO, G., J. A. ROPER, L. M. HEMMONS, K. D. Mac DONALD e A. W. J. BUFTON, 1953b. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.

PUTRAMENT, A., J. GUZEWSKA e D. PIENIAZEK, 1970. Further characteristics of methionine mutants and their suppressors in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, 109:209-218.

ROLLINSON, D., L. P. JOYNER e C. C. NORTON, 1979. *Eimeria maxima*: the use of enzyme markers to detect the genetic transfer of drug resistance between lines. *Parasitology*, 78(3):361-367.

ROPER, J. A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8:14-15.

ROPER, J. A., 1971. *Aspergillus*. In: Hollaender A. (ed.), *Chemical Mutagens*. Plenum Press. New York, vol. II, p. 343-365.

ROPER, J. A. e E. KÄFER, 1957. Acriflavine-resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 16:660-667.

ROSATO, Y. B., 1973. Efeitos do etil-metano-sulfonato e acriflavina na instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 74 p. (Tese de Mestrado).

- ROSATO, Y. B. e J. L. AZEVEDO, 1978. Acriflavine and ethyl methanesulfonate-induced mutants of *Aspergillus nidulans* strains with chromosome duplication. *Rev. Brasil. Genet.* 1(4):247-262.
- ROSSI, N. M. M., 1979. Mutantes resistentes ao fungicida clo- roneb em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP, 104 p. (Tese de Mestrado).
- ROWLANDS, R. T. e G. TURNER, 1973. Nuclear and extranuclear inheritance of oligomycin resistance in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, 126:201-216.
- ROWLANDS, R. T. e G. TURNER, 1977. Nuclear-extra-nuclear interaction affecting oligomycin resistance in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, 154:311-318.
- SANT'ANA, E. P., 1974. Alteração na frequência de recombina- ção mitótica e mutantes resistentes a fungicidas em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 63 p. (Tese de Mestrado).
- SCARAZZATTI, M. E., R. BONATELLI Jr. e J. L. AZEVEDO, 1979. Resistance to ethidium bromide in *Aspergillus nidulans*. *Experientia*, 35(3):307-308.
- SCOTT, B. R. e T. ALDERSON, 1971. The random (non specific) forward mutational response of gene loci in *Aspergillus conidia* after photosensitization to near ultraviolet light by 8-methoxypsoralen. *Mutation Research*, 12:29-34.
- SCOTT, B. R., T. ALDERSON e D. G. PAPWORTH, 1973. The effect of plating densities on the retrieval of methionine suppressors mutations after ultraviolet or gamma irradiation of *Aspergillus*. *Journal of General Microbiology*, 75:235-239.
- SCOTT, B. R., T. ALDERSON e D. G. PAPWORTH, 1977. The induction of mutations to 2-tioxanthine resistance in

inhibitor depleted conidia of *Aspergillus nidulans* by γ -radiation in the presence of oxygen or nitrogen. *Mutation Research*, 45:21-30.

- SHABI, E. e T. KATAN, 1979. Genetics, pathogenicity and stability of carbendazim-resistant isolates of *Venturia pirina*. *Phytopathology*, 69(3):267-269.
- SHATLA, M. N. e J. B. SINCLAIR, 1963. Tolerance to PCNB and pathogenicity correlated in natural occurring isolates of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 53:1407-1411.
- SIDDIQI, D. H., 1962. Mutagenic action of nitrous acid on *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 3:303-314.
- SINHA, V., 1967. Aromatic amino acid biosynthesis and p-fluorophenylalanine resistance in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 10:261-272.
- SDUZA, D. R. N., 1979. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 244 p. (Tese de Mestrado).
- SPITHILL, T. W., P. NAGLEY e A. W. LINNANE, 1979. Biogenesis of mitochondria 51. Biochemical characterization of a mitochondrial mutation in *Saccharomyces cerevisiae* affecting the mitochondrial ribosome by conferring resistance to amino-glycoside antibiotics. *Mol. Gen. Genet.*, 173(2):159-170.
- STRIGINI, P., C. ROSSI e G. SERMONTI, 1963. Effects of disintegration of incorporated ^{32}P in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Mol. Biol.*, 7:683-699.
- THRELFALL, R. J., 1968. The genetics and biochemistry of *Aspergillus nidulans* resistant to chlorinated nitrobenzenes. *Journal of General Microbiology*, 52:35-44.
- TILLMAN, R. W. e H. D. SISLER, 1971. A chloroneb-resistant strain of *Ustilago maydis*. *Phytopathology*, 61:914.

- TILLMAN, R. W. e H. D. SISLER, 1973. Effect of chloroneb on the growth and metabolism of *Ustilago maydis*. *Phytopathology*, 63:219-225.
- TOLEDO, A. C. D., 1974. Resistência a fungicidas. *O Biológico*, XL:163-170.
- TOWNSEND, M. E., H. M. WRIGHT e D. A. HOPWOOD, 1971. Efficient mutagenesis by near ultraviolet light in the presence of 8-methoxypsoralen in *Streptomyces*. *Journal of Applied Bacteriology*, 34:799-801.
- TUYL, J. M. van, 1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. Mededelingen Landbouwhogeshool Wageningen - Nederland, 136 p.
- UPSHALL, A. e E. KÄFER, 1974. Detection and identification of translocations by increased specific non-disjunction in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 76:19-31.
- UPSHALL, A., B. GIDDINGS e I. D. MORTIMORE, 1977. The use of benlate for distinguishing haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*. *Journal of General Microbiology*, 100:413-418.
- VOMVOYANNI, V., 1974. Multigenic control of ribosomal properties associated with cycloheximide sensitivity in *Neurospora crassa*. *Nature (Londres)*, 248:508-510.
- VOMVOYANNI, V. e S. G. GEORGIOPOULOS, 1966. Dosage response relationships in diphenyl tolerance of *Hypomyces*. *Phytopathology*, 56:1330-1331.
- WARR, J. R. e J. A. ROPER, 1965. Resistance to various inhibitors in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 40:273-281.
- WAXMAN, M. F., J. A. KNIGHT e P. S. PERLMAN, 1979. Suppression of mitochondrially-determined resistance to chloramphenicol and paramomycin by nuclear genes in *Saccharomyces*

cerevisiae. *Mol. Gen. Genet.*, 167(3):243-250.

WEBSTER, R. K., J. M. OGAWA e E. BOSE, 1970. Tolerance of *Botrytis cinerea* to 2,6-dichloro-4-nitroaniline. *Phytopathology*, 60:1489-1492.

WILKIE, D. e B. K. LEE, 1965. Genetic analysis of actidione resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genet. Research*, 6: 130-138.

WILLIAMS, K. L., 1978. Characterization of dominant resistance to cobalt chloride in *Dictyostelium discoideum* and its use in parasexual genetic analysis. *Genetics*, 90(1):37-47.