

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/6763
IB/81365

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1985

RESISTÊNCIA AO BROMETO

DE ETÍDIO EM

Aspergillus nidulans

12/21
2/21

MARIA ELIZABETH SCARAZZATTI FRAU

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pela Sra Maria Elizabeth Scarazzatti - Frau e aprovada pela Comissão Julgadora
9/12/1985

[Handwritten signature]

RESISTÊNCIA AO BROMETO DE ETÍDIO EM Aspergillus nidulans

Orientador: Prof. Dr. Renato Bonatelli Junior

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Genética.

Campinas - S.P

- 1985 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Classif.	71
Autor	F.
V.	Ex.
Tombo BC/	6763-10
	647

13/ 81365
pd 6763

Para

*meus pais, João e Elisa
e meu esposo, Rubens*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

- Ao Prof. Renato Bonatelli Júnior, pela amizade, orientação e estímulo, durante a realização do presente trabalho.

- Ao Prof. João Lúcio de Azevedo, pelas sugestões e incentivo.

- Ao Chefe do Departamento de Genética e Evolução, Dr. Ivanhoê R. Baracho, pelas facilidades concedidas.

- Ao meu esposo Rubens, pela colaboração na confecção das tabelas e gráficos.

- Aos Profs. Drs. Yoko Bomura Rosato, Aline Ap. Pizzarini-Kleiner e Cláudio Luís Messias, pela leitura criteriosa e sugestões apresentadas.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNP_q) pela concessão de bolsa de aperfeiçoamento.

- Ao Programa Integrado de Genética - PIG/CNP_q, pelo apoio financeiro ao Laboratório de Genética de Microorganismo.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DAS TABELAS	viii
LISTA DAS FIGURAS	x
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1- Alguns aspectos sobre resistência à drogas em <u>Aspergillus nidulans</u>	3
2.2- Alguns aspectos sobre os efeitos de brometo de etídio e isolamento de mutantes resistentes em alguns organismos	16
3- MATERIAL E MÉTODO	23
3.1- Símbolos e Fenótipos dos mutantes usados no pre- sente trabalho	23
3.2- Linhagens utilizadas	24
3.2.1- Linhagem MSE	24
3.2.2- Linhagem duplicada A	24
3.2.3- Linhagem <u>biA₁</u> <u>methG₁</u>	25
3.2.4- Linhagem <u>AcrA₁</u>	25
3.3- Meios de cultura	25
3.3.1- Meio Mínimo	25
3.3.2- Meio completo	26
3.3.3- Meio de Galactose	26
3.3.4- Meio de Acetato de Amônia	26
3.3.5- Meio Mínimo líquido mais 2% de Meio Com- pleto	26
3.4- Soluções e Reagentes	27
3.4.1- Salina	27
3.4.2- Solução de "Tween"	27
3.4.3- Solução de Brometo de Etídio	27

	Pag.
3.4.4- Solução de Benlate	27
3.4.5- Solução de Cloroneb	28
3.4.6- Solução de Acriflavina	28
3.4.7- Solução de Riboflavina	28
3.5- Esterilização, inoculação e incubação	28
3.6- Purificação das linhagens	29
3.7- Obtenção de mutantes	29
3.7.1- Curva de sobrevivência ao Brometo de Etídio	29
3.7.2- Obtenção espontânea de mutantes resis <u>ten</u> tes ao Brometo de Etídio	29
3.7.3- Mutantes induzidos pelo agente mutagêni- co luz ultravioleta	30
3.8- Curva dose-resposta	32
3.9- Técnicas de análise genética	32
3.9.1- Obtenção de heterocáριο	32
3.9.2- Isolamento de diplóides	33
3.9.3- Análise mitótica	34
3.9.4- Análise meiótica	35
3.10- Interação alélica	37
3.11- Resistência cruzada	38
3.12- Efeitos da Riboflavina	38
3.13- Teste de alelismo	38
4- RESULTADOS	40
4.1- Obtenção de mutantes	40
4.1.1- Obtenção espontânea de mutantes resis <u>ten</u> tes ao Brometo de Etídio	40
4.1.2- Obtenção induzida de mutantes resis <u>ten</u> tes ao Brometo de Etídio	41
4.2- Resistência cruzada a Acriflavina	45
4.3- Interação alélica	45
4.4- Análise mitótica	46
4.5- Análise meiótica	46
4.6- Teste de alelismo	58

	Pag.
4.7- Efeitos da riboflavina	59
5- DISCUSSÃO	76
5.1- Obtenção de mutantes	76
5.2- Resistência cruzada	77
5.3- Interação alélica	78
5.4- Mapeamento e Alelismo	80
5.5- Nova denominação proposta para os genes estuda- dos	81
5.6- Efeitos da Riboflavina	82
5.7- Consideração sobre o mecanismo de resistência ao BE e à acriflavina	84
6- CONCLUSÃO	87
7- RESUMO	89
8- SUMMARY	91
9- BIBLIOGRAFIA	93

LISTA DE TABELAS

TABELA	Pág.
01 - Número e porcentagens relativas de conídios sobreviventes da linhagem A, em concentrações de BE.....	42
02 - Número e porcentagens relativas de conídios sobreviventes da linhagem <u>biA₁ methG₁</u> , em concentrações crescentes de BE.....	42
03 - Número e porcentagens relativas de conídios sobreviventes ao tratamento com UV da linhagem <u>biA₁ methG₁</u> de <u>Aspergillus nidulans</u>	44
04 - Mutantes resistentes ao BE.....	44
05 - Concentração em que ocorre redução de crescimento de 50% (RC ₅₀), em relação ao controle, em linhagens sensíveis, mutantes resistentes e diplóides de <u>A. nidulans</u>	57
06 - Análise mitótica do mutante Etb ₁	60
07 - Análise mitótica do mutante R ₁₋₁₀	61
08 - Análise mitótica do mutante R ₂₋₁₀	62
09 - Análise mitótica do mutante R ₅₋₁₀	63
10 - Análise mitótica do mutante R ₇₋₁₀	64
11 - Análise mitótica do mutante R ₈₋₁₀	65
12 - Análise mitótica do mutante R ₉₋₁₀	66
13 - Análise mitótica do mutante R ₁₋₇	67
14 - Análise mitótica do mutante R ₂₋₇	68
15 - Análise mitótica do mutante R ₃₋₇	69
16 - Análise mitótica do mutante E ₃₋₇	70
17 - Análise mitótica do mutante E ₄₋₇	71
18 - Análise meiótica.....	72

TABELA

Pág.

19 -	Teste de x^2 para segregação dos fatores de resistência	73
20 -	Teste de alelismo de alguns mutantes resistentes ...	74
21 -	Efeitos da riboflavina adicionada ao MC com diferentes concentrações de BE ou Acriflavina	75
22 -	Nova nomenclatura para os mutantes envolvidos na resistência ao Brometo de Etídio ou Acriflavina	83

LISTA DAS FIGURAS

FIGURA	Pág.
01 - Marcadores genéticos na linhagem A.....	24
02 - Curva de sobrevivência ao Brometo de Etídio.....	43
03 - Porcentagem de crescimento das linhagens sensíveis, resistentes e diplóides em relação ao controle, em concentrações crescentes de Acriflavina.....	47
04 - Porcentagem de crescimento das linhagens sensíveis, resistentes e diplóides em relação ao controle, em concentrações crescentes de Acriflavina.....	48
05 - Porcentagem de crescimento das linhagens sensíveis, resistentes e diplóides em relação ao controle, em concentrações crescentes de Acriflavina.....	49
06 - Porcentagem de crescimento das linhagens sensíveis, resistentes e diplóides em relação ao controle, em concentrações crescentes de Acriflavina.....	50
07 - Porcentagem de crescimento das linhagens sensíveis, resistentes e diplóides em relação ao controle, em concentrações crescentes de Acriflavina.....	51
08 - Porcentagem de crescimento das linhagens sensíveis, resistentes e diplóides em relação ao controle, em concentrações crescentes de Brometo de Etídio.....	52
09 - Porcentagem de crescimento das linhagens sensíveis, resistentes e diplóides em relação ao controle, em concentrações crescentes de Brometo de Etídio.....	53
10 - Porcentagem de crescimento das linhagens sensíveis, resistentes e diplóides em relação ao controle, em concentrações crescentes de Brometo de Etídio.....	54
11 - Porcentagem de crescimento das linhagens sensíveis, resistentes e diplóides em relação ao controle, em concentrações crescentes de Brometo de Etídio.....	55

FIGURA

Pág.

- 12 - Porcentagem de crescimento das linhagens sensíveis, resistentes e diplóides em relação ao controle, em concentrações crescentes de Brometo de Etídio..... 56

1- INTRODUÇÃO

O Aspergillus nidulans vem sendo explorado genéticamente desde o trabalho clássico publicado por PONTECORVO e col. (1953). As vantagens deste fungo ser usado como um organismo experimental para estudos genéticos são as seguintes: é um eucarioto haplóide que cresce rapidamente em meio mínimo onde existem sais minerais e glicose como fonte de carbono; produz grande quantidade de conídios uninucleados e fortemente pigmentados; apresenta crescimento restrito das colônias em meio sólido e isto o torna adequado para estudos em geral; linhagens mutantes podem ser facilmente isoladas porque diferem do tipo selvagem na coloração dos conídios, requerimentos nutricionais, habilidade para crescer em várias fontes de carbono e resistência para agentes inibidores; é homotálico, portanto uma linhagem pode ser cruzada com ela mesma para análise genética no ciclo sexual; linhagens com núcleo diplóide relativamente estável podem ser selecionadas no ciclo parassexual (PONTECORVO e ROPER, 1952) e, usadas em testes de ação gênica, em análises genéticas através de crossing-over mitótico e haploidização para identificar a que grupo de ligação pertence o mutante.

No presente trabalho foram isolados mutantes de A. nidulans resistentes ao Brometo de Etídio (BE), um composto fenantridino.

Esta droga atua principalmente a nível de mitocôndria, ligando-se a ácidos nucleicos. Atualmente o BE tem sido usado em estudos a nível bioquímico, com a finalidade de se descobrir os diversos mecanismos de ação envolvidos no aparecimento de mutações.

Os mutantes resistentes isolados neste trabalho, foram analisados geneticamente para localizar as marcas para resistência nos respectivos grupos de ligação.

Foi analisada também a ação da acriflavina sobre os mutantes resistentes ao BE para se verificar a existência de resistência cruzada. Outro aspecto abordado foi o efeito da riboflavina na ação do BE e da acriflavina através da manifestação ou não da toxicidade das drogas.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Alguns aspectos sobre resistência à drogas em Aspergillus nidulans

Tem-se obtido mutantes resistentes à vários inibidores em A. nidulans, e, dentre estes, a acriflavina foi a primeira das substâncias ensaiadas a inibir efetivamente o crescimento do fungo, ROFER E KÄFFER(1957) isolaram três mutantes de A. nidulans resistentes à acriflavina. Em cada caso a resistência era devida à mutação em um só gene. Dois dos mutantes eram alelos (AcrA₁ e AcrA₃) e, comportavam-se como semidominantes sendo mapeados à 23 unidades do locus ωA₃, no grupo de ligação II. A mutação acrA₂, era recessiva e estava localizada no braço oposto do grupo de ligação II, a cerca de 25 unidades do marcador ad₁. As três linhagens mostraram também maior resistência ao cristal violeta e ao verde malaquita.

Mutantes resistentes à análogos de metabólitos normais são particularmente interessantes, pois poderiam indicar as modificações dos mecanismos regulatórios do metabolismo normal e fornecer também, mutantes defectivos no transporte de metabólitos, através da membrana celular. Mutantes resistentes a análogos tóxicos são frequentemente incapazes de transportar, para seus interior, tanto o metabólito natural como o análogo.

Assim, têm sido descritos mutantes de Aspergillus nidulans, resistentes a vários análogos de bases nitrogenadas. MORPURGO (1962) descreveu mutantes resistentes a 8-azaguanina in-

duzido por luz ultravioleta. Mutantes resistentes a análogos de aminoácidos são obtidos frequentemente, sendo que os primeiros foram descritos por MORPURGO em 1962. Esses mutantes eram resistentes a p-fluorofenilalanina, análogo da fenilalanina, e foram obtidos após tratamento com luz ultravioleta.

WARR e ROPER (1965) obtiveram também mutantes resistentes a p-fluorofenilalanina e, observaram que o gene responsável pela resistência era recessivo suprimindo o requisito nutricional para ácido nicotínico. Descreveram também, mutações dominantes responsáveis pela resistência ao iodoacetato em A. nidulans, e, mutantes resistentes à verde malaquita, os quais se comportavam como recessivos, conferindo simultaneamente, resistência à acriflavina. Obtiveram, ainda, mutantes resistentes ao actidione e ao teoquil. Enquanto a mutação para resistência ao actidione mostrou ser semidominante, aquela responsável pela resistência ao teoquil era recessiva.

Mutantes resistentes ao fluoroacetato em A. nidulans, foram primeiramente obtidos e descritos por APIRION (1965) e uma de suas particularidades, o que os torna diferentes dos demais casos, é que a resistência lhes confere, também, a capacidade de utilização de fluoroacetato como fonte de carbono. Este fato torna-os de grande interesse para obter as frequências de mutação direta e reversa. Diversos mutantes foram mapeados, conforme se pode notar pela revisão feita por DORN (1967).

DARLINGTON e SCAZZOCHIO (1967) obtiveram mutantes resistentes a 8-azaguanina, a 2-tioxantina e ao ácido 2-tioúrico,

que são, defectivos em pelo menos um passo da absorção de purinas. As propriedades desses mutantes mostraram a existência de dois sistemas de absorção de purinas: um, que controla a absorção de hipoxantina, guanina e adenina, e o outro, de xantina e ácido úrico. Neste caso os mutantes parecem ter perdido a capacidade de metabolizar o componente tóxico e também o componente normal, do qual ele é um análogo.

SINHA (1967) relaciona a biossíntese de aminoácidos aromáticos com a resistência a p-fluorofenilalanina. Esses mutantes apresentavam um requisito parcial para tirosina e fenilalanina, o qual foi explicado pela existência de um bloqueio metabólico na hidroxilação da fenilalanina para dar tirosina. Neste trabalho, conseguiram-se evidências de que os dois processos envolvidos na síntese de tirosina, descritos em outros organismos, também existem no A. nidulans, e que o requisito parcial de tirosina, apresentado pelos mutantes resistentes a p-fluorofenilalanina, é resultado do bloqueio da hidroxilação da fenilalanina. Este bloqueio resultaria num acúmulo de fenilalanina, o que explicaria a resistência ao análogo pois, segundo RICHMOND (1962), tais análogos frequentemente competem com o metabólito natural pelo centro ativo das enzimas.

THRELFALL (1968) isolou mutantes de A. nidulans resistentes aos fungicidas comerciais PCNB (pentacloronitrobenzeno) e TCNB (tetracloronitrobenzeno). Essa resistência era dada por dois genes recessivos localizados no grupo de ligação III. A resistência destes mutantes a esses fungicidas foi considera-

da como devida a um decréscimo na capacidade dos mutantes em acumular a substância tóxica.

AZEVEDO e CAVENAGUE (1968) isolaram mutantes deficientes para a síntese de lisina e resistentes à arginina, após irradiação ultravioleta, numa frequência de 1 em $7,1 \times 10^4$ conídios. A maioria das colônias isoladas apresentava morfologia normal, embora algumas apresentassem colônias miceliais e com crescimento residual. O caráter resistência mostrou-se bastante estável, através de uma série de sub-culturas.

ARST e COVE (1969), estudando mutantes de A. nidulans resistentes ao análogo da amônia, metilamônia, verificaram que deve existir apenas um gene envolvido na resistência e que tais mutações mostraram ser semidominantes, em heterocários e diplóides. Estas mutações levaram a uma liberação generalizada de aparentemente todas as atividades reprimidas por amônia, quando esta estava presente, mas o mecanismo de resistência não foi elucidado.

GEORGOPOULOS e GEORDALIS (1969), estudando mutantes resistentes ao iodoacetato, sugeriram que estes deveriam ser mutantes para permeabilidade. Assim, um sistema de transporte mais facilmente saturável, no mutante, poderia concorrer para a resistência à toxicidade do iodoacetato.

ELORZA (1969) descreveu o isolamento e a caracterização de mutantes de A. nidulans resistentes à toxicidade dos íons metálicos, assim como as diferentes interações entre esses íons. Foram isolados mutantes capazes de crescer em concentrações tóxicas de Zn^{++} , Co^{++} , Ba^{++} , Ni^{++} , Fe^{+++} , Sn^{++} e Mn^{++} . A resistên

cia destes mutantes aos metais, mostrou ser devida a uma conver_{ção} intracelular dos íons em um componente inativo. As análises genéticas mostraram que cada mutação era devida a um simples gene, que foi localizado no grupo de ligação correspondente. Toxicidade de Zn^{++} , Co^{++} , Ba^{++} , Ni^{++} , Fe^{+++} , Sn^{++} e Mn^{++} pode ser revertida para o tipo selvagem por quantidades definidas de K^+ , NH_4^+ , Mg^{++} e Ca^{++} . Estas competições entre cátions, sugeriram a existência de um sistema comum, responsável pelo transporte de cátions nestes microrganismos.

ELORZA e ARST (1971) isolaram mutantes resistentes à sorbose, os quais foram agrupados em dois loci. Em um locus, a mutação conferia resistência cruzada com 2-deoxi-D-glicose, e seria resultado de um defeito no mecanismo de transporte de açúcar. No outro locus, a resistência resultaria da perda da fosfoglucomutase e, seria acompanhada de pronunciada anormalidade morfológica, mas não da perda da capacidade de utilizar D-galactose.

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

TUYL, DAVIDSE e DEKKER (1973) também isolaram mutantes resistentes ao benlate e tiabendazol, através de tratamento prévio com luz ultravioleta. Em ambos os casos, o gene, para resistência, estava localizado no grupo de ligação VIII. Foi pro-

posto que estes fungicidas deveriam interferir na formação do fuso, através de complexos formados entre os fungicidas e as proteínas do fuso, o que resultaria na inibição da mitose.

Mutantes espontâneos, resistentes à oligomicina, foram descritos por ROWLANDS e TURNER (1973). Análises genéticas mostraram que, enquanto a maioria dos mutantes ensaiados tinham origem através de mutação nuclear, um deles tinha mutação extra nuclear. Enquanto os mutantes nucleares não mostraram anormalidade no meio de cultura livre de drogas, o mutante extranuclear exibiu uma capacidade de crescimento aumentada. Os mutantes nucleares mostraram dominância incompleta em diplóides e foram to dos mapeados no grupo de ligação VII.

Mutantes resistentes aos fungicidas Cloroneb, Vitavax e Dodine foram obtidos e analisados por SANTANA (1974), sendo que a resistência aos dois primeiros era devida a um único gene, e a resistência ao Dodine foi determinada como sendo possivelmente de natureza citoplasmática.

PALMER, SCAZZOCHIO e COVE (1975), elucidaram o mecanismo de controle da biossíntese de pirimidinas, através do isolamento de mutantes resistentes a fluoropirimidinas. Enquanto alguns destes mutantes apresentavam alteração no transporte de pirimidinas exógenas, alguns mostravam alterações na regulação da biossíntese de pirimidinas. Análises genéticas mostraram que mutações, conferindo resistência a fluoropirimidinas, podem ocorrer em pelo menos sete loci.

GUNATILLEKE e col. (1975) isolaram dois mutantes resistentes ao cloranfenicol, cujas mutações, quando ensaiadas,

foram herdadas extranuclearmente e, recombinaram com mutações citoplasmáticas, para resistência à oligomicina e sensibilidade ao frio. Estas mutações eram estáveis e não afetavam crescimento ou morfologia em meio livre do antibiótico. Mutações nucleares para resistência ao (cloranfenicol) foram mapeadas em pelo menos três loci. Para um destes loci, mutações levaram pleiotropicamente à hipersensibilidade, à cicloheximida e ao ácido salicíhidroxâmico.

ARMITT, McCULLOUGH e ROBERTS (1976) descreveram dez novos loci que afetavam o metabolismo de acetato, com base na resistência ao fluoroacetato e não utilização de acetato como fonte de carbono. As enzimas ausentes, devido à mutações em sete dos loci, foram descritas e os loci mapeados.

SRIVASTAVA e SINHA (1976) descreveram seis novos loci, nos quais mutações conferiam resistência a p-fluorofenilalanina em A. nidulans. Dentre estes mutantés, três foram localizados no grupo de ligação VI e um, em cada um dos seguintes grupos: I, V e III.

PIOTROWSKA e col. (1976) isolaram mutantés recessivos resistentes à p-fluorofenilalanina e à selenometionina, que se mostraram incapazes de transportar qualquer aminoácido neutro. Isto indicou aos autores que aminoácidos neutros, tais como fenilalanina e metionina, deveriam ser, provavelmente, transportados pelo mesmo sistema.

DEKKER (1976) em sua revisão sobre resistência adquirida a fungicidas em A. nidulans, ilustrada com diversos exemplos, e, considerando as implicações práticas, descreveu, além

da origem, os diferentes mecanismos que levam à resistência a fungicidas.

DRAINAS e col. (1977) isolaram 11 mutantes resistentes ao análogo tóxico da asparagina, hidroxamato aspártico. Estes mutantes apresentavam atividade baixa ou não detectável de asparaginase, que foi medida pela formação de hidroxamato aspártico, a partir de asparagina e hidroxilamina. Estas mutações mostraram ser recessivas e foram mapeadas no grupo de ligação VIII do A. nidulans.

VAN TUYL (1977), além de excelente revisão sobre resistência a fungicidas, investigou o potencial de diferentes fungos em adquirir resistência a fungicidas, medido com frequência de mutação e grau de resistência. Conseguiu mutantes resistentes a todos os fungicidas empregados: benomil, tiabendazol, cloroneb, imazalil, carboxina, cicloheximida e piramicina. As frequências de mutação variaram de 10^{-7} , para piramicina e benomil, a 2.10^{-4} para a resistência ao cloroneb. A caracterização de mutantes resistentes foi feita especialmente em A. nidulans. Foi encontrado que, para alguns fungicidas, tais como cloroneb e oligomicina, somente um locus era responsável por todas as mutações para resistência; por outro lado, no caso da resistência a piramicina e carboxina, 2 e 3 genes respectivamente foram identificados, enquanto que, no caso da resistência à cicloheximida e ao imazalil, um sistema multigênico estava envolvido. Alto nível de resistência ao benomil e ao tiabendazol pareceu ser baseado em mutação em um locus. Vinte e três genes conferindo resistência foram assinalados em sete diferentes grupos de

ligação, 16 dos quais foram mapeados.

DAVIDSE e FLACH (1977) isolaram mutantes resistentes ao fungicida MBC (metil benzimidazol carbamato) e descreveram o possível mecanismo de resistência a este agente. O efeito do MBC no micélio das linhagens mutantes de A. nidulans foi positivamente relacionado com a afinidade pelos sítios complexantes deste composto. Os mutantes resistentes ao MBC apresentavam, então, uma possível alteração na estrutura da tubulina, de modo que uma baixa afinidade da tubulina por MBC seria provavelmente o mecanismo comum da resistência, já que a ação fungicida deste composto se deveria a sua complexação com a tubulina do micélio fúngico.

ROWLANDS e TURNER (1977) descreveram um novo mutante extranuclear para resistência à oligomicina. Esta mutação, mitocondrial, foi transferida assexualmente para quatro linhagens, que apresentavam resistência nuclear à oligomicina. Em todos os casos, a mutação extranuclear, acrescentada à nuclear, levou a um aumento significativo do nível de resistência à oligomicina.

EVSEEVA e KAMENEVA (1977), estudando a hereditariedade da sensibilidade para luz ultra violeta (UV), metilmetanosulfonato (MMS), nitrosoguanidina (NG) e ácido nitroso (NA) em 5 mutantes sensíveis à UV (uvs) de A. nidulans, carregando múltipla sensibilidade para estes fatores, descreveram que 4 mutantes uvs tinham um controle monogênico de sensibilidade para os diferentes mutagênicos. Em um mutante a sensibilidade para os 5 fatores era controlada por 2 mutações não ligadas: uma delas determinando a sensibilidade para UV, NG e NA, e a outra para

raio-X e MMS. Determinaram também que as manifestações fenotípicas de mutações uvs eram modificadas pelo genótipo celular; tanto fatores cromossômicos como citoplasmáticos eram responsáveis por estas alterações. Modificações fenotípicas da mutação uvs resultam em mudança de alguns fatores mutagênicos.

SINGH e col. (1977), estudaram as propriedades dos mutantes de A. nidulans resistentes à FPA (8-fluorofenilalanina), sob fluxo alterado de C ou N, observaram que não há correlação entre o grau de resistência e dominância dos vários mutantes. Quando os mutantes crescem em uma fonte pobre de C ou N apenas, continuam tão resistentes quanto se estivessem em uma fonte rica de C ou N. Novos mutantes resistentes ao FPA foram isolados e mostraram comportamento diferente quando comparados aos mutantes já conhecidos, indicando a existência de mecanismos diferentes de resistência.

AZEVEDO e col. (1977) isolaram mutantes resistentes para 2 fungicidas: cloroneb e vitavax. Estes mutantes foram obtidos espontaneamente com uma frequência de respectivamente 12,5 e 1,1 em 10^8 conídios. O mutante resistente para cloroneb (chl₁) segregou como um gene nuclear simples, semi-dominante, foi mapeado no grupo de ligação IV e causa uma dependência parcial da linhagem para o fungicida. O mutante resistente para vitavax (vit₁) também segregou como um gene simples, mas dominante. Os dois fungicidas alteraram a instabilidade do diplóide e linhagens duplicadas. Cloroneb aumentou, principalmente a haploidização e vitavax reduziu a recombinação mitótica em diplóides. Cloroneb aumentou a instabilidade de linhagens duplicadas e vita-

vax reduziu tal instabilidade.

WHITE e col. (1978), verificaram que o fungicida sistêmico carboxin e análogos estruturalmente relacionados, são poderosos inibidores da oxidação do succinato em mitocôndrias. O complexo succinato dehidrogenase (SDC) em mitocôndrias em linhagens mutantes de Ustilago maydis e A. nidulans resistentes ao carboxin é resistente ao fungicida "in vitro". Verificaram ainda que um análogo de carboxin, por exemplo 4'-fenilcarboxin, tinha um efeito mais inibitório em uma categoria de mutantes de U. maydis resistente ao carboxin. Embora a mesma correlação negativa entre carboxin e outros análogos não foram observados em outras categorias de mutantes, estruturas que diminuem drasticamente o nível de resistência foram encontradas em todos os casos. Portanto a ocorrência natural de linhagens de fungos patogênicos resistentes ao carboxin, pode ser controlada usando análogos de carboxin de estruturas específicas, que seletivamente inibem organismos mutantes.

SCARAZZATTI e BONATELLI Jr. (1979), isolaram um mutante resistente ao brometo de etídio em A. nidulans, EtbA₁, mapeado no grupo de ligação II, que evidenciou comportamento semidominante. Esta linhagem resistente apresentou também resistência cruzada para acriflavina e, no teste com riboflavina, observaram a existência de um efeito antagônico desta vitamina com relação à toxidez do brometo de etídio.

O efeito do fungicida Plantawax foi investigado no fungo filamentoso A. nidulans por LACAVA (1979a), que constatou a presença de colônias resistentes e alterações no crescimento

em meio sólido. Este mesmo autor (1979b) isolou também um mutante resistente ao fungicida benomyl em A. nidulans, numa frequência de 3 em 10^6 conídios. A análise genética do mutante ben₁ mostrou o envolvimento de um gene (ben₁) localizado no grupo de ligação VIII.

SINGH e SINHA (1979), isolaram 4 mutantes recessivos de A. nidulans resistentes a análogos de aminoácidos. Estes mutantes foram isolados em meio contendo acetato como única fonte de carbono e os análogos de aminoácidos p-fluorofenilalanina e etionina. Nenhum dos mutantes mostrou necessidade de algum requerimento para crescer. A análise do crescimento em meio contendo um aminoácido como única fonte de nitrogênio, indicou que 2 mutantes dos 4 possuem sistemas normais para utilização de aminoácidos ácidos, básicos, neutros e aromáticos. Os três novos loci foram identificados após análise genética e foram localizados um em cada um dos seguintes grupos de ligação: I, VI e VIII.

ZINCHENKO e BIRYUKOVA (1980), trataram uma linhagem selvagem de A. nidulans com nitrosoguanidina e isolaram mutantes (147) resistentes aos efeitos tóxicos de 6-azauracil. Estes mutantes foram divididos em 11 grupos fenotípicos de acordo com a resistência cruzada para 5-fluoro derivado de uracil, uridina e oxiuridina. Constataram que todas as mutações para resistência são de origem nuclear e dominante. Foram distribuídas em 6 loci do cromossomo VIII.

SPEAKMAN e NIREMBERG (1981), testaram em A. nidulans e Cladosporium cucumerinum a capacidade de MBC (metil benzimidazol-2-il carbamato) para induzir mutação de ponto para resistên

cia à carboxin e MBC. Verificaram que uma concentração sub-letal (E.D.₅₀) de MBC, quando incorporado ao meio completo, induziu resistência ao MBC na germinação dos conídios de A. nidulans e resistência à carboxin na germinação de conídios de C. cucumerinum; portanto os 2 fungos reagem de maneira diferente a ação mutagênica do MBC. Segundo NIRENBERG e SPEAKMAN (1981) a indução de mutação de ponto pelo MBC depende do pH do meio em que este foi incorporado.

ELISBÃO e AZEVEDO (1983) idealizaram e ensaiaram um método destinado à detecção de efeitos mutagênicos causados por agentes físicos ou químicos, com base na indução de mutação para a resistência ao fungicida cloroneb e uma linhagem de A. nidulans. Verificaram que conídios da linhagem proA₁ pabaA₆ yA₂ que haviam sofrido mutação para a resistência, quando inoculados em meio de cultura que continha cloroneb na concentração de 1600 µg/ml produziram colônias discretamente pigmentadas que contrastavam amplamente com as colônias que se mostravam drasticamente inibidas. Objetivando-se avaliar o poder de resolução do método, foram aplicados 4 agentes mutagênicos. As frequências de mutantes resistentes obtidos através de cada um dos tratamentos foram comparadas entre si e com as do controle, apurando-se resultados consistentes.

2.2- Alguns aspectos sobre os efeitos de brometo de etídio e isolamento de mutantes resistentes em alguns organismos.

O Brometo de Etídio (BE) é um composto fenantridino que se liga com ácidos nucleicos. Originalmente teve interesse como agente tripanocida (BROWNLEE e col., 1950) e, atualmente tem sido muito usado em Biologia Molecular por suas interações com o DNA cromossômico e extracromossômico.

O BE causa mutação mitocondrial produzindo mutante citoplasmático do tipo "petite" em Saccharomyces cerevisiae (SLO-NIMSKI e col., 1968). GOLDRING e col. (1970), investigaram o mecanismo dessa conversão em S. cerevisiae, examinando as características do DNA mitocondrial em vários tempos durante o processo mutacional. Constataram que o BE inibe seletivamente a síntese do DNA mitocondrial, além disso, neste caso, o DNA mitocondrial pré-existente é progressivamente degradado. Em "petites", prolongando-se o tratamento com BE, nenhum DNA mitocondrial pode ser detectado.

FUKUHARA e KUYAMA (1970), mostraram que tanto BE como acriflavina inibem seletivamente a transcrição do DNA mitocondrial "in vivo" em célula de Saccharomyces cerevisiae normais.

CRANDALL e RICHTER (1973), analisaram mitótica e meioticamente um mutante de Hansenula wingei, resistente ao BE, em meio de glucose. A resistência é recessiva e, devida à mutação em 2 genes nucleares ligados (etb₁ e etb₂).

GOUHIER e MOUNOLOU (1973), relataram que mutações ins-táveis para resistência ao BE em Saccharomyces cerevisiae são citoplasmáticas, e que tais mutantes são resistentes à indução de petites por BE. Apresentam ainda resistência cruzada para acriflavina e requerem um produto de síntese de proteína mitocondrial para expressar a resistência ao BE.

LEVY e ASHRI (1975), demonstraram que BE é um eficiente mutagênico também em plantas superiores, utilizando em seus estudos o amendoim.

RIOU (1976) descreveu 3 linhagens de Trypanosoma cruzi resistentes ao BE. Trabalhando com enzimas de restrição e eletroforese em gel de agarose, constatou que os modelos de clivagem dos DNA de kinetoplasto (kDNA) resistentes ao BE eram diferentes dos obtidos com kDNA sensíveis, sugerindo então duas hipóteses: ou o BE induzia ampliações de pequenas sequências de DNA ou deleções de outras; ou ele selecionava uma população pré-existente de tripanossomas sensíveis com diferenças características de clivagem.

GRIMWOOD e WAGNER (1976), demonstraram que o BE é um potente inibidor da fosforilação oxidativa, através da inibição da indução por ADP no 3º estágio da absorção de O₂. Através de microfotografias eletrônicas observaram, em mitocôndrias tratadas "in vitro" com BE e substratos necessários para a fosforilação oxidativa, que o composto é capaz de agir diretamente sobre a função e estrutura de mitocôndrias de fígado de rato, visto que estas apresentam-se aumentadas.

BONATELLI e AZEVEDO (1977), verificaram que o BE reduz

a instabilidade mitótica em Aspergillus nidulans. Esta instabilidade é medida pelo número de setores produzidos por linhagens diplóides e duplicadas.

NAGLEY e MATTICK (1977), trabalhando com mutantes petites de Saccharomyces cerevisiae, observaram que a replicação do DNA mitocondrial nestes mutantes é geralmente menos sensível à inibição pelo BE do que em células competentes respiratórias ("grandes"). Nos vários petites examinados foi constatado diferença na sequência do DNA mitocondrial quando comparados com o DNA mitocondrial dos "grandes". A resistência foi demonstrada pela análise direta da inibição da droga na replicação do DNA mitocondrial em mitocôndrias isoladas. Além disso, a resistência ao BE, em vários casos testados, é acompanhada pela resistência cruzada ao berenil e euflavina, embora sejam observadas variações no nível de resistência. Os autores consideram que a resistência geral dos mutantes petites aparece porque um produto da síntese de proteína mitocondrial está normalmente envolvido facilitando a ação inibitória destas drogas na síntese do DNA mitocondrial em células "grandes". Os vários níveis de resistência em petites pode ser modificado pela sequência particular do DNA mitocondrial de cada petite.

Trabalhando com Dictyostelium discoideum, WRIGHT e col. (1977), isolaram um mutante resistente ao BE, ebrA₁, que foi mapeado no grupo de ligação IV, sendo o gene recessivo e sem resistência cruzada para acriflavina.

WISEMAN e ATTARDI (1978), demonstraram uma redução no DNA mitocondrial de célula humana, quando tratada com BE.

YIELDING e col. (1979), trabalharam com análogos de etídio (monoazida e diazida) como sondas fotosensitivas para analisar diretamente a reversão das interações "in vitro" do BE. Estudos físicos-químicos indicam que a interação do análogo monoazida com ácidos nucleicos, antes da fotólise, assemelha-se à interação do BE. A competição pelo BE para os sítios mutagênicos da monoazida de etídio em Salmonella foi observado quando estas drogas foram usadas em combinação. Contudo, extensivas investigações, têm mostrado que esta aparente competição foi o resultado dos efeitos tóxicos do monoazida de etídio e o aumento desta toxicidade na presença do BE. O aparente aumento na mutagênese, pelo BE causado pela fotólise do azida de etídio pode sugerir um importante mecanismo geral para os efeitos co-mutagênicos de drogas que se ligam ao DNA. Neste caso, ambos os agentes são presumivelmente intercalados no DNA pelo mesmo mecanismo, mas somente um pode ser ligado covalentemente para produzir mutação.

PEÑA e col. (1980), realizaram experimentos para determinar a relação entre os diferentes estados de energização em células de levedura e a entrada de BE. O estado de energização da célula pode ser detectado por vários meios. Desta forma, três tipos de interação do BE com a célula pode ser detectado. O primeiro é a ligação na célula que não parece requerer energia. A segunda interação é representada pela entrada da droga na célula, que requer energia, e é acompanhada por um aumento na fluorescência do BE. A terceira interação pode ser semelhante à entrada ou ligação da droga no mitocôndria, isto requer especificamente energização desta organela, e manifesta-se pela

ausência da fluorescência. Estes resultados são coerentes com a hipótese de que a seletividade do BE pelo DNA mitocondrial pode ser parcialmente explicada pela habilidade desta organela em concentrar a droga.

Trabalhando com algumas espécies de Myxobactérias de frutas, GRIMM (1980) observou que estas apresentavam-se extremamente sensíveis à acriflavina, em contraste com outras bactérias Gram-negativas. Isolou vários mutantes resistentes espontâneos à acriflavina, sendo que a maioria destes apresentavam resistência cruzada tanto para proflavina como para o BE. Alguns mutantes resistentes para acriflavina, mas sem resistência cruzada para BE, adquiriram resistência cruzada para esta última droga como resultado de uma segunda mutação. Contudo em alguns mutantes a segunda mutação aumentou a resistência para acriflavina e aboliu parcialmente a resistência para BE. O mecanismo de resistência ainda não é conhecido. É possível que mais de um gene seja responsável pela resistência para acriflavina, e que a sensibilidade para acriflavina da linhagem selvagem poderia indicar uma alta permeabilidade da membrana externa das Myxobactérias comparadas com outras bactérias Gram-negativas.

TANIDA, IZAWA e HASEGAWA (1981), conseguiram através de tratamento com BE, um mutante com grande habilidade para produzir ansamitocina em uma linhagem de Nocardia sp.

FLEMING, LEON e MIQUEL (1981), observaram que Drosophila melanogaster, tratada com BE durante o desenvolvimento ou durante a fase adulta, o consumo de O_2 é menor. Os experimentos realizados indicaram que o BE, que produz mutantes respira-

tórios em leveduras, tem um efeito semelhante em D. melanogaster, induzindo baixa respiração na mitocôndria.

BAGLIONE e MARONEY (1981) observaram que a ativação de duas enzimas induzidas pelo interferon (proteína kinase e 2',5'-oligo(A) polimerase) é inibida pelo BE. A ativação destas enzimas requer RNA de fita dupla (dsRNA), e a ligação do BE no dsRNA inibe o processo de ativação.

FUKUNAGA e YIELDING (1981) trabalhando com Saccharomyces cerevisiae observaram que os efeitos do BE na mitocôndria envolve muitos passos. Um passo inicial reversível é acompanhado pela fixação covalente tanto por meio da ativação metabólica como fotolítica. Tanto o complexo reversível como o irreversível supõe-se que envolvam o DNA mitocondrial e/ou membranas mitocondrias. O último passo, então, envolve a degradação do DNA e uma presumível interrupção da replicação do DNA.

MARAKHOVA e col. (1981), determinaram a concentração intracelular de Na e K, e a taxa constante do influxo de Na, K e Rb para a cultura de linhagens de células CHO-K₁ (ovário de hamster chinês), tanto sensíveis como resistentes ao BE. Os resultados mostram que aparentemente a seleção de células resistentes ao BE é acompanhada pela mudança pleiotrópica da membrana celular, envolvendo tanto o transporte ativo como passivo de cátions.

Um mutante de Kluyveromyces lactis resistente ao BE foi estudado por BRUNNER e col. (1982) e encontraram, que o transporte da droga era reduzido. Como foi descrito para outros mutantes desta espécie, as mudanças de fluorescência da droga, que

era observada quando as células transportavam-na, não foi observada na linhagem mutante. Simultaneamente a esta dificuldade para incorporar o mutagênico, as células mostraram uma diminuição na habilidade de incorporar cátions monovalentes, quando comparadas com as linhagens selvagens. A alteração da linhagem mutante não parece residir na capacidade de bombear prótons para fora, o que também indica não ter nenhuma alteração no sistema geral de conversão de energia. Este aspecto, segundo os autores, é também corroborado pelo fato de que as taxas de crescimento são similares tanto nos mutantes como nas linhagens selvagens. Tanto BE como K^+ falham em estimular a respiração das leveduras mutantes quando presentes no meio, se comparadas com as linhagens selvagens. De acordo com as investigações realizadas, as células mutantes parecem ser normais, exceto pelo fato de que são incapazes de transportar tanto BE como K^+ do meio. Os dados corroboram a hipótese de que BE e K^+ podem ser transportados pelo mesmo sistema, em leveduras.

GOVORUNOV e col. (1982) estudaram a interação do BE com células de Escherichia coli. O envoltório de células intactas é impermeável às moléculas de BE e a droga penetra em esferoplastos de E. coli. As propriedades do envelope celular de barrar BE são rompidas se as células forem tratadas com EDTA. O envoltório celular serve como barreira para a entrada de BE, enquanto a membrana citoplasmática de E. coli é permeável à droga.

3- MATERIAL E MÉTODO

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

Símbolos	Fenótipos
<u>AcrA</u> ₁	resistência à acriflavina
<u>adE</u> ₂₀	requisito para adenina
<u>biA</u> ₁	requisito para biotina
<u>chaA</u> ₁	conídios chartreuse
<u>facA</u> ₃₀₃	Incapacidade de crescer em meio contendo <u>ace</u> tato como única fonte de carbono.
<u>galA</u> ₁	Incapacidade de crescer em meio contendo <u>galac</u> tose como única fonte de carbono.
<u>lysB</u> ₅	requisito para lisina
<u>methG</u> ₁	requisito para metionina
<u>nicB</u> ₈	requisito para ác. nicotínico
<u>pabaA</u> (1,6)	requisito para ac. p-aminoabenzóico
<u>proA</u> ₁	requisito para prolina
<u>pyroA</u> ₄	requisito para piridoxina
<u>riboB</u> ₂	requisito para riboflavina
<u>sB</u> ₃	requisito para tiosulfato
<u>suA</u> ₁ <u>adE</u> ₂₀	supressor do mutante <u>adE</u> ₂₀
<u>yA</u> ₂	conídios amarelos
<u>wA</u> ₃	conídios brancos (epistático para y/y+)

3.2- Linhagens utilizadas

3.2.1- Linhagem MSE (Master Strain E) contendo marcadores genéticos em todos os oito grupos de ligação (McCULLY e FORBES, 1965), apresentando a seguinte constituição:

Grupo de Ligação	Gene
I	<u>suA</u> ₁ <u>adE</u> ₂₀ , <u>yA</u> ₂ , <u>adE</u> ₂₀
II	<u>wA</u> ₃
III	<u>galA</u> ₁
IV	<u>pyroA</u> ₄
V	<u>facA</u> ₃₀₃
VI	<u>sB</u> ₃
VII	<u>nicB</u> ₈
VIII	<u>riboB</u> ₂

3.2.2- Linhagem duplicada A, descrita por NGA e ROPER (1968), que está representada na figura 1:

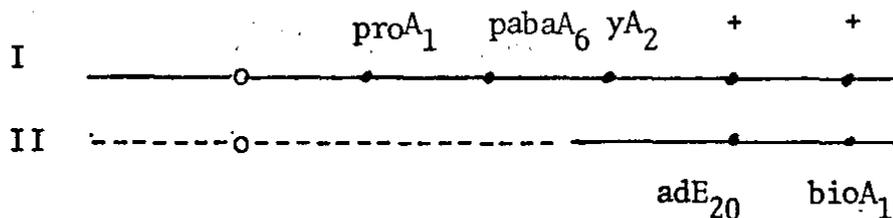


Figura 1 - Marcadores genéticos na linhagem A. Os grupos de ligação I e II são mostrados pelas linhas cheias e interrompidas respectivamente. Os centrômeros estão representados pelos círculos abertos.

3.2.3- Linhagem biA₁ methG₁, que apresenta os seguintes marcadores:

Grupo de Ligação	Gene
I	<u>biA</u> ₁
IV	<u>methG</u> ₁

3.2.4- Linhagem AcrA₁ descrita por ROPER e KÄFFER (1957) que possui a seguinte constituição:

Grupo de Ligação	Gene
I	<u>suA</u> ₁ <u>adE</u> ₂₀ , <u>pabaA</u> ₁ , <u>yA</u> ₂ , <u>adE</u> ₂₀
II	<u>AcrA</u> ₁
VI	<u>lysB</u> ₅
VIII	<u>chaA</u> ₁

3.3- Meios de cultura

3.3.1- Meio Mínimo (MM)

Preparado de acordo com PONTECORVO e col. (1953)

NaNO ₃	6,00g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,52g
KCl	0,52g
KH ₂ PO ₄	1,52g
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Dextrose	10g
Água destilada	1000ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou

HCl 1N.

Foi adicionado 15g de ágar quando se preparou meio sólido.

3.3.2- Meio Completo (MC)

Preparado de acordo com PONTECORVO e col.(1953),
modificado segundo AZEVEDO e COSTA (1973).

Peptona.....	2,00g
Caseina hidrolizada.....	1,50g
Extrato de leveduras.....	0,50g
Solução de vitaminas.....	1,00ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1N.

3.3.3- Meio de Galactose

Galactose.....	10g
Meio mínimo líquido sem dextrose..	1000ml
Ágar.....	15g

3.3.4- Meio de Acetato de Amônia (APIRION, 1962)

Acetato de amônia.....	12g
NaCl.....	2,0g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0,5g
KH ₂ PO ₄	3,0g
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Ágar.....	20g
Água destilada.....	1000ml

O pH foi ajustado para 6,1 com NaOH 4%.

3.3.5- Meio mínimo líquido mais 2% de meio completo

Foi adicionado 2% de meio completo líquido ao meio mínimo líquido. A mistura foi distribuída em tubos (2,5ml em cada

tubo) e a seguir os tubos com a mistura foram autoclavados e mantidos no escuro.

3.4- Soluções e reagentes

3.4.1- Salina

Foi preparado uma solução de NaCl 0,85% com água destilada. Foram colocados 9ml de solução em frascos e os mesmos foram autoclavados e mantidos à temperatura ambiente.

3.4.2- Solução de "Tween"

Foi adicionado "tween" 80 à água destilada em uma concentração de 0,1%(v/v). Foram colocados 2,5ml de solução em tubos e estes foram em seguida autoclavados e mantidos à temperatura ambiente.

3.4.3- Solução de Brometo de Etídio (BE)

Brometo de Etídio	230mg
Água destilada esterilizada	23ml

3.4.4- Solução de Benlate

Benlate	400mg
Água destilada esterilizada	90ml
Acetona	10ml

3.4.5- Solução de Cloroneb

Cloroneb	50mg
Água destilada esterilizada	25ml

3.4.6- Solução de acriflavina

Acriflavina	20mg
Água destilada esterilizada	100ml

3.4.7- Solução de Riboflavina

Riboflavina	200mg
Água destilada esterilizada	50ml

Todas as soluções foram conservadas à 4°C.

3.5- Esterilização, inoculação e incubação

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave à pressão de 1 atmosfera durante 15 minutos e mantidos à temperatura ambiente, no escuro.

Durante os vários experimentos as linhagens estudadas foram inoculadas por dois processos básicos: semeadura e por ponto.

O primeiro consiste em espalhar, com auxílio de uma alça de Drigalski, 0,1ml de suspensão de conídios ou ascósporos em placas de Petri contendo meio de cultura, e o segundo consiste da inoculação em pontos específicos, em placas de Petri con-

tendo meio de cultura, com auxílio de um fio de níquel-cromo ou de um replicador com 26 fios de níquel-cromo de comprimento uniforme (AZEVEDO e col., 1976).

A temperatura de incubação das linhagens utilizadas foi de 37°C em todos os experimentos.

3.6- Purificação das linhagens

A purificação das linhagens teve por finalidade a obtenção de colônias isoladas. Estas colônias foram obtidas por estrias, feitas em meio sólido apropriado, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo contendo os conídios da linhagem a ser purificada.

3.7- Obtenção de mutantes

3.7.1- Curva de sobrevivência ao Brometo de Etídio (BE)

Foram preparadas placas de Petri contendo MC adicionado de 0,2,5,7,10 e 15 µg de BE/ml de meio para a linhagem biA₁ methG₁ e 0µg, 1µg, 7µg, 10µg e 15µg de BE/ml de meio para linhagem A, as quais foram semeadas com 0,1ml de uma solução de conídios de aproximadamente 10³ conídios/ml.

As placas foram incubadas por 72 horas após o que o número de colônias por placa foi contado.

3.7.2- Obtenção espontânea de mutante resistentes ao BE

Conídios de colônias com 6 a 7 dias de incubação foram

transferidos, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, para tubos de ensaio contendo 2,5ml de solução de Tween. A suspensão foi agitada vigorosamente para desagregar as cadeias de conídios e, o número de conídios por ml foi estimado com auxílio de um hematímetro.

Após diluições apropriadas em solução salina, inoculou-se por semeadura 0,1ml desta suspensão (aproximadamente 10^6 conídios/ml) em placas de Meio Completo (MC) contendo Brometo de Etídio (BE). Estas placas foram preparadas acrescentando-se ao MC quantidades variáveis de solução de BE (solução estoque diluída 1:10), de modo a atingir concentrações finais que variaram de 2 a 15 μg de BE/ml de MC.

Foram utilizados 4 a 5 repetições para cada tratamento e, após 48 hs de incubação, procedeu-se a contagem das colônias. Considerando o número de colônias, as diluições feitas e o volume semeado, estimou-se o número de conídios viáveis por ml da suspensão original. A porcentagem de conídios sobreviventes foi calculada para os diferentes tratamentos sempre em comparação com o controle (MC sem BE), considerado como 100% de sobrevivência.

As colônias sobreviventes na concentração de 7 e 10 μg de BE/ml de MC, foram isoladas, purificadas e estocadas em tubos com MC inclinado, à 4°C.

3.7.3- Mutantes induzidos pelo agente mutagênico luz ultravioleta

Conídios de colônias com 6 a 7 dias de incubação foram

transferidos, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, para tubos de ensaio contendo 2,5ml de solução de Tween. O número de conídios por ml foi estimado com o auxílio de um hematímetro e ajustado para cerca de 10^6 conídios/ml.

A seguir a suspensão de conídios obtida foi diluída à 1:10 em solução de salina e os 10ml obtidos foram transferidos para uma placa de Petri vazia e esterilizada. A lâmpada utilizada foi a da marca MINERALIGHT UVSL-25 com intensidade $300\mu\text{w}/\text{cm}^2/\text{s}$, onda curta, à cerca de 20cm de distância da suspensão de conídios. Amostras de 0,1ml foram retiradas nos tempos 0,1,2,4 e 5 minutos e diluídas em solução salina. Foi semeado 0,1ml da suspensão de conídios irradiados em placas com MC para determinar a porcentagem de conídios sobreviventes. Determinado o tempo de irradiação para a obtenção de 5% de sobrevivência, teve início o tratamento com o agente mutagênico.

A suspensão de conídios com uma concentração aproximada de 10^6 conídios, foi irradiada pelo tempo determinado e a seguir foi semeado 0,1ml desta suspensão em placas de Petri contendo MC+BE (5,7 e 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), sendo incubadas por 48-72hs.

As colônias isoladas foram transferidas uma a uma com fio de níquel-cromo, para placas contendo MC+BE (5,7 e 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Foram incubadas por 48hs. As colônias que cresceram foram isoladas em placas contendo MC e, a seguir, estocadas em tubos contendo MC, à 4°C .

Paralelamente foi feito um contrôlo, para estimar-se a viabilidade dos conídios, fazendo-se diluições de maneiras a conseguir uma concentração aproximada de 10^3 conídios. Foi semeado então, 0,1ml desta suspensão em placas de Petri contendo

MC, sendo incubadas por 48-72hs. Considerando o número de colônias, as diluições feitas e o volume semeado, estimou-se o número de conídios viáveis por ml da suspensão original.

3.8- Curva dose-resposta

O efeito do BE sobre linhagens sensíveis e resistentes, foi determinado pela medida do diâmetro das colônias. Conídios foram inoculados em pontos equidistantes (4 à 8 pontos) em placas de Petri contendo MC mais BE em diferentes concentrações (5 à 25 µg/ml). À placa controle não foi adicionado BE. Foram feitas 3 a 4 repetições para cada tratamento e os diâmetros das colônias foram determinados após 48hs de incubação.

A média dos diâmetros obtidos para cada concentração foi expressa em porcentagem do valor (médio) obtido para cada linhagem no meio completo, sem o inibidor.

Através das curvas dose-resposta calculou-se o ponto de redução de 50% de crescimento das colônias em relação ao controle (RC_{50}).

3.9- Técnicas de análise genética

3.9.1- Obtenção de heterocário

Para obtenção de heterocários utilizou-se o método descrito por PONTECORVO e col. (1953). A técnica consiste em co-

locar conídios de duas linhagens requerendo diferentes fatores de crescimento, em 2,5ml de MM mais 2% de MC, preparado como descrito no ítem 3.3.5. O MC permite um pequeno desenvolvimento dos conídios possibilitando a anastomose das hifas, o que resulta na inclusão de dois núcleos geneticamente diferentes em um citoplasma comum. A suspensão foi incubada durante 4-6 dias após o qual a massa micelial formada na superfície do meio de cultura foi removida, recortada em 4 pedaços, transferida para placas com MM.

3.9.2- Isolamento de diplóides

Os diplóides heterozigotos foram obtidos usando-se a técnica de ROPER (1952). Com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, os conídios das regiões tipicamente heterocarióticas foram transferidos para tubos de ensaio contendo solução de Tween (aproximadamente 10^6 conídios/ml). Para obtenção de colônias isoladas, semeou-se 0,1ml desta suspensão em placas de Petri contendo MM. Os conídios haplóides não se desenvolvem neste meio, entretanto, com a fusão de núcleos haplóides são formados núcleos diplóides heterozigotos que originam os conídios diplóides capazes de crescer em MM. Estes diploídes além de crescerem em MM, apresentam o diâmetro dos conídios ligeiramente maior que os dos conídios haplóides que lhes deram origem, auxiliando sua caracterização. A medida dos conídios foi obtida através de um microscópio equipado com uma ocular micrométrica, tendo-se como critério medir somente cadeias com 5 conídios. Para preservar as cadeias de conídios, as lâminas foram preparadas com liso di-

luído (1:10). O resultado obtido para cada diplóide foi sempre comparado com o das linhagens haplóides originais.

As colônias diplóides isoladas foram purificadas em MM e estocadas em MM inclinado, à 4°C.

Por convenção os componentes de um núcleo diplóide foram separados pelo sinal //:

3.9.3- Análise mitótica

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

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

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

Para induzir a haploidização dos diplóides utilizou-se Benlate (HASTIE, 1970) na concentração de 1,5 µg/ml de MC e, cloroneb (AZEVEDO e col., 1977) na concentração de 10 e 16 µg/ml de MC.

Os conídios diplóides foram inoculados em 4 pontos

equidistantes em placas contendo MC e o agente haploidizante. Após 7 dias de incubação os setores haplóides produzidos foram purificados por estrias em MC.

Estes segregantes haplóides (segregantes mitóticos) foram inoculados um a um em 26 pontos prefixados na disposição 5x5+1 (AZEVEDO e col., 1976) em placa contendo MC. Após 3 dias de incubação, esta placa serviu como mestra e, foi replicada em placas de análise usando-se um replicador contendo 26 fios de níquel-cromo.

Cada placa de análise continha MC ou MM suplementado com todos os requisitos nutricionais de ambas as linhagens envolvidas no cruzamento, ou MM suplementado com todos os requisitos exceto aquele sob análise e MC mais BE (5, 7, 10 e 15µg/ml), de acordo com o RC_{50} de cada linhagem testada (ítem 3.8). Utilizou-se também placas contendo meio de galactose e meio de acetato de amônia, sendo ambos suplementados com todos os requisitos nutricionais.

As leituras das placas de análise foram feitas após 24, 48 e 72hs de incubação, levando-se em conta o crescimento ou não das colônias.

3.9.4- Análise meiótica

A análise meiótica foi efetuada de acordo com a técnica descrita por PONTECORVO e col. (1953). Os heterocários obtidos dos diversos cruzamentos foram transferidos para placas com MM que são vedadas com fitas adesivas, e após 7-10 dias de

incubação, os cleistotécios estão formados e maduros. Após este período, os maiores cleistotécios (BARACHO e col., 1970) foram isolados, retirados sob lupa e rolados em placas contendo meio mínimo, para retirar os conídios aderentes e células de Hülle. Cada cleistotécio isolado, foi então transferido para tubos de ensaio, contendo solução de Tween, onde foi esmagado contra as paredes do tubo. Com a mesma pipeta utilizada para o esmagamento, as paredes do tubo foram lavadas, suspendendo desse modo os ascósporos na solução de Tween. De cada suspensão semeou-se 0,1ml em placas de MC, e a suspensão restante foi conservada em refrigerador. As placas foram incubadas por 72hs, após o que foi possível verificar se os cleistotécios eram híbridos ou não.

Para cada cruzamento, um cleistotécio híbrido foi escolhido e, os ascósporos semeados em placas contendo MC.

Após 3 a 4 dias foi feita a contagem das colônias de acordo com seus fenótipos para coloração. Placas mestras foram preparadas com essas colônias na disposição 5x5+1, e após 3 dias de incubação, estas foram replicadas com o replicador de 26 fios para as placas com MM suplementado com os diferentes requisitos nutricionais e placas com MM mais BE (5 a 15 µg/ml) de acordo com o RC_{50} de cada linhagem testada (Ítem 3.8).

Após 24, 48 e 72hs de incubação, fez-se a leitura das mesmas, anotando-se as colônias que cresceram e as que não cresceram, caracterizando-se então, os segregantes para resistência.

Através do número de colônias recombinantes, pode-se calcular o valor de ligação entre dois loci e o desvio padrão

correspondente, aplicando-se as fórmulas:

$$C = \frac{R}{T} \times 100$$

onde: C= valor de ligação; R= número de colônias recombinantes e T= número de colônias analisadas.

$$s = \sqrt{\frac{p(1-p)}{N}} \times 100$$

onde: s= desvio padrão; p= frequência de recombinantes e N= número total de acósporos analisados.

Calculando-se o χ^2 pode-se verificar também se os alelos envolvidos no cruzamento segregam na proporção 1:1. Para isso usou-se a seguinte fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(fo-fe)^2}{fe}$$

onde: fo= frequência observada e fe= frequência esperada.

3.10- Interação alélica

A expressão das mutações para resistência nos diplóides foi determinada utilizando diplóides heterozigotos entre cada linhagem resistente e a MSE. Curvas de dose-resposta foram feitas, em todos os experimentos, para o diplóide e para as linhagens haplóides resistentes e sensíveis que os originaram.

3.11- Resistência cruzada

Foi testado também o efeito de Acriflavina, sobre as linhagens sensíveis e resistentes, sendo elaborado então, uma curva dose-resposta (ítem 3.8.). As concentrações de Acriflavina usadas foram de 5 μg à 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de MC.

3.12- Efeitos de Riboflavina

Os efeitos de Riboflavina foram estimados pela adição de 10, 20, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ desta droga em MC contendo diferentes concentrações de BE (5, 10 e 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ou Acriflavina (5, 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

A estimativa da dose-resposta e efeitos da Riboflavina foram feitos em triplicata e a leitura foi feita após 48hs de incubação à 37°C.

3.13- Teste de Alelismo

O teste de alelismo tem por finalidade verificar se mutações mapeadas no mesmo grupo de ligação são alélicas ou não. A técnica consiste em cruzar linhagens (duas a duas) que apresentam mutações no mesmo grupo de ligação. A análise dos ascósporos provenientes de cleistotécios híbridos obtidos conforme descrito no ítem 2.9.4. fornece evidências da posição relativa dos diferentes mutantes. As concentrações usadas neste teste variam de 5 μg à 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de MC, de acordo com os valores do RC_{50}

de cada linhagem testada (ítem 3.8). Foram testados 208 ascósporos provenientes de um cleistotécio híbrido.

4- RESULTADOS

4.1- Obtenção de mutantes

4.1.1- Obtenção espontânea de mutantes resistentes ao Brometo de Etídio (BE)

Pela curva de sobrevivência (Figura 2 e Tabelas 1 e 2) foi determinado que as concentrações de 7 e 10 µg de BE/ml de MC seriam usadas para o isolamento dos mutantes. Estas concentrações mostraram ser bastante efetivas na inibição do crescimento dos conídios das duas linhagens.

Conídios da linhagem A foram semeados em placas de Petri contendo estas concentrações de BE, conforme descrito no item 3.7.1.. Conseguiu-se isolar uma colônia capaz de crescer na concentração de 10 µg de BE/ml de MC, e, este mutante resistente recebeu a denominação de EtbA₁.

O mesmo procedimento foi feito para a linhagem biA₁ methG₁, com 7 repetições e foram isoladas 7 colônias que cresceram nas concentrações de 7 e 10 µg de BE/ml de MC, sendo que 6 cresceram na concentração de 7 µg e 1 na concentração de 10 µg.

Ao serem retestadas apenas 2 dessas colônias continuaram a apresentar resistência ao BE. A frequência com que os mutantes foram obtidos foi de 1 em $4,3 \times 10^6$ conídios.

Estes mutantes foram designados pela letra maiúscula E acompanhada de dois números: o primeiro indica a ordem e, o segundo, indica a concentração na qual o mutante foi isolado (Ta-

bela 4).

4.1.2- Obtenção induzida de mutantes resistentes ao BE

4.1.2.1- Curva de sobrevivência à luz ultravioleta (UV).

Em virtude do tratamento dos conídios à doses crescentes de luz ultravioleta, foi possível a construção de curvas de sobrevivência para a linhagem biA₁ methG₁.

A Tabela 3 mostra a média de conídios viáveis por placa, as diluições usadas, o número de conídios viáveis por ml e a porcentagem de sobrevivência.

Pela curva de sobrevivência à UV foi determinado o tempo de 5 minutos de exposição que corresponde à porcentagem de sobrevivência dos conídios entre 1 e 5%. Com este resultado foi iniciado o tratamento conforme descrito no item 2.7.2.

Foram feitas 7 repetições e conseguiu-se isolar 16 colônias que cresceram nas concentrações de 7 e 10 µg de BE/ml de MC. Destas, 11 colônias foram isoladas na concentração de 10 µg e 5 na concentração de 7 µg.

Ao serem retestadas, apenas 9 destas colônias continuaram a apresentar resistência ao BE (3 isoladas em 7 µg e, 6 em 10 µg). A frequência de mutantes obtida foi de 1 em $2,3 \times 10^5$ conídios.

Estes mutantes foram designados pela letra R seguida de dois números, como descrito para os mutantes espontâneos no item 4.1.1 (Tabela 4).

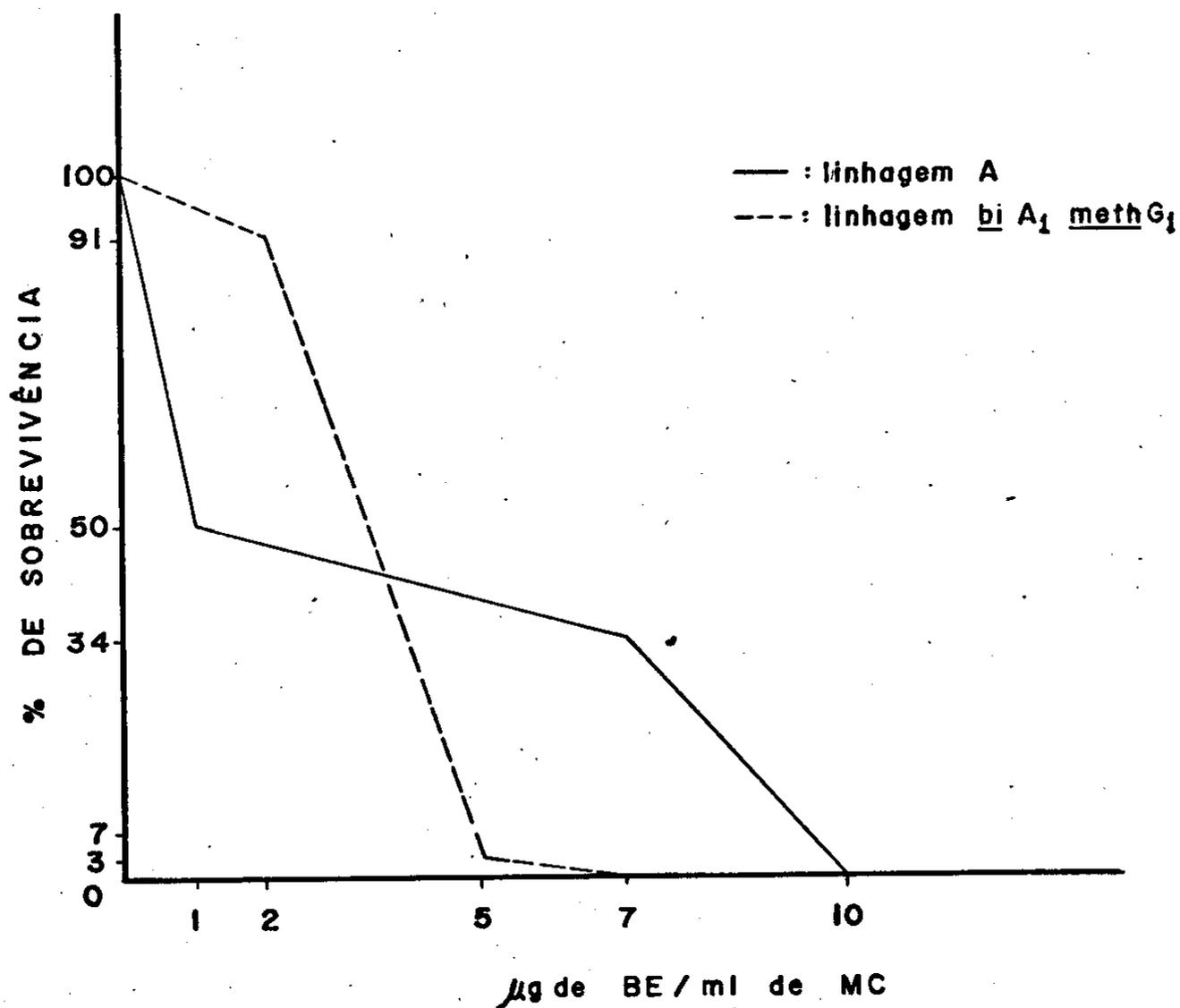
Tab.1: NÚMERO E PORCENTAGENS RELATIVAS DE CONÍDIOS SOBREVIVENTES DA LINHAGEM A, EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE BE.

CONCENTRAÇÃO $\mu\text{g/ml}$	\bar{X} DE COLÔNIAS POR PLACA	PORCENTAGEM RELATIVA DE SOBREVIVENCIA
0	137	100
1	68	50
7	47	34
10	0	0
15	0	0

Tab.2: NÚMERO E PORCENTAGENS RELATIVAS DE CONÍDIOS SOBREVIVENTES DA LINHAGEM bl A₁ methG₁, EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTE DE BE.

CONCENTRAÇÃO $\mu\text{g/ml}$	\bar{X} DE COLÔNIAS POR PLACA	PORCENTAGEM RELATIVA DE SOBREVIVÊNCIA
0	66	100
2	60	91
5	2	3
7	0	0
10	0	0

Fig. 2: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA AO BE



Tab.3: NÚMEROS E PORCENTAGENS RELATIVAS DE CONÍDIOS SOBREVIVENTES AO TRATAMENTO COM UV DA LINHAGEM bi A₁ methG₁ DE A.nidulans.

TEMPO DE IRRADIAÇÃO (minutos)	DILUIÇÕES	\bar{X} DE COLÔNIAS/PLACA	CONÍDIOS VIÁVEIS (ml)	% RELATIVA DE SOBREVIVÊNCIA
0	10^{-3}	51	$2,5 \times 10^5$	100
1	10^{-3}	35	$1,75 \times 10^5$	70
2	10^{-3}	24,3	$1,21 \times 10^5$	48,4
3	10^{-2}	86,3	$8,63 \times 10^4$	34,52
4	10^{-2}	16,3	$1,63 \times 10^4$	6,52
5	10^{-1}	87,5	$8,75 \times 10^3$	3,5

Tab.4: MUTANTES RESISTENTES AO BE. A TABELA APRESENTA MUTANTES ISOLADOS DE CONÍDIOS IRRADIADOS (R) E NÃO IRRADIADOS (E). O PRIMEIRO NÚMERO QUE ACOMPANHA A LETRA INDICA A ORDEM E O SEGUNDO INDICA A CONCENTRAÇÃO NA QUAL OS MUTANTES FORAM ISOLADOS. O MUTANTE RESISTENTE DA LINHAGEM A RECEBEU A DENOMINAÇÃO DE E_{1b}A₁.

MUTANTES RESISTENTES ISOLADOS
<u>E_{1b}A₁</u>
R ₁₋₁₀
R ₂₋₁₀
R ₅₋₁₀
R ₇₋₁₀
R ₈₋₁₀
R ₉₋₁₀
R ₁₋₇
R ₂₋₇
R ₃₋₇
E ₃₋₇
E ₄₋₇

4.2- Resistência cruzada à Acriflavina

Para se testar a existência ou não de resistência cruzada à acriflavina, elaborou-se curvas de dose-resposta, obtidas como descrito no item 3.8.

Com os dados de 48hs de incubação foram construídas curvas de porcentagem de inibição de crescimento das linhagens em relação ao controle (Figuras 3 a 7) e, pelas curvas calculou-se a redução em 50% de crescimento das colônias em relação ao controle (RC_{50}) para cada um dos mutantes (Tabela 5).

Os resultados mostram que todas as linhagens mutantes isoladas apresentam resistência cruzada a esta droga.

4.3- Interação alélica

Para o estudo da interação alélica utilizou-se curvas de dose-resposta obtidas como descrito no item 3.8.

Os dados da curva se referem a média de três repetições para cada concentração. O tempo de incubação foi de 48 e 72 hs.

Com os dados de 48hs de incubação foram construídas curvas de porcentagem de inibição das linhagens em relação ao controle, que se encontram nas Figuras 8 a 12.

Através das curvas dose-resposta calculou-se o RC_{50} para cada um dos mutantes. Estes resultados são mostrados na Tabela 5.

Comparando-se as diferentes curvas pode ser estabelecido se a mutação é dominante, recessiva ou semi-dominante.

Os resultados obtidos nas Figuras e nas Tabelas mostram que a maioria das mutações são semi-dominantes ao BE com exceção dos mutantes R_{7-10} e R_{8-10} , que mostram ser recessivos

e, R_{9-10} , dominante.

Quanto a interação alélica estudada em Acriflavina, os resultados obtidos mostram que algumas mutações são semi-dominantes ($E_{tb}A_1$, R_{1-10} , R_{2-10} , R_{5-10}), outras são dominantes (R_{1-7} e R_{2-7}) e outras recessivas (E_{3-7} , E_{4-7} , R_{3-7} , R_{7-10} , R_{8-10} e R_{9-10}).

4.4- Análise mitótica

A localização do gene em seu grupo de ligação foi feita através do estudo dos segregantes haplóides obtidos de diplóides heterozigotos, entre o mutante e a linhagem MSE, conforme descrito no item 3.9.3.

O gene responsável pela resistência foi localizado, na maioria dos mutantes analisados, no grupo de ligação II, com exceção dos mutantes R_{7-10} , R_{8-10} e R_{9-10} .

Os resultados das análises mitóticas se encontram nas Tabelas 6 à 17.

4.5- Análise meiótica

O mapeamento dos loci que conferem resistência ao BE foi estabelecido através da análise meiótica como descrito no item 3.9.4.

Fig. 3 PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS SENSÍVEIS, RESISTENTES E DIPLÓIDES EM RELAÇÃO AO CONTRÔLE, EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ACRIFLAVINA. 47

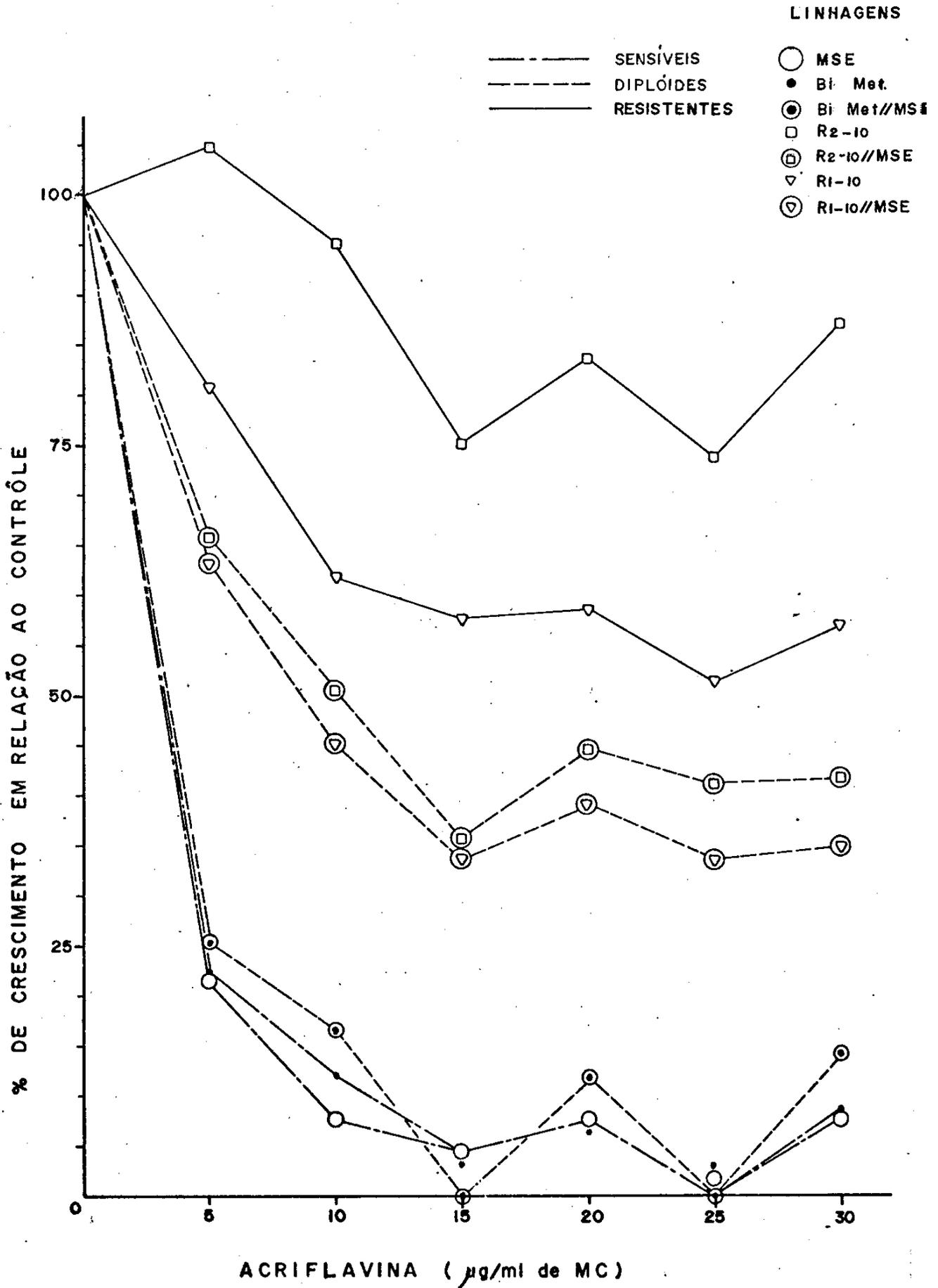


Fig. 4 PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS SENSÍVEIS, RESISTENTES E DIPLÓIDES EM RELAÇÃO AO CONTRÔLE, EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ACRIFLAVINA. 48

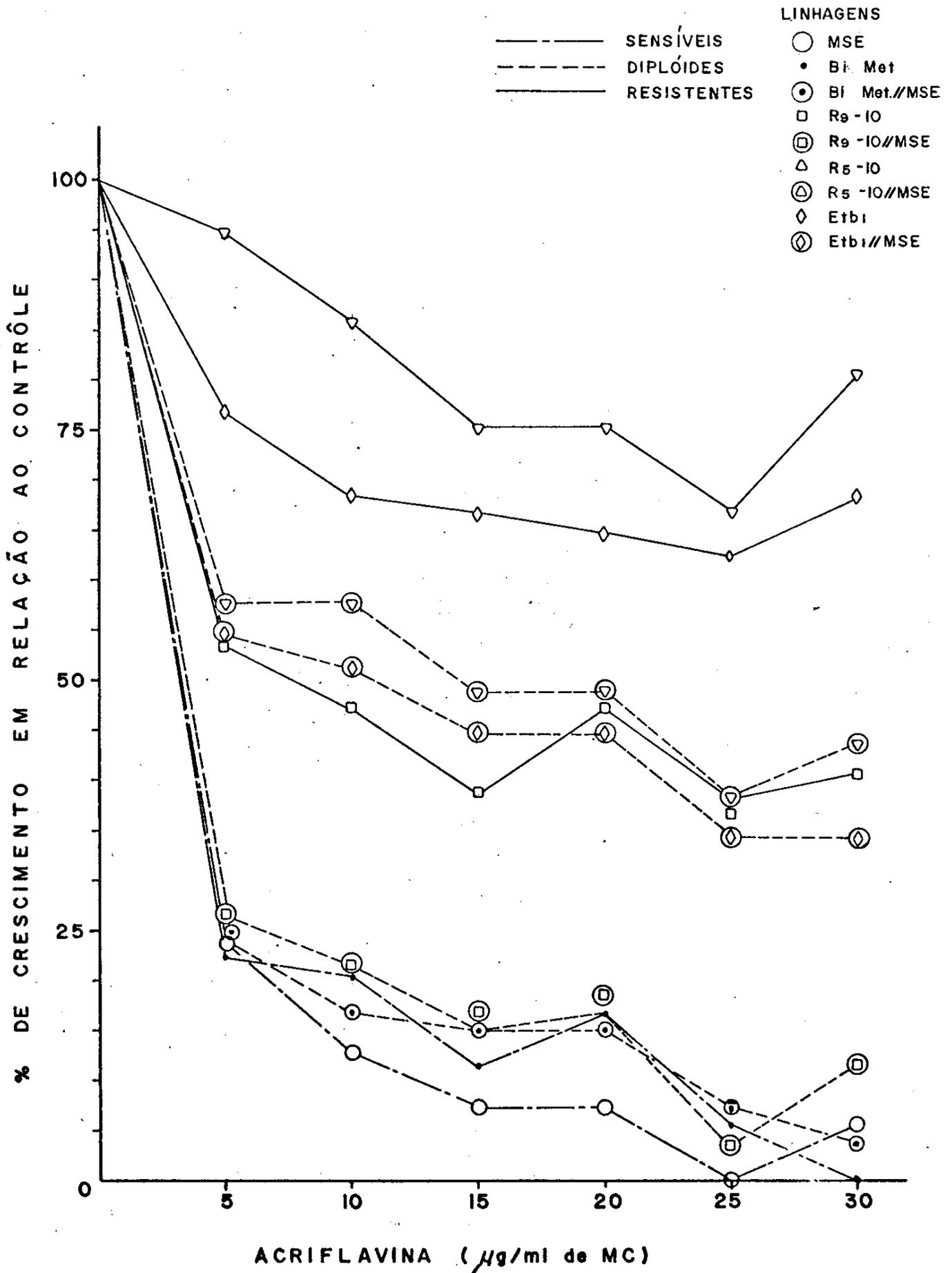


Fig. 5 PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS SENSÍVEIS, RESISTENTES E DIPLOÍDES EM RELAÇÃO AO CONTRÔLE, EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ACRIFLAVINA.

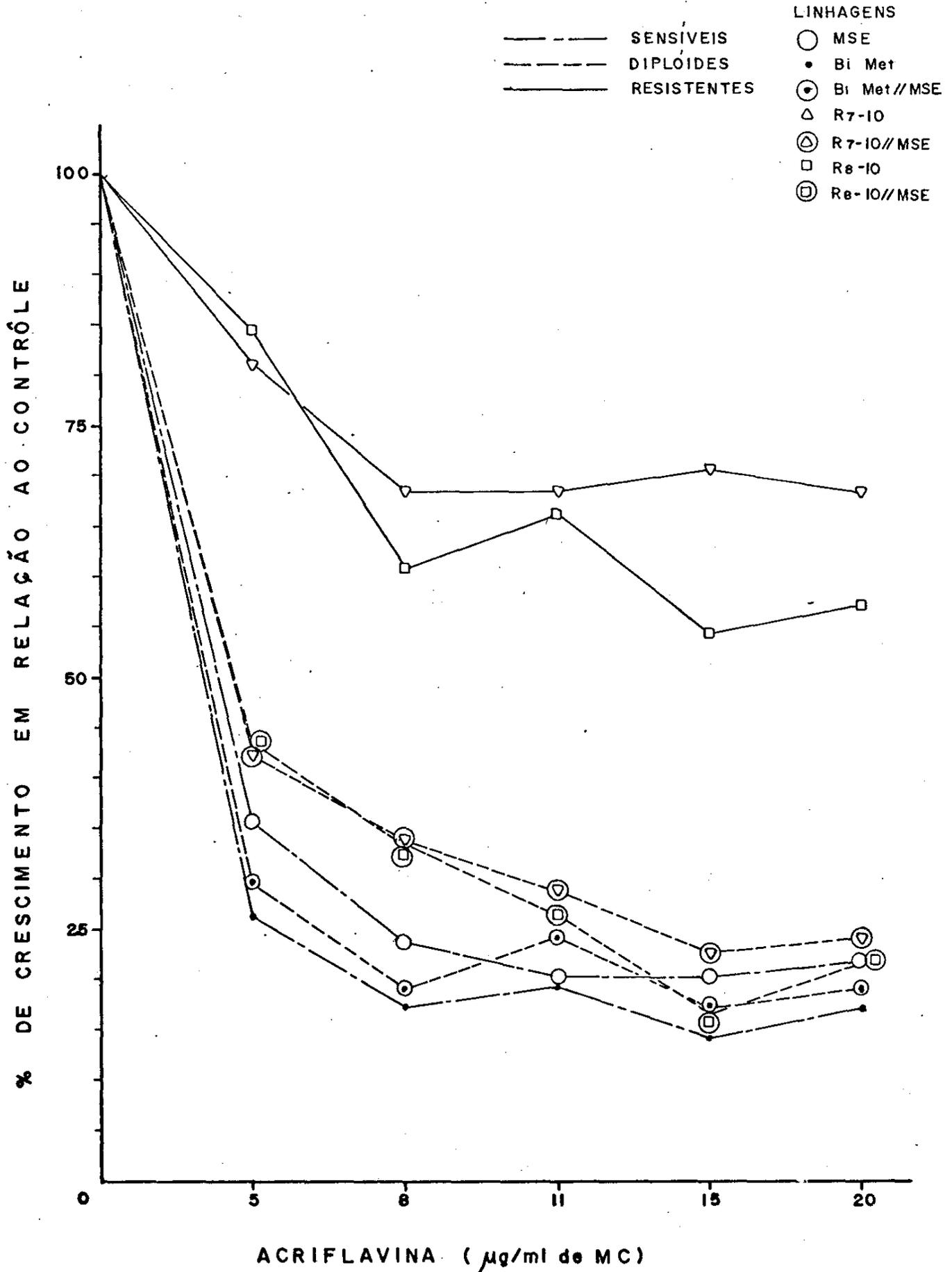


Fig. 6 PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS SENSÍVEIS, RESISTENTES E DIPLÓIDES EM RELAÇÃO AO CONTRÔLE, EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ACRIFLAVINA. 50

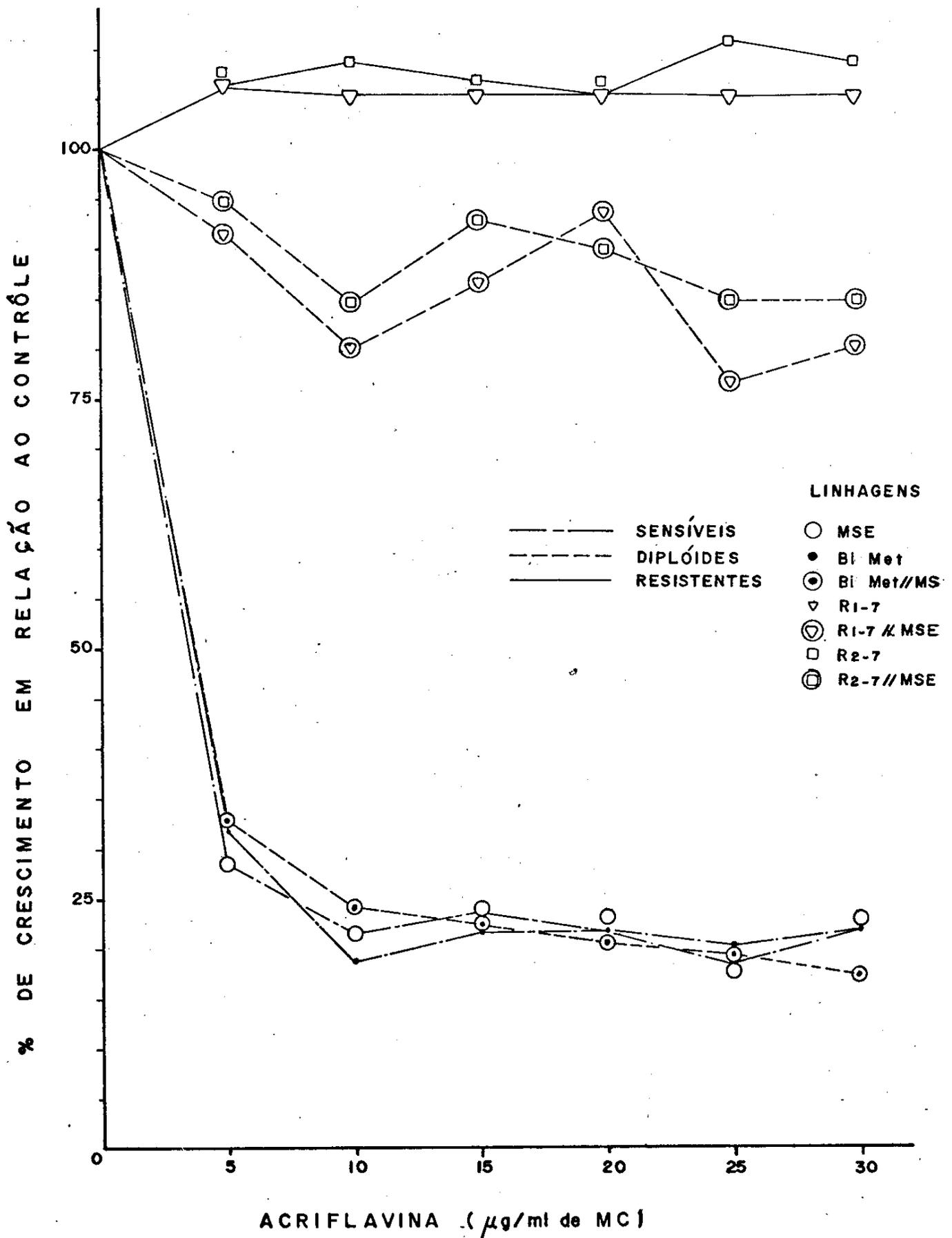


Fig. 7 PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS SENSÍVEIS, RESISTENTES E DIPLÓIDES EM RELAÇÃO AO CONTRÔLE, EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ACRIFLAVINA.

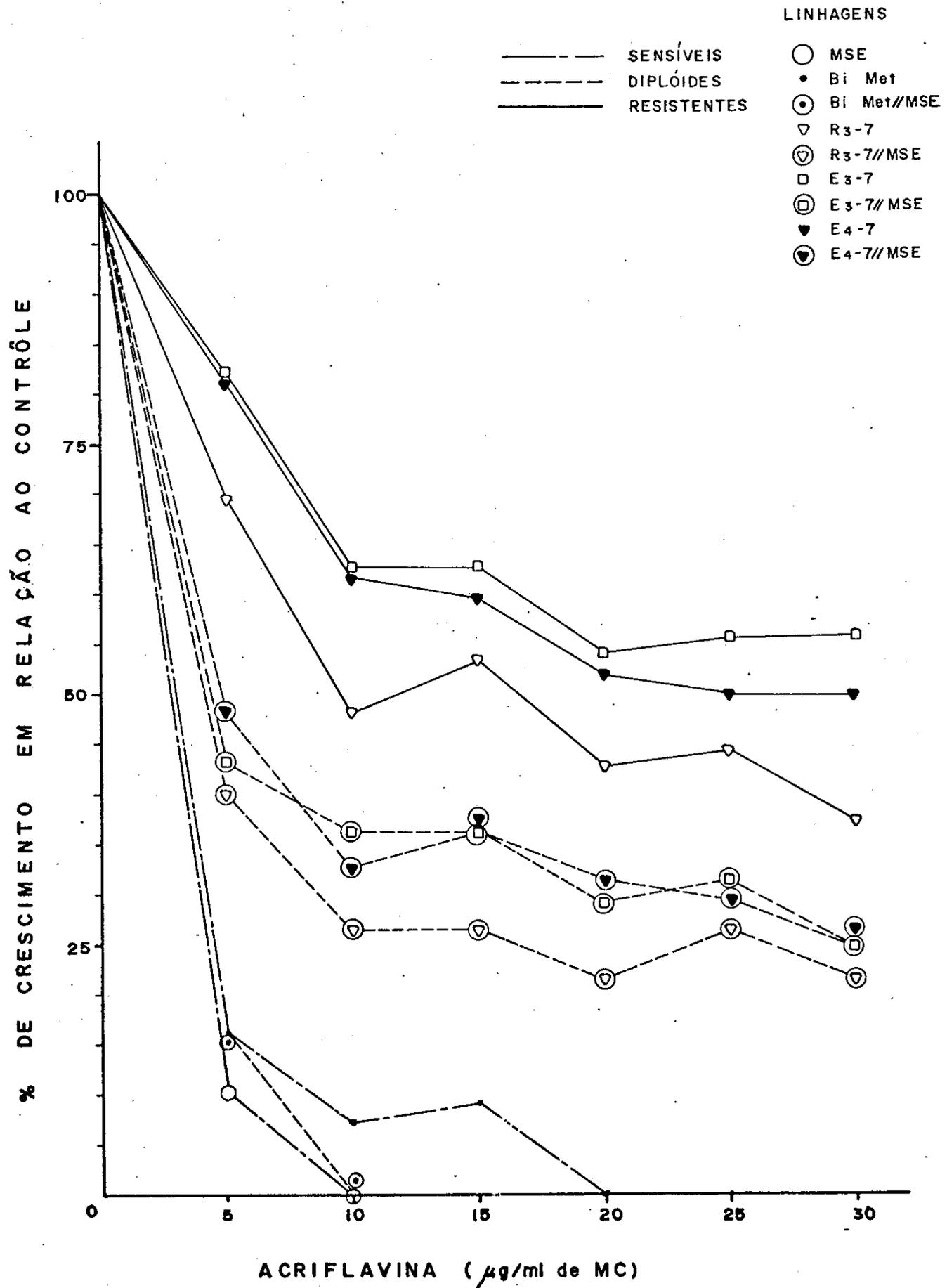


Fig. 8 PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS SENSÍVEIS, RESISTENTES E DIPLÓIDES EM RELAÇÃO AO CONTRÔLE, EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE BROMETO DE ETÍDIO. 52

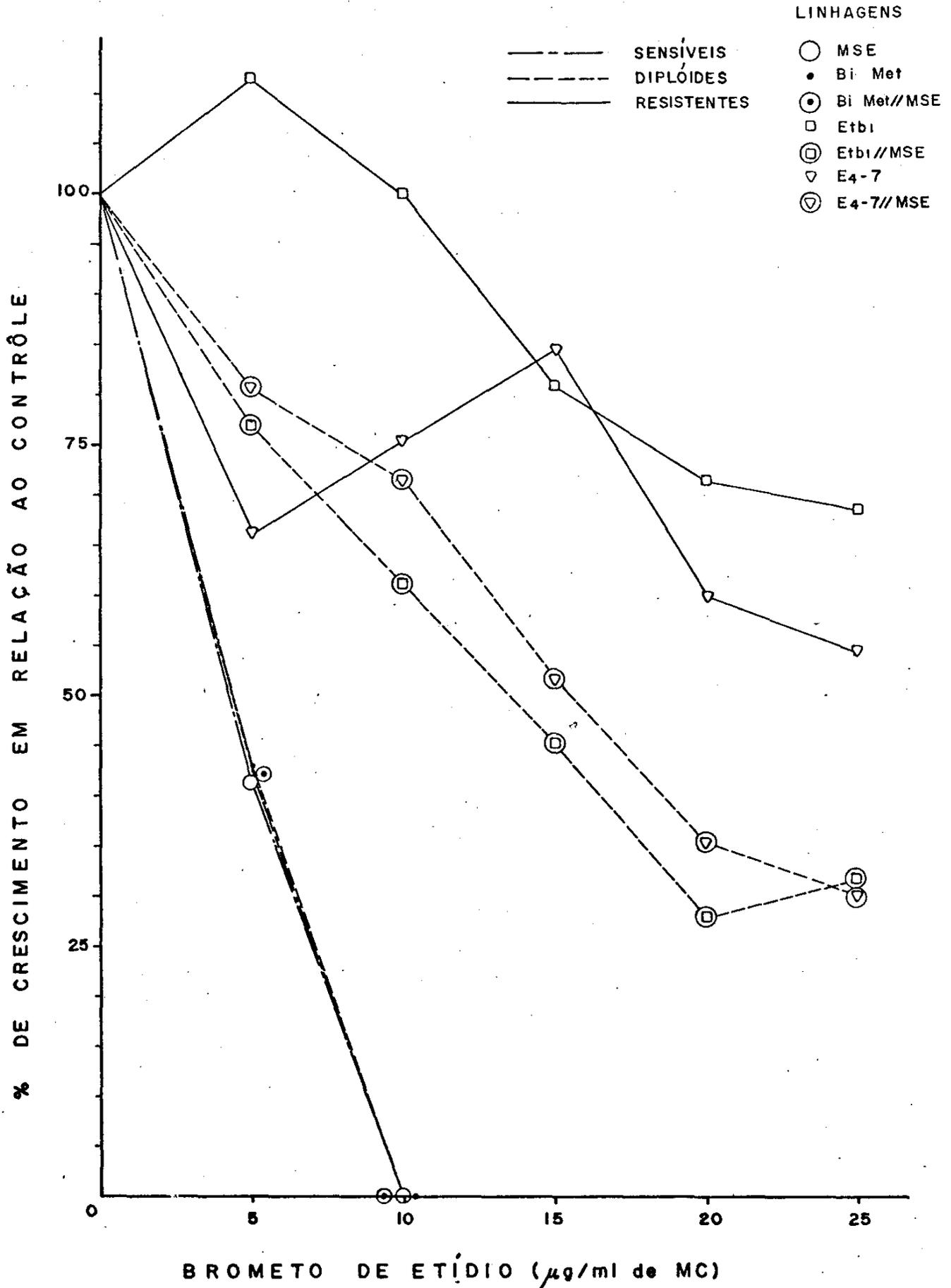


Fig. 9 PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS SENSÍVEIS, RESISTENTES E DIPLÓIDES EM RELAÇÃO AO CONTRÔLE, EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE BROMETO DE ETÍDIO. 53

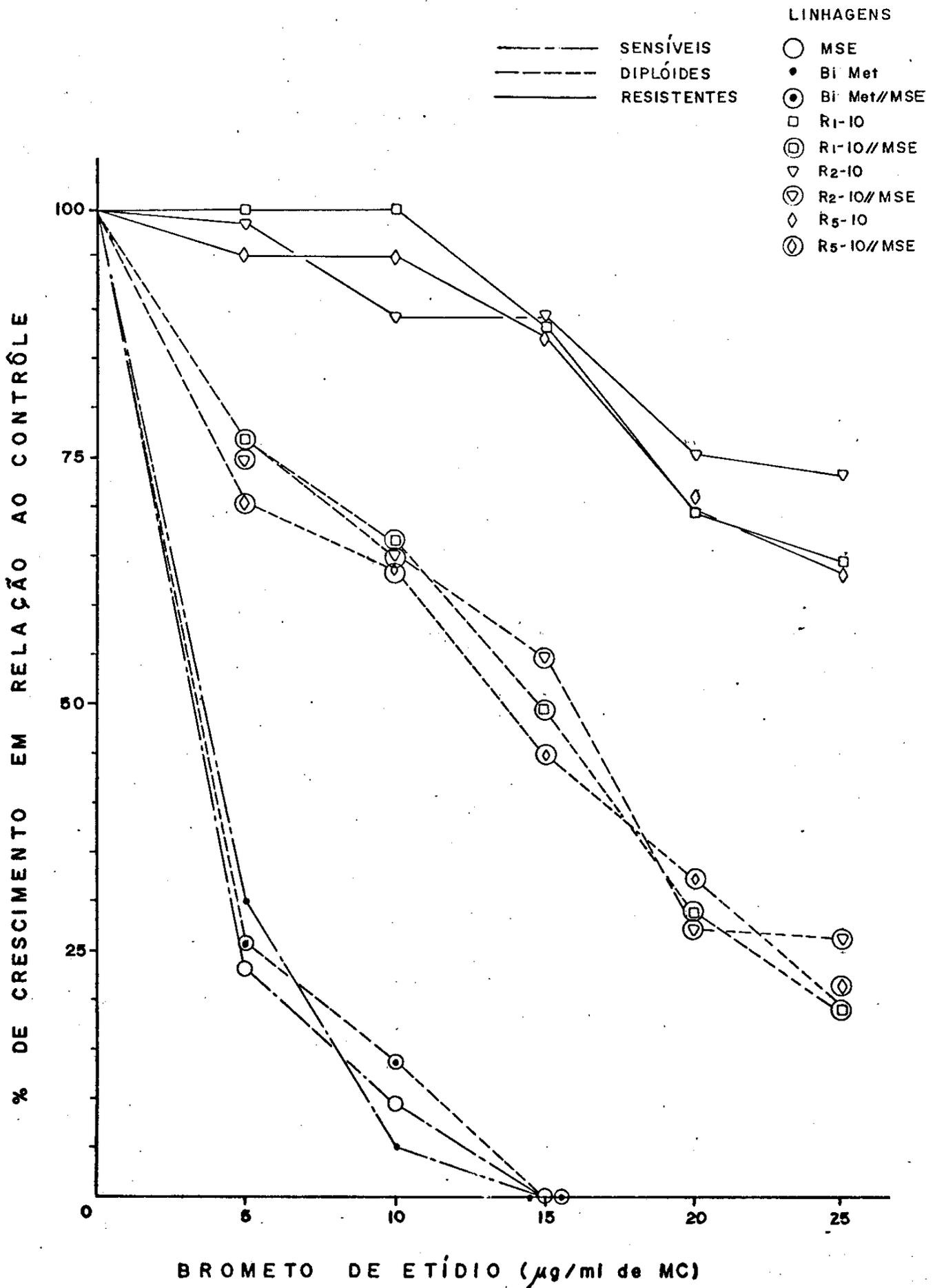


Fig.10 PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS SENSÍVEIS, RESISTENTES E DIPLÓIDES EM RELAÇÃO AO CONTRÔLE, EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE BROMETO DE ETÍDIO. 54

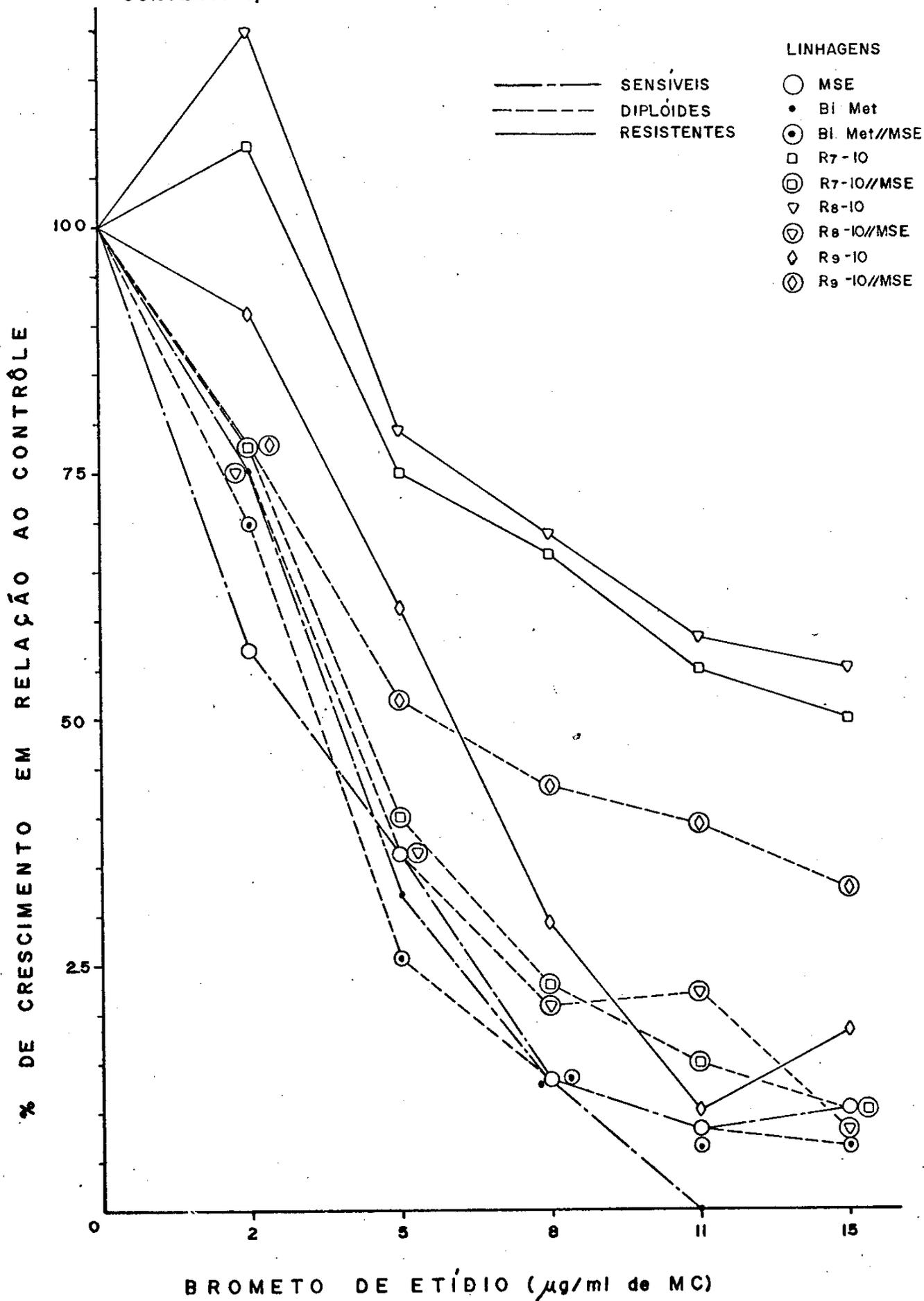


Fig. II PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS SENSÍVEIS, RESISTENTES E DIPLÓIDES EM RELAÇÃO AO CONTRÔLE, EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE BROMETO DE ETÍDIO. 55

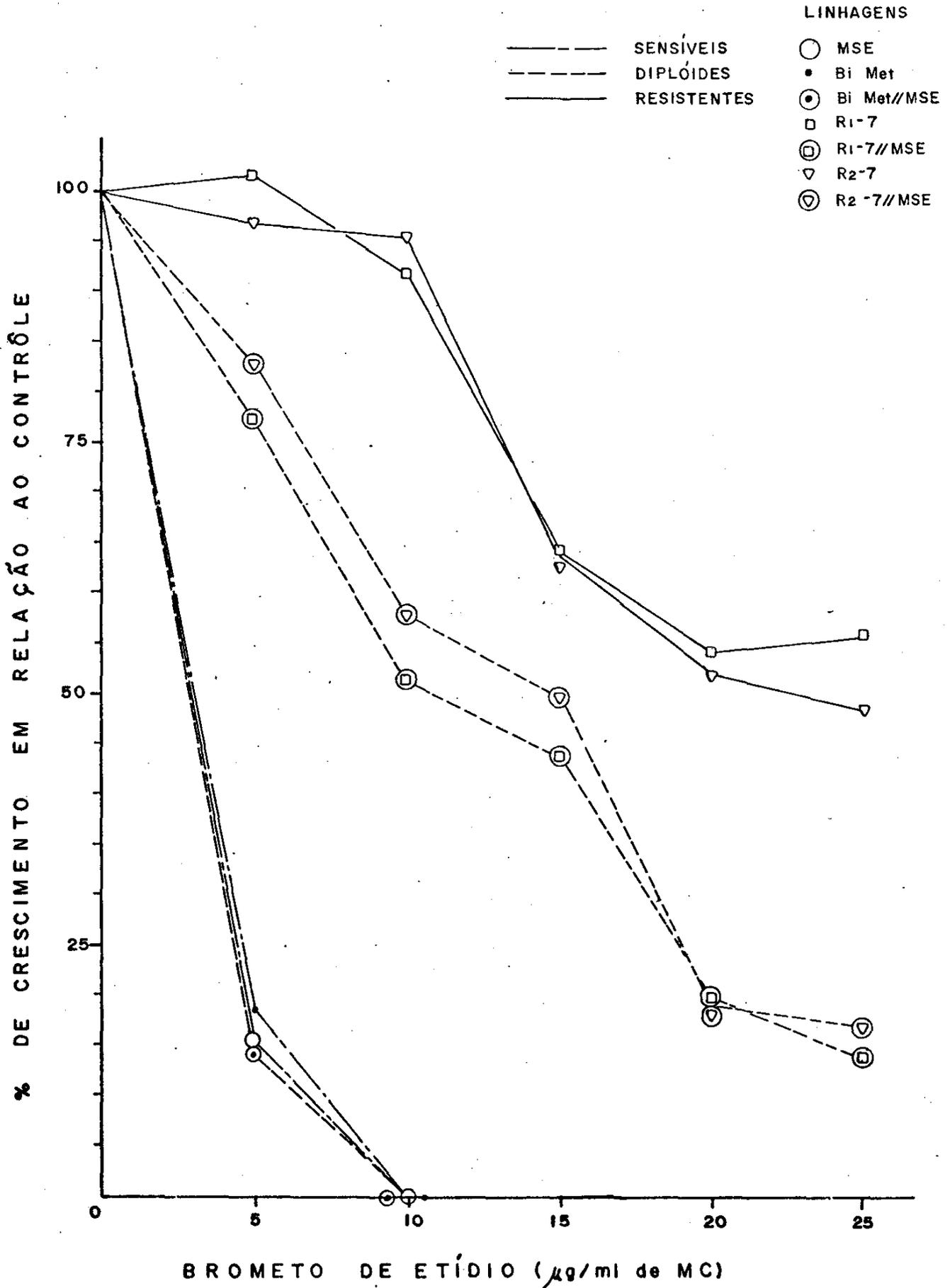
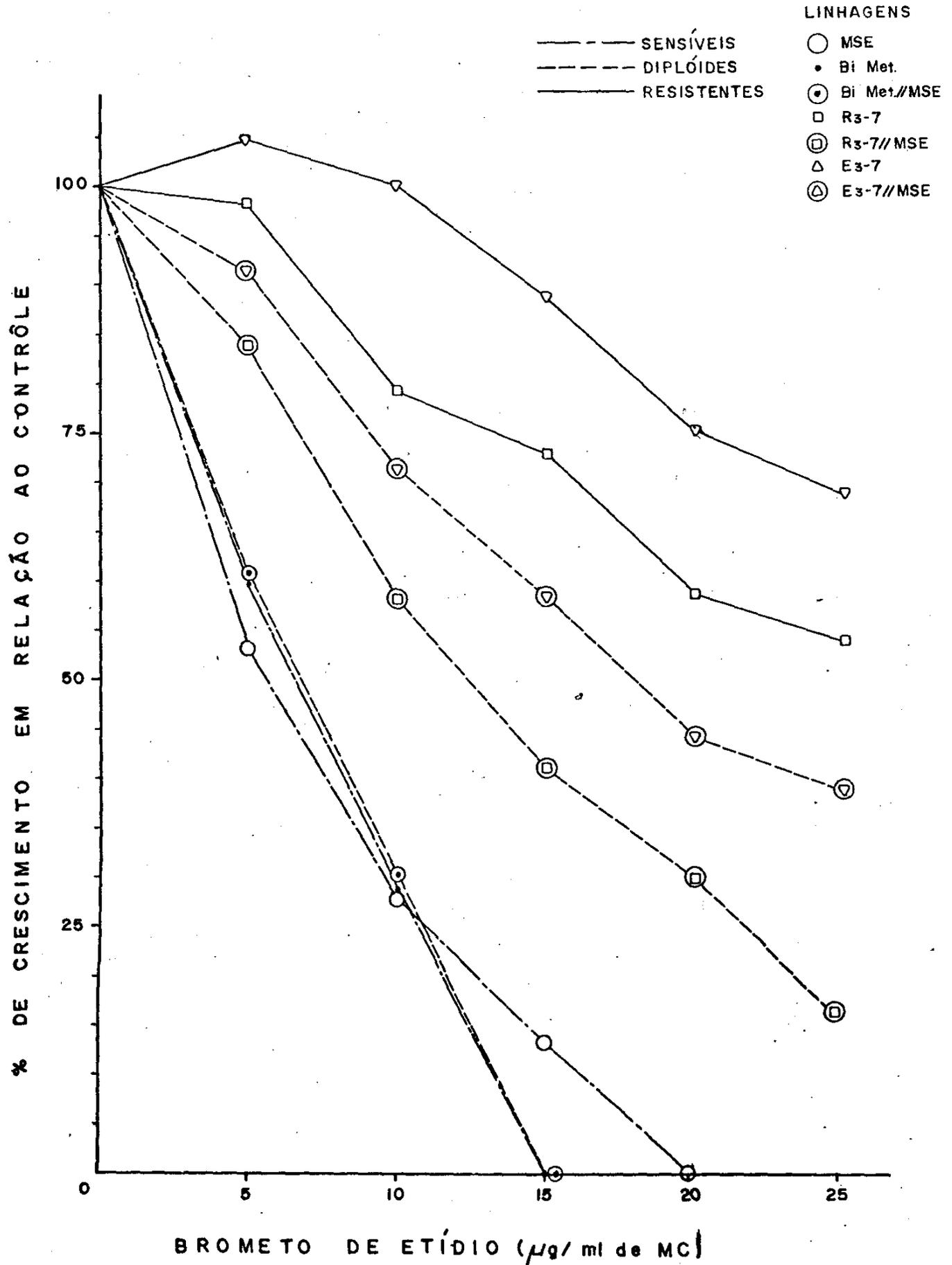


Fig.12 PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS SENSÍVEIS, RESISTENTES E DIPLÓIDES EM RELAÇÃO AO CONTRÔLE, EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE BROMETO DE ETÍDIO. 56



Tab.5: CONCENTRAÇÃO EM QUE OCORRE REDUÇÃO DE ⁵⁷ CRESCIMENTO DE 50% (RC₅₀) EM RELAÇÃO AO CONTROLE, EM LINHAGENS SENSÍVEIS, MUTANTES E DIPLÓIDES DE A. NIDULANS.

LINHAGENS	RC ₅₀ -concentração em µg de EB/ml de MC	RC ₅₀ -concentração em µg de Acriflavina/ml de MC
MSE	3,8*	3,3*
Bio Met	4,3*	3,3*
Bio Met//MSE	4,2*	3,4*
R ₁ -10	>25	>30
R ₁ -10//MSE	14,6	10,2
R ₂ -10	>25	>30
R ₂ -10//MSE	15,8	8,6
R ₅ -10	>25	>30
R ₅ -10 //MSE	13,5	14,2
E ₃ -7	>25	>30
E ₃ -7 //MSE	17,8	4,4
E ₄ -7	>25	30
E ₄ -7//MSE	15,5	4,8
R ₃ -7	>25	12,7
R ₃ -7//MSE	12,3	4,2
E _{tb1}	>25	>30
E _{tb1} //MSE	13,5	10,8
R ₁ -7	>25	>30
R ₁ -7 //MSE	10,8	>30
R ₂ -7	22,5	>30
R ₂ -7//MSE	14,6	>30
R ₇ -10	15,0	>20
R ₇ -10//MSE	4,3	4,3
R ₈ -10	>15,0	>20
R ₈ -10//MSE	4,1	4,5
R ₉ -10	8,8	7,6
R ₉ -10//MSE	5,5	3,4

* - MÉDIA DE 3 EXPERIMENTOS

Os resultados das análises meióticas estão na Tabela 18, e os resultados dos testes de X^2 , que indicam o tipo de segregação, estão na Tabela 19.

Com relação ao mutante R_{9-10} não foi possível se determinar o tipo de segregação.

4.6- Teste de alelismo

Para verificar se os genes que conferem resistência ao BE, mapeados no grupo de ligação II, eram ou não alélicos ao gene AcrA₁, mapeado por ROPER E KÄFFER (1957), algumas linhagens mutantes resistentes ao BE foram cruzadas com a linhagem resistente AcrA₁, como descrito no ítem 3.13.

Uma linhagem representativa de cada grupo, onde as distâncias do marcador para resistência ao gene wA₃ são semelhantes, foi escolhida para o teste.

Calculou-se então o valor de recombinação levando-se em conta também os duplos resistentes, pois estes devem aparecer na mesma proporção que os sensíveis (Tabela 20).

O teste de alelismo para a linhagem R_{2-10} foi feito com a finalidade de mapear o gene responsável pela resistência. Para tanto foram efetuados dois cruzamentos: um com o marcador AcrA₁ e outro com o marcador Etba₁. Os resultados mostram que a mutação R_{2-10} é alélica de AcrA₁ e está à uma distância de $6,8 \pm 1,75$ u.r. do gene Etba₁ (Tabela 20).

4.7- Efeitos da riboflavina

Os efeitos da riboflavina foram estimados procedendo-se como o descrito no ítem 3.14. Os resultados estão na Tabela 21.

Observando-se esta tabela pode-se notar que a riboflavina tem um efeito antagônico em relação à toxidez do BE, mesmo em linhagens portadoras do gene para a resistência.

Pode-se observar que aumentando-se a concentração de riboflavina, aumenta a resistência de todas as linhagens testadas às concentrações inibitórias de BE.

Resultados semelhantes não foram observados para acriflavina.

GRUPO DE LIGAÇÃO DO MARCADOR	MARCADORES	SEGREGANTES	
		RESISTENTES	SENSÍVEIS
I	pro ⁺	21	19
	pro ⁻	5	7
I	paba ⁺	21	19
	paba ⁻	5	7
II	bi ⁺	26	26
	bi ⁻	0	0
II	w ⁺	26	0
	w ⁻	0	26
II	ad ⁺	26	26
	ad ⁻	0	0
III	gal ⁺	24	18
	gal ⁻	2	8
IV	pyro ⁺	26	26
	pyro ⁻	0	0
V	fac ⁺	26	26
	fac ⁻	0	0
VI	s ⁺	24	19
	s ⁻	2	7
VII	nic ⁺	24	15
	nic ⁻	2	11
VIII	ribo ⁺	24	14
	ribo ⁻	2	12

Tab. 7 - ANÁLISE MITÓTICA DO MUTANTE R1-10

GRUPO DE LIGAÇÃO DO MARCADOR	MARCADORES	SEGREGANTES	
		RESISTENTES	SENSÍVEIS
I	bl +	12	3
	bl -	0	0
II	w +	12	2
	w -	0	1
III	gal +	3	1
	gal -	9	2
IV	pyro +	10	1
	pyro -	2	2
IV	meth +	6	1
	meth -	6	2
V	fac +	5	2
	fac -	7	1
VI	s +	12	3
	s -	0	0
VII	nic +	10	1
	nic -	2	2
VIII	ribo +	11	3
	ribo -	1	0

Tab. 8 - ANÁLISE MITÓTICA DO MUTANTE R 2-10

GRUPO DE LIGAÇÃO DO MARCADOR	MARCADORES	SEGREGANTES	
		RESISTENTES	SENSÍVEIS
I	bl +	4	1
	bl -	4	7
II	w +	8	0
	w -	0	8
III	gal +	2	3
	gal -	6	5
IV	pyro +	3	7
	pyro -	5	1
IV	meth +	4	4
	meth -	4	4
V	fac +	6	4
	fac -	2	4
VI	s +	1	2
	s -	7	6
VII	nic +	7	7
	nic -	1	1
VIII	ribo +	4	3
	ribo -	4	5

Tab. 9 - ANÁLISE MITÓTICA DO MUTANTE R5-10

GRUPO DE LIGAÇÃO DO MARCADOR	MARCADORES	SEGREGANTES	
		RESISTENTES	SENSÍVEIS
I	bi ⁺	9	3
	bi ⁻	0	0
II	w ⁺	9	0
	w ⁻	0	3
III	gal ⁺	1	2
	gal ⁻	8	1
IV	pyro ⁺	3	0
	pyro ⁻	6	3
IV	meth ⁺	6	3
	meth ⁻	3	0
V	fac ⁺	4	2
	fac ⁻	5	1
VI	s ⁺	9	3
	s ⁻	0	0
VII	nic ⁺	6	1
	nic ⁻	3	2
VIII	ribo ⁺	5	2
	ribo ⁻	4	1

Tab.10 - ANÁLISE MITÓTICA DO MUTANTE R7-10

GRUPO DE LIGAÇÃO DO MARCADOR	MARCADORES	SEGREGANTES	
		RESISTENTES	SENSÍVEIS
I	bl +	0	9
	bl -	3	0
II	w +	1	5
	w -	2	4
III	gal +	3	1
	gal -	0	8
IV	pyro +	0	3
	pyro -	3	6
IV	meth +	1	2
	meth -	2	7
V	fac +	1	6
	fac -	2	3
VI	s +	3	9
	s -	0	0
VII	nic +	3	6
	nic -	0	3
VIII	ribo +	3	5
	ribo -	0	4

Tab. II - ANÁLISE MITÓTICA DO MUTANTE R8-10

GRUPO DE LIGAÇÃO DO MARCADOR	MARCADORES	SEGREGANTES	
		RESISTENTES	SENSÍVEIS
I	bi +	2	6
	bi -	7	1
II	w +	3	3
	w -	6	4
III	gal +	4	4
	gal -	5	3
IV	pyro +	2	4
	pyro -	7	3
IV	meth +	2	4
	meth -	7	3
V	fac +	5	0
	fac -	4	7
VI	s +	9	7
	s -	0	0
VII	nic +	5	2
	nic -	4	5
VIII	ribo +	9	2
	ribo -	0	5

Tab.12 - ANÁLISE MITÓTICA DO MUTANTE R9-10

GRUPO DE LIGAÇÃO DO MARCADOR	MARCADORES	SEGREGANTES	
		RESISTENTES	SENSÍVEIS
I	bi +	2	19
	bi -	0	0
II	w +	1	10
	w -	1	9
III	gal +	1	10
	gal -	1	9
IV	pyro +	1	0
	pyro -	1	19
IV	meth +	2	18
	meth -	0	1
V	fac +	1	10
	fac -	1	9
VI	s +	2	19
	s -	0	0
VII	nic +	1	10
	nic -	1	9
VIII	ribo +	1	10
	ribo -	1	9

Tab. 13 - ANÁLISE MITÓTICA DO MUTANTE RI-7

GRUPO DE LIGAÇÃO DO MARCADOR	MARCADORES	SEGREGANTES	
		RESISTENTES	SENSÍVEIS
I	bi +	7	7
	bi -	0	1
II	w +	7	0
	w -	0	8
III	gal +	2	2
	gal -	5	6
IV	pyro +	4	3
	pyro -	3	5
IV	meth +	5	5
	meth -	2	3
V	fac +	5	3
	fac -	2	5
VI	s +	6	8
	s -	1	0
VII	nic +	5	6
	nic -	2	2
VIII	ribo +	4	8
	ribo -	3	0

Tab. 14 ANÁLISE MITÓTICA DO MUTANTE R₂₋₇

GRUPO DE LIGAÇÃO DO MARCADOR	MARCADORES	SEGREGANTES	
		RESISTENTES	SENSÍVEIS
I	bi +	10	2
	bi -	0	2
II	w +	10	0
	w -	0	4
III	gal +	6	3
	gal -	4	1
IV	pyro +	0	1
	pyro -	10	3
IV	meth +	10	4
	meth -	0	0
V	fac +	4	3
	fac -	6	1
VI	s +	6	3
	s -	4	1
VII	nic +	8	4
	nic -	2	0
VIII	ribo +	7	3
	ribo -	3	1

Tab. 15 - ANÁLISE MITÓTICA DO MUTANTE R₃₋₇

GRUPO DE LIGAÇÃO DO MARCADOR	MARCADORES	SEGREGANTES	
		RESISTENTES	SENSÍVEIS
I	bi +	0	0
	bi -	10	11
II	w +	10	0
	w -	0	11
III	gal +	4	4
	gal -	6	7
IV	pyro +	2	4
	pyro -	8	7
IV	meth +	9	7
	meth -	1	4
V	fac +	3	7
	fac -	7	4
VI	s +	10	11
	s -	0	0
VII	nic +	7	10
	nic -	3	1
VIII	ribo +	4	1
	ribo -	6	10

Tab. 16- ANÁLISE MITÓTICA DO MUTANTE E3-7

GRUPO DE LIGAÇÃO DO MARCADOR	MARCADORES	SEGREGANTES	
		RESISTENTES	SENSÍVEIS
I	bl +	11	10
	bl -	0	0
II	w +	11	0
	w -	0	10
III	gal +	11	4
	gal -	0	6
IV	pyro +	2	2
	pyro -	9	8
IV	meth +	7	8
	meth -	4	2
V	fac +	7	4
	fac -	4	6
VI	s +	11	10
	s -	0	0
VII	nic +	8	9
	nic -	3	1
VIII	ribo +	7	7
	ribo -	4	3

TAB.17 - ANÁLISE MITÓTICA DO MUTANTE E4-7

GRUPO DE LIGAÇÃO DO MARCADOR	MARCADORES	SEGREGANTES	
		RESISTENTES	SENSÍVEIS
I	bi ⁺	11	6
	bi ⁻	0	0
II	w ⁺	9	0
	w ⁻	2	6
III	gal ⁺	10	0
	gal ⁻	1	6
IV	pyro ⁺	4	1
	pyro ⁻	7	5
IV	meth ⁺	11	6
	meth ⁻	0	0
V	fac ⁺	8	2
	fac ⁻	3	4
VI	s ⁺	11	6
	s ⁻	0	0
VII	nic ⁺	9	5
	nic ⁻	2	1
VIII	ribo ⁺	10	5
	ribo ⁻	1	1

Tab. 18 - ANÁLISE MEIÓTICA

MAPEAMENTO GENÉTICO		
MUTANTES	ANÁLISE MITÓTICA (Grupo de Ligação)	ANÁLISE MEIÓTICA
E1bA ₁	II	17,4 ± 3,05 u.r. do gene wA ₃
R ₁₋₁₀	II	25 ± 4,3 u.r. do gene wA ₃
R ₂₋₁₀	II	—
R ₅₋₁₀	II	19,8 ± 4,0 u.r. do gene wA ₃
R ₇₋₁₀	I, II ou III	26,0 ± 4,4 u.r. do gene bio A ₁
R ₈₋₁₀	I, IV ou VIII	—
R ₁₋₇	II	26,0 ± 4,4 u.r. do gene wA ₃
R ₂₋₇	II	25,9 ± 4,3 u.r. do gene wA ₃
R ₃₋₇	II	20,2 ± 4,0 u.r. do gene wA ₃
E ₃₋₇	II	15,6 ± 3,6 u.r. do gene wA ₃
E ₄₋₇	II	13,7 ± 3,4 u.r. do gene wA ₃

u.r.: unidades de recombinação

—: não se conseguiu fazer o mapeamento via análise meiótica

Tab: 19: TESTE DE χ^2 PARA SEGREGAÇÃO
DOS FATORES DE RESISTÊNCIA
PARA A. nidulans

LINHAGENS MUTANTES	SEGREGANTES		χ^2	TIPO DE SEGREGAÇÃO
	Resistentes	Sensíveis		
<u>E</u> _{1b} A ₁	81	75	0,23 ns	1:1
R ₁₋₁₀	51	49	0,04 ns	1:1
R ₂₋₁₀	37	63	0,61 ns	1:2
R ₅₋₁₀	47	49	0,04 ns	1:1
R ₇₋₁₀	44	52	0,66 ns	1:1
R ₈₋₁₀	19	77	1,09 ns	3:1
R ₉₋₁₀	—	—	—	—
R ₁₋₇	53	43	1,04 ns	1:1
R ₂₋₇	53	51	0,04 ns	1:1
R ₃₋₇	59	45	1,88 ns	1:1
E ₃₋₇	47	49	0,04 ns	1:1
E ₄₋₇	58	44	1,92 ns	1:1

—: não se conseguiu isolar segregantes

Tab. 20: TESTE DE ALELISMO DE ALGUNS
MUTANTES RESISTENTES

MUTANTES X LINHAGEM	NÚMERO DE SEGREGANTES ANALISADOS	NÚMERO DE RECOMBINAN TES	FREQUÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO
$\underline{Etb}A_1$ x $\underline{Acr}A_1$	206	14	$6,8 \pm 1,75$
R_{1-10} x $\underline{Acr}A_1$	207	0	0
R_{2-10}	x $\underline{Etb}A_1$	205	$6,8 \pm 1,75$
	x $\underline{Acr}A_1$	207	0
R_{5-10} x $\underline{Acr}A_1$	207	0	0
E_{3-7} x $\underline{Acr}A_1$	208	0	0
R_{1-7} x $\underline{Acr}A_1$	208	0	0

Tab. 21: EFEITOS DA RIBOFLAVINA ADICIONADA AO MC COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BE OU ACRIFLAVINA.

INIBIDOR ($\mu\text{g/ml}$)	RIBOFLA VINA ($\mu\text{g/ml}$)	LINHAGENS					
		MSE	A	<u>Et</u> b A ₁	<u>Acr</u> A ₁	MSE / A	MSE/ <u>Et</u> bA ₁
BE 5	0	17,2*	0,0	100,0	nt**	0,0	100,0
	10	36,7	30,4	100,0		58,6	100,0
	20	66,7	100,0	100,0		81,5	100,0
	100	86,2	100,0	100,0		75,0	100,0
	200	72,4	50,0	100,0		96,0	100,0
15	0	—***	—	86,4	nt	—	50,0
	10	—	—	83,4		—	48,2
	20	—	—	90,3		—	52,0
	100	—	—	100,0		—	76,9
	200	—	—	100,0		—	95,8
ACRIFLAVINA 5	0	43,7	36,8	118,4	105,0	nt	100,0
	10	40,0	41,0	104,8	92,9		87,2
	20	40,1	42,8	107,5	97,6		86,3
	100	43,1	46,1	112,5	90,9		89,8
	200	38,9	48,7	106,8	85,1		92,0
20	0	18,7	18,4	76,3	85,0	nt	50,0
	10	14,0	17,9	73,8	78,6		48,9
	20	20,4	16,7	75,0	87,8		35,3
	100	25,5	20,5	62,5	77,3		42,8
	200	18,5	15,4	63,6	68,1		46,0

* - OS VALORES REPRESENTAM PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS CRESCENDO EM MEIO CONTENDO AS DROGAS NAS QUANTIDADES ESPECIFICADAS NA 1ª COLUNA EM RELAÇÃO AO CONTROLE.

** - nt - NÃO TESTADO

*** - INIBIÇÃO TOTAL

5. DISCUSSÃO

5.1. Obtenção de mutantes

Os dados apresentados no ítem 4.1 mostram que aproximadamente 50% das colônias isoladas como mutantes, não apresentaram resistência ao Brometo de Etídio (BE) ao serem retestadas e, esta porcentagem variou de 43,8%, nas selecionadas após tratamento com luz ultravioleta à 62,5% no caso das selecionadas como mutantes espontâneos. A ausência de determinante genético da resistência foi testada numa linhagem isolada como possível mutante cruzada com a parental sensível MSE (ítem 3.2) o que indicou a não existência de gene supressor da resistência (Scarazzatti e Bonatelli Jr., dados não publicados).

Este fato poderia sugerir a existência de colônias aparentemente resistentes numa primeira seleção, como descrito por ELISBÃO e AZEVEDO (1983); embora os valores encontrados por esses autores sejam bem menores do que os descritos no presente trabalho.

Poderia ainda ser sugerido que estas colônias sejam instáveis geneticamente devido à mutação nuclear ou à mutação citoplasmática. A possibilidade de ter ocorrido mutação citoplasmática nas colônias que perderam a resistência é bastante viável, tendo em vista o fato do BE ser um potente mutagênico mitocondrial em Saccharomyces cerevisiae (SLONIMSKI e col., 1968; GOLDRING e col., 1970; NAGLEY e MATTICK, 1977 e FUKUNAGA e YIELDING, 1981). Levado em consideração ainda, que GOUHIER e MOUNOLOU (1973), relataram que as mutações resistentes ao BE

instáveis em S. cerevisiae são citoplasmáticas.

A frequência de mutantes, tanto espontâneos como induzidos, situou-se dentro do relatado na literatura para outras drogas em Aspergillus nidulans (AZEVEDO e CAVENAGUE, 1968; AZEVEDO e col., 1977; TUYL, 1977 e LACAVAL, 1979b).

5.2- Resistência cruzada

Conforme pode ser observado na Tabela 5 e Figuras 3 a 7 foi constatado a existência de resistência cruzada dos mutantes obtidos em BE para acriflavina e vice e versa, conforme descrito por SCARAZZATTI e col. (1979). Este fato também foi observado em Aspergillus nidulans por BORDIGNON DE OLIVEIRA (1978).

Em outros organismos também foi descrito a existência deste tipo de resistência cruzada (FUKUHARA e KUYAWA, 1970 e GOUIER e MOUNOULOU, 1973). GRIMM (1980), trabalhando com várias espécies de Myxobactérias constatou a existência de resistência cruzada à acriflavina e ao brometo de etídio, inclusive, à outras proflavinas, que não foram testadas no presente trabalho, mas que poderiam ser utilizadas em outros experimentos visando uma caracterização dos mutantes obtidos.

Em contrapartida, WRIGHT e col., (1977) isolaram em Dictyostelium discoideum um mutante resistente ao BE que não apresentou resistência cruzada à acriflavina. BRUNNER e col., descrevem em Kluyveromyces lactis que todos os mutantes resistentes ao BE são sensíveis à acriflavina e vice e versa.

Os dados da Tabela 5 e Figuras 3 à 12 mostram que o RC_{50} em acriflavina é maior que o RC_{50} em BE na maioria das linhagens haplóides resistentes, exceto R_{3-7} .

Nos diplóides heterozigotos a situação parece ser diferente, pois a metade (50%) apresenta resistência ao BE maior que à acriflavina. Aparecem também casos em que o nível de resistência é igual para os dois inibidores (33,5%) e, em menor escala, níveis de resistência maior em acriflavina do que em BE (16,5%).

Estes dados poderiam sugerir a existência de mecanismos de resistência diferentes nas várias linhagens. Poderia inclusive estar ligado ao fato da permeabilidade da membrana às duas drogas ser diferente (GRIMM, 1980). Resistência ao BE atribuída à permeabilidade da membrana à droga foi descrito por outros autores (BRUNNER e col., 1982 e GOVORUNOV e col., 1982).

5.3 - Interação alélica

Analisando a Tabela 5 e as Figuras 8 a 12, constata-se que a maioria dos genes que confere resistência ao BE comporta-se como semidominante. Resultados semelhantes em Aspergillus nidulans foram obtidos por ROPER e KÄFFER (1957), com relação ao mutante AcrA₁; WARR e ROPER (1965), com relação ao gene que confere resistência ao actidione e AZEVEDO e col. (1977) com relação ao mutante ch1₁ (resistente ao cloroneb).

Nos mutantes que apresentam alto nível de resistên

cia está melhor evidenciada a interação alélica e, pode-se observar ainda, que, nas concentrações mais baixas de BE, estes mutantes apresentam um crescimento maior que o apresentado na ausência da droga. Este resultado poderia indicar um estímulo de crescimento provocado pelo BE, semelhante ao que foi relatado por AZEVEDO e col., (1977) com relação ao mutante chl₁. Por outro lado, não se pode deixar de considerar a questão do espaço na placa, ou seja, as linhagens resistentes cresceriam melhor nestas concentrações pois teriam mais espaço disponível na placa devido à inibição das sensíveis.

Para os mutantes de baixo nível de resistência (Figura 10) foi escolhida uma faixa de concentração, onde a distinção entre as linhagens sensíveis, resistentes e diplóides parecia mais nítida. Esta faixa se encontra entre as concentrações de 8 a 11 µg de BE/ml de meio completo (MC) e foi determinada pelas curvas de dose-resposta. Este procedimento, usado no presente trabalho, é aconselhável antes de se efetuar a análise genética, pois de posse deste dado, pode-se determinar a concentração de BE adequada para ser usada, tanto na análise mitótica como na meiótica, visando classificar com segurança as linhagens segregantes em sensíveis ou resistentes.

Com relação à resistência para acriflavina, a interação alélica de 50% dos mutantes é diferente da apresentada com relação ao BE (Tabela 5 e Figuras 3 à 7). Observação similar em relação à interação alélica foi feita por TUYL (1977) quando estudou resistência ao benomyl em Aspergillus nidulans e, verificou que, na maioria dos casos, havia resistência cruzada

ao thiabendazol. Ao realizar testes de interação alélica, verificou no mutante benA₁₀ que em relação ao benomyl, o gene alterado pode ser considerado recessivo e, é semi-dominante em relação ao thiabendazol. O mutante benB₂₉ seria considerado dominante em relação ao benomyl e, semi-dominante ao thiabendazol. Constatações similares foram feitas pelo mesmo autor em relação à cicloheximida e imazalil.

5.4- Mapeamento e Alelismo

Os determinantes de resistência para BE nas linhagens mutantes testadas apresentaram herança monogênica, com exceção do mutante R₈₋₁₀ (Tabela 19).

No caso do mutante R₈₋₁₀ a segregação (3 Sensíveis : 1 Resistente) poderia ser explicada se a mutação para resistência fosse devida a 2 genes diferentes, sendo que apenas uma das combinações daria o caráter resistente. Estes genes, pelo resultado da análise meiótica, deveriam estar suficientemente longe para segregarem independentemente.

Dos mutantes analisados meioticamente, apenas um não foi mapeado no grupo de ligação II. Este mutante (R₇₋₁₀) foi mapeado no grupo de ligação I, ligado ao gene bi.

Pelos dados da Tabela 18 parece existir três grupos de mutantes com relação à distância do gene que confere resistência ao BE e o gene wA₃. Os dados desta Tabela mostram também que os genes mutantes se encontram numa mesma região do

grupo de ligação II, o que pode indicar a existência de uma região cromossômica relacionada com resistência ao BE e à acriflavina, situação semelhante à descrita por CRANDALL e RICHTER (1973) em Hansenula wingei.

Os dados da Tabela 20 evidenciam que todos os genes testados, com exceção do Etba₁, são alelos do gene AcrA₁. A aparente segregação de um sensível para dois resistentes do mutante R₂₋₁₀ foi esclarecida pelo teste de alelismo, onde se pode evidenciar que se trata de um gene nuclear.

Seria conveniente em estudos complementares, realizar o teste de alelismo com os demais mutantes mapeados no grupo de ligação II visando estabelecer a sua localização.

Também em trabalhos posteriores, os mutantes considerados alelos pelo procedimento empregado, poderiam ser cruzados e, determinar se as mutações envolvem o mesmo sítio ou sítios diferentes. Este tipo de estudo foi conduzido em Aspergillus nidulans por TUYL (1977) com relação a mutantes resistentes ao benlate, evidenciando alteração em sítios diferentes.

5.5- Efeitos da riboflavina

Os dados da Tabela 21 mostram claramente o efeito da riboflavina sobre a ação inibitória do BE. Nota-se que a toxicidade do BE é neutralizada pela adição desta vitamina ao meio de cultura. Fato similar foi observado por ROPER e KÄFFER (1957) com relação à acriflavina utilizando-se ácidos nucleicos e, por WARR e ROPER (1965), com relação ao verde malaquita, mas não em relação à acriflavina, usando riboflavina.

Foi observado ainda uma grande redução do número de setores resistentes selecionados pelo BE do diplóide EtbA₁//MSE em presença de riboflavina (SCARAZZATTI e col., 1979).

Sabendo-se que a riboflavina age como coenzima de enzimas envolvidas no processo respiratório, poderia ser suposto que o BE poderia agir como um inibidor respiratório.

Vários dados podem ser encontrados na literatura visando esclarecer o mecanismo de ação desta droga e, todos demonstram que a ação é preferencialmente sobre a mitocôndria. Os organismos mais utilizados para este estudo são leveduras. Nestas pode-se demonstrar uma inibição seletiva do DNA-mitochondrial (DNA-mit) e degradação progressiva do DNA-mit pré-existente quando tratadas com BE (GOLDRING e col., 1970). Outro autor constatou que o BE inibe a transcrição do DNA-mit (FUKUHARA e KAJAWA, 1970). RIOU (1976) levantou algumas hipóteses para explicar a mutação causada pelo BE no DNA-mit: indução de ampliações de pequenas sequências de DNA ou deleções de outras ou ainda seleção de populações com diferenças de clivagem. Outros autores sugerem que a preferência do BE pelo DNA-mit é devido a capacidade da mitocôndria em concentrar BE (PENA e col., 1980).

5.6- Considerações sobre o mecanismo de resistência ao BE e à acriflavina

Em todos os mutantes analisados geneticamente, com exceção do R₇₋₁₀ o gene que confere resistência ao BE foi mapeado no grupo de ligação II. Em alguns destes mutantes foi feito

Tab.22: NOVA NOMECLATURA PARA OS MUTAN
 TES ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA AO
 BROMETO DE ETÍDIO OU ACRIFLAVINA

DENOMINAÇÃO ANTERIOR	NOVA DENOMINAÇÃO	TRABALHO
<u>Acr</u> A ₁	<u>Ear</u> A ₁	Roper e Käfer (1957)
<u>acr</u> B ₂	<u>ear</u> B ₂	Roper e Käfer (1957)
<u>Etb</u> A ₁	<u>Ear</u> C ₁	Scarazzatti e col. (1979)
R ₇₋₁₀	<u>ear</u> D ₁	Presente trabalho
R ₁₋₁₀	<u>Ear</u> A ₄	Presente trabalho
R ₂₋₁₀	<u>Ear</u> A ₅	Presente trabalho
R ₅₋₁₀	<u>Ear</u> A ₆	Presente trabalho
R ₁₋₇	<u>Ear</u> A ₇	Presente trabalho
E ₃₋₇	<u>Ear</u> A ₈	Presente trabalho

o teste de alelismo, como discutido no ítem 5.4 e, constatou-se que todos, exceto EtbA₁, são alelos de AcrA₁. Após este teste e o mapeamento, a designação dos mutantes foi mudada, como pode ser observado na Tabela 22.

Observando os mutantes alelos de AcrA₁ na Tabela 5 e nas Figuras 3 a 12, podemos notar algumas particularidades com relação à resistência dos diplóides.

Quando testados em BE, os diplóides apresentam um nível similar de resistência, exceto no caso do R₁₋₇, mas todos são semi-dominantes. Ao serem testados em acriflavina a situação se modifica, ficando o maior nível de resistência no mutante R₁₋₇, que se mostra dominante e, o menor em E₃₋₇. Foi descrito por TUYL (1977), em Aspergillus nidulans, como discutido no ítem 5.3, respostas diferentes de diplóides à drogas para as quais foi constatada resistência cruzada.

Apesar de não ter sido estudado no presente trabalho o mecanismo de resistência das linhagens mutantes obtidas, a situação descrita poderia ser interpretada da seguinte maneira:

Haveria uma interação entre produtos do mesmo gene, tanto do mutante como do gene normal, cuja atuação contra a toxidez das duas drogas seria semelhante (mutante R₁₋₁₀, R₂₋₁₀ e R₅₋₁₀, ver Tabela 5 e Figuras 3, 4 e 9) ou totalmente diferentes (mutantes R₁₋₇ e E₃₋₇, ver Tabela 5 e Figuras 6, 7, 11 e 12).

A interação poderia ser visualizada de tal maneira que o "alvo" ou "alvos" a serem atingidos pelas moléculas das

duas drogas seriam parcialmente recompostos, conduzindo à níveis de resistência semelhantes às duas drogas ou seriam recompostos de tal maneira que tanto é constatada uma sensibilidade similar à linhagem haplóide sensível (E_{3-7}) como resistência similar ao haplóide resistente (R_{1-7}).

Estudos em nível bioquímico das alterações ocorridas nos mutantes poderiam elucidar o "alvo(s)" que são afetados por BE ou acriflavina e, esclareceriam as razões da variação do nível de resistência nos diplóides heterozigotos bem como a ação da riboflavina no efeito tóxico do BE.

5.7- Nova denominação proposta para os genes estudados

Tendo em vista os resultados discutidos nos itens 5.3 e 5.4, do presente trabalho, uma nova denominação é tentativamente proposta para os genes envolvidos na resistência ao BE e acriflavina. Esta nova denominação envolve três letras:

1^a) E de etídio; 2^a) a de acriflavina e 3^a) r de resistência

Sendo assim na primeira coluna da Tabela 22 estão discriminadas as denominações propostas por ROPER e KÄFFER (1957) e SCARAZZATTI e col., (1979) e, na segunda coluna, a proposição desta tese. Por exemplo, o mutante AcrA₁ descrito no primeiro trabalho passa a ser EarA₁.

Esta nomenclatura poderá ser revisada no momento em

que as alterações em nível bioquímico forem determinadas por-
rêm, no estágio atual representam melhor o conhecimento dispo-
nível.

6- CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

a- Aproximadamente 50% das colônias isoladas como mutantes apresentaram resistência ao Brometo de Etídio (BE) ao serem retestadas, sendo que destas, 75% são mutantes selecionados após tratamento com luz ultravioleta e, 25%, mutantes selecionados espontaneamente.

b- Foi constatado resistência cruzada em todos os mutantes obtidos em BE para acriflavina, mas o RC_{50} em acriflavina é maior que o RC_{50} em BE na maioria das linhagens haplóides resistentes.

c- A maioria dos genes que conferem resistência ao BE comportou-se como semi-dominantes em BE, sendo que em acriflavina 50% dos mutantes apresentaram interação alélica diferente da apresentada em BE.

d- Nas linhagens mutantes testadas os determinantes para resistência apresentaram-se como genes nucleares, com exceção do mutante R_{8-10} , onde foi evidenciado o envolvimento de 2 genes.

e- Os testes de alelismo mostraram que todos os genes estudados, com exceção do $EtbA_1$, são alelos do gene $AcrA_1$.

f- Puderam ser descritos 2 novos genes (EarC e EarD) envolvidos na resistência ao BE, havendo portanto um mínimo de 4 considerando os resultados de ROPER e KÄFFER (1957).

7- RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo isolar e analisar geneticamente mutantes de Aspergillus nidulans resistentes ao Brometo de Etídio (BE), bem como estudar os efeitos da riboflavina em relação a toxicidade do BE.

Foram isolados mutantes espontâneos e induzidos. Dos mutantes isolados espontaneamente apenas 3 continuaram a apresentar resistência, sendo 1 da linhagem A e 2 da linhagem biA₁ methG₁. Os outros mutantes (16) foram obtidos por indução com luz ultravioleta. Destes apenas 9 colônias continuaram a apresentar resistência ao serem retestados.

Todos os mutantes apresentaram também resistência cruzada para acriflavina.

Com relação à interação alélica, a maioria das mutações apresentaram-se como semi-dominantes ao BE, com exceção dos mutantes R₇₋₁₀, R₈₋₁₀ (recessivos) e R₉₋₁₀ (dominante), enquanto que os resultados para a interação alélica em acriflavina mostraram que algumas mutações são semidominantes (4), outras são dominantes (2) e outras recessivas (6).

A maioria dos mutantes analisados foram mapeados no grupo de ligação II, com exceção do R₇₋₁₀, que foi mapeado no grupo de ligação I e dos mutantes R₈₋₁₀ e R₉₋₁₀ que não puderam ser mapeados.

Foi feito teste de alelismo com algumas linhagens resistentes ao BE para verificar se os genes mapeados no grupo

de ligação II eram ou não alelos ao gene AcrA₁, mapeados por ROPER e KÄFFER (1957). A escolha das linhagens para o teste foi feito de acordo com a distância do marcador para resistência do gene wA₃. Todas as linhagens testadas mostraram ser alélicas de AcrA₁.

Tendo em vista todos os resultados obtidos foi proposta sua nova denominação para os mutantes isolados neste trabalho e os descritos por ROPER e KÄFFER (1957) a qual combina as iniciais E (de etídio), A (de acriflavina) e R (de resistência). Assim o mutante AcrA₁ passa a ser EarA₁; o mutante EtbA₁, EarC₁ e assim por diante, dependendo da ordem em que foi descrito.

Observou-se ainda o efeito da riboflavina na ação tóxica do BE pois, a presença desta vitamina no meio de cultura tem um efeito antagônico com relação a toxicidade do BE, o que não foi constatado em relação à acriflavina.

8- SUMMARY

In the present work we intended to isolate Aspergillus nidulans mutants showing resistance to ethidium bromide (EB), aiming to analyse them genetically as well as to study the effects caused by the riboflavine in relation to the EB toxicity.

Spontaneous and induced mutants were isolated. Only three out of the spontaneous mutants continued to show resistance: one from the A strain and two from the bi A₁ methG₁ strain. The other mutants (16) were obtained after induction with ultraviolet light but only 9 colonies maintained resistance after further testing.

All mutants thus obtained also showed cross-resistance to acriflavine.

As far as allelic interaction is concerned, most of the mutations showed to be semi-dominant to EB, except for R₇₋₁₀, R₈₋₁₀ (recessive) and R₉₋₁₀ (dominant). The results for the acriflavine allelic interaction showed semi-dominant (4), dominant (2) and recessive (6) mutations.

Most of the mutants studied were mapped in the linkage group II, with the exception of R₇₋₁₀, mapped in the linkage group I and the mutants R₈₋₁₀ and R₉₋₁₀ which mapping could not be achieved.

Test for allelism were undertaken with some resistant strains to show whether the genes mapped to the group of linkage II were allelic or not to the Acr A₁ gene, mapped by ROPER & KÄFFER (1957). The distance of the resistance marker to the wA₃ gene was taken as a basis in the choice of the strains to be tested.

Based on the reported results a new denomination for the mutants here isolated as well as for those described by ROPER & KÄFFER (1957) is proposed, using the following letters: E (from ethidium), A (from acriflavine) and R

(from resistance). Thus, the AcrA₁ mutant would be identified as EarA₁, the EtbA₁ as EarC₁ and so far, depending upon the sequence of its description.

Furthermore, when present in the culture medium riboflavin showed an antagonistic effect in relation to the EB toxicity. The same was not found in the case of acriflavine.

9 - BIBLIOGRAFIA CITADA

- APIRION, D., 1962. A general system for automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice versa in micro-organisms. Nature, 195:959-961.
- APIRION, D., 1965. The two-way selection of mutants and revertants in respect of acetate utilization and resistance to fluoroacetate in Aspergillus nidulans. Genetical Research, 6: 317-329.
- ARMITT, S., W. McCULLOUGH C.F. ROBERTS, 1976, Analysis of acetate non-utilizing (acu) mutants in Aspergillus nidulans Journal of General Microbiology, 92: (2) 262-282.
- ARST, H.N. e D.J. COVE, 1969. Methylammonium resistance in Aspergillus nidulans, Journal of Bacteriology, 98:1284-1293.
- AZEVEDO, J.L. e J.C.S. CAVENAQUE, 1968. Isolamento de mutantes deficientes em lisina que não são inibidos por arginina em Aspergillus nidulans. Ciência e Cultura, 20 (2):165.
- AZEVEDO, J.L. e S.O.P. COSTA, 1973. Exercícios práticos de genética. Ed. Melhoramentos, S. Paulo - 228 p.
- AZEVEDO, J.L., A. OLIVEIRA e A.J. ROCHA CAMPOS, 1976. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. Summa Phytopathologica, 2: 237-241.
- AZEVEDO, J.L., E.P. SANTANA e R. BONATELLI Jr., 1977. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-oxathin in Aspergillus nidulans, Mutation Research, 48: 163-172.
- BAGLIONI, C. e P. MARONEY, 1981. Inhibition of double-stranded RNA activated protein kinase and 2', 5' -oligo (adenylic acid) polymerase by ethidium bromide. Biochemistry 20 (4): 758:762.
- BARACHO, E.R., R. VENCOVSKI e J.L. AZEVEDO, 1970. Correlation between size and hibrid or selfed state of the cleistotecia in Aspergillus nidulans. Transaction of the British Mycological Society, 54 (1): 109-116.
- BONATELLI Jr., R. e J.L. AZEVEDO, 1977. Effects of ethidium bromide in diploid and duplication strains of Aspergillus nidulans, Experientia, 33: 311.

- BORDIGNON de OLIVEIRA, L.M.M., 1978. Resistência à arginina em linhagens deficientes para a síntese de lisina em Aspergillus nidulans. Dissertação apresentada a ESALQ/USP, para obtenção do título de mestre. 116p. Piracicaba, São Paulo.
- BROWNLEE, G., M.D. GOSS., L.G. GOODWIN, M. WOODBINE e L.P. WALLS, 1950. Chemoterapeutic action of phenanthridine compounds. I- Trypanosoma congolense and Trypanosoma rhodesiense. British Journal of Pharmacology 5: 261-276.
- BRUNNER, A., N. CARRASCO e A. PEÑA, 1982. Correlation between resistance to ethidium bromide and changes in monovalent cation uptake in yeast. Archives of Biochemistry and Biophysics. 217 (1):30-36.
- CRANDALL, M. e R.H. RICHTER, 1973. Genetics of resistance of ethidium bromide in the petite - negative yeast Hansenula wingei. Molecular General Genetics, 125: 279-293.
- DARLINGTON, A.J. and C. SCAZZOCHIO, 1967. Use of analogues and the substrate sensitivity of mutants in analogues of purine uptake and breakdown in Aspergillus nidulans. Journal Bacteriology, 93: 937-940.
- DAVIDSE, L.C. e W. FLACH, 1977. Differential binding of methyl benzimidazol carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of Aspergillus nidulans. Journal of Cell Biology, 72(1):174-193.
- DEKKER, J., 1976. Acquired resistance to fungicides. Annual Review Phytopathology, 14: 405-428.
- DORN, G.L., 1967. A revised linkage map of the eight linkage groups of Aspergillus nidulans. Biochemica and Biophysica Acta, 132: 190-193.
- DRAINAS, C., J.R. KINGHORN e J.A. PATEMAN, 1977. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in Aspergillus nidulans. Journal of General Microbiology, 98(2):493-501.
- ELISBÃO, T. e J.L. AZEVEDO, 1983. A simple method using Aspergillus nidulans for the detection of mutagenic agents. Revista Brasileira de Genética. VI:591-597.

- ELORZA, M.V., 1969. Toxicidad de los iones metalicos para Aspergillus nidulans. Microbiologia Espanola, 22: 131-138.
- ELORZA, M.V. e H.N. ARST, 1971. Sorbose resistant mutant of Aspergillus nidulans. Molecular General Genetics. 111: 185-193
- EVSEEVA, G.V. e S.V. KAMENEVA, 1977. Genetic of sensitivity to mutagenic factors in Aspergillus nidulans: Part VII - Investigation of cross sensitivity to different mutagenic factors in uvs mutants. Genetika, 13(11): 1981-1987.
- FLEMING, J.E., H.A. Leon e J. MIQUEL, 1981. Effects of ethidium bromide on development and aging of Drosophila melanogaster: Implications for the free radical theory of aging. Experimental Gerontology, 16(3):287-293.
- FUKUHARA, H. e C. KAJAWA, 1970. Seletive inhibition of the "in vivo" transcription of mitochondrial DNA by ethidium bromide and by acriflavin. Biochemical and Biophysical Research Communications. 41(4): 1002-1008.
- FUKUNAGA, M. e K.L. YIELDING, 1981. Induction of petite "mutants" in an ethidium - resistant strain of Saccharomyces cerevisiae by photoaffinity labeling. Mutation Research. 80: 91-97.
- GEORGOPOULOS, S.G. e I. GEORGADIS, 1969. Iodoacetate resistance and radiosensitization of conidia of Aspergillus nidulans. Radiation Botany, 9: 69-73.
- GOLDRING, E.S., L.I. GROSSMAN, D. KRUPNICK, D.R. CRYER e J. MARMUR, 1970. The petite mutation in yeast:: Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. Journal of Molecular Biology. 52: 323-335.
- GOUHIER, M. e J.C. MOUNOLOU, 1973. Yeast mutants resistant to ethidium bromide. Molecular General Genetics, 122:149-164.
- GOVORUNOV, I.G., N.V. KOSAREV, Yu.V. EVTODIENTO e E.O. PUCHKOV, 1982. Membrane permeability of Escherichia coli cell envelope for ethidium bromide. Microbiology, 51(5): 587-589.
- GRIMM, K., 1980. Mutation to acriflavine resistance in some Mycobacteria. Microbios, 27: 193-206.

- GRIMWOOD, B.G. e R.P. Wagner, 1976. Direct action of ethidium bromide upon mitochondrial oxidative phosphorylation and morphology. Archives of Biochemistry and Biophysics, 176:43-52.
- GUNATILLEKE, I.A.V.N., G. SCAZZOCHIO e H.N. ARST, 1975. Cytoplasmatic and nuclear mutations to chloramphenicol resistance in Aspergillus nidulans. Molecular General Genetics, 137: 269-276.
- HASTIE, A.C., 1970. Benlate- induced instability of Aspergillus diploid. Nature, 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.
- KÄFFER, D., 1962. A general systems for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice versa in micro-organisms. Nature, 195: 959-961.
- LACAVA, P.M. 1979a. Comportamento "in vitro" do fungo Aspergillus nidulans em resposta ao fungicida Plantvax. Revista Microbiológica (S.Paulo), 10(1): 22-25.
- LACAVA, P.M., 1979b. Resistência genética do Aspergillus nidulans ao fungicida Benomil. Revista Microbiológica.(S.Paulo), 10(1):26-29.
- LEVY, A. e A. ASHRI, 1975. Ethidium bromide - An efficient mutagen in higher plants. Mutation Research, 28:397-404.
- MARAKHOVA, I.I., T.V. POSPELOVA, A.A. VERENINOV e T.N. IGNATOVA, 1981. Changes in the transport of alkaline cations in CHO-K1 cell lines resistant to ethidium bromide. Tsitologiya 23(1):410-418.
- McCULLY, K. 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., 1962. A new method of estimating forward mutation in fungi. Resistance to 8-azaguanine and p-fluorophenylalanine. Scientific Reports Instituto Superiore di Sanità, 2: 9-12.

- NAGLEY, P. e J.S. MATTICK, 1977. Mitochondrial DNA replication in petite mutants of yeast: Resistance to inhibition by ethidium bromide, berenet and euflavina. Molecular General Genetics, 152: 277-283.
- NGA, B.H. e J.H. ROPER, 1968. Quantitative intrachromosomal changes, arising at mitosis in Aspergillus nidulans. Genetics, 58: 193-209.
- NIREMBERG, H.I. e J.B. SPEAKMAN, 1981. The pH dependence of mutagenicity of methyl benzimidazol - 2yl carbamate (MBC) towards Aspergillus nidulans(Eidam) winter and Cladosporium cucumerinum Ellis & Arth. Mutation Research. 88:55-59.
- PALMER, L.M., C. SCAZZOCHIO e D.J. COVE, 1975. Pyrimidine biosynthesis in Aspergillus nidulans: isolation and characterization of mutants resistant to fluoropyrimidines. Molecular General Genetics, 140:165-174.
- PEÑA, A., S.M. Clemente, M. BORBOLLA, N. CARRASCO e S. URIBE, - 1980. Multiple interactions of ethidium bromide with yeast cells. Archives of Biochemistry and Biophysics, 201(2):420-428.
- PIOTROWSKA, M., P.P. STEPIEN, E. BARTIK e E. ZAKRZEWSKA. 1976. Basic and neutral aminoacid transport in Aspergillus nidulans. Journal General Microbiology, 92: 89-92.
- PONTECORVO, G. e J.A. ROPER, 1952. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in Aspergillus nidulans. Journal General Microbiology, 6, vii.
- PONTECORVO, G., ROPER, J.A., HEMMONS, L.M. MAC DONALD, K.D. and BUFTON, A.W.J., 1953. The genetics of Aspergillus nidulans. Advances in Genetics. 5: 141-238.
- RICHMOND, M.H., 1962. The effect of aminoacid analogues on grow and synthesis protein in microrganisms. Bacteriological Review, 26: 398-420.
- RIOU, G. 1976. Establishment and characterization of Trypanosoma cruzi strains resistant to ethidium bromide. Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships (Van den Bossch, H. ed.), pp.237-244.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi - Experientia, 8: 14-15.

- ROPER, J.A. and KÄFFER, E. 1957. Acriflavine-resistant mutants of Aspergillus nidulans. Journal General Microbiology. 16: 660-667.
- ROWLANDS, R.T. e G. TURNER, 1973. Nuclear and extranuclear inheritance of oligomycin resistance in Aspergillus nidulans. Molecular General Genetics, 126: 201-216.
- ROWLANDS, R.T. e G. TURNER, 1977. Nuclear - extra-nuclear interaction affecting oligomycin resistance in Aspergillus nidulans. Molecular General Genetics, 154: 311-318.
- SANTANA, E.P., 1974. Alteração na frequência de recombinação mitótica e mutantes resistentes a fungicidas em Aspergillus nidulans. Dissertação apresentada a ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre. 63p. Piracicaba, São Paulo.
- SCARAZZATTI, M.E., R. BONATELLI Jr e J.L. AZEVEDO, 1979. Resistance to ethidium bromide in Aspergillus nidulans. Experientia, 35: 307.
- SINGH, M., S. SRIVASTAVA e U. SINHA, 1977. Carbon and nitrogen utilization and p-fluorophenylalanine - resistance in Aspergillus nidulans. Transaction of the Mycological Society of Japan, 18 (3): 257-263.
- SINGH, M. e U. SINHA, 1979. Isolation and characterization of a new class of amino acid-analog-resistant mutants in Aspergillus nidulans, using reduced carbon flow. Genetical Research 34 (2): 121-130.
- SINHA, U., 1967. Aromatic amino acid biosynthesis and p-fluoro phenylalanine resistance in Aspergillus nidulans. Genetical Research, 10: 261-272.
- SLONIMSKI, P.P., G. PERRODIN e J.H. CROFT, 1968. Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal "petites". Biochemical and Biophysical Research Communications. 30: 232-239.
- SPEAKMAN, J.B. e H.I. NIREMBERG, 1981. Mutagenicity of methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) towards Aspergillus nidulans (Eidam) winter and Cladosporium cucumerinum Allis & Arth. Mutation Research, 88: 45-52.

- SRIVASTAVA, S. e U. SINHA, 1976. Six new loci controlling resistance to p-fluorophenylalanine in Aspergillus nidulans. Genetical Research 25: 29-38.
- TANIDA, S., M. IZAWA e T. HASEGAWA, 1981. Ansamitocin analogs from a mutant strain of Nocardia: 1-Isolation of the mutant, fermentation and antimicrobial properties. Journal of Antibiotics (Tokyo) 34 (5): 489-495.
- THRELFALL, R.J., 1968. The genetics and biochemistry of mutants of Aspergillus nidulans resistant to chlorinated nitrobenzenes. Journal of General Microbiology, 52:35-44.
- TUYL, J.M., L.C. DAVIDSE e J. DEKKER, 1973. Acquired resistance to benomyl and thiabendazol in Aspergillus nidulans. 2nd. International Congress of Plant Pathology. Mireapolis.
- TUYL, J.M., 1977. Genetics of fungal resistance to Systemic Fungicides. Mededelingen Landbouwhogeshool Wageningen, 77:1-136.
- WARR, J.R. and J.A. ROPER, 1965. Resistance to various Inhibitors in Aspergillus nidulans. Journal of General Microbiology, 40: 273-281.
- WHITE, G.A., G.D. THORN e S.G. GEORGOPOULOS, 1978. Oxathiin carboxamides highly active against carboxin-resistant succinic dehydrogenase complexes from carboxin-selected mutants of Ustilago maydis and Aspergillus nidulans. Pesticide Biochemistry and Physiology, 9(2):165-182.
- WISEMAN, A. e G. ATTARDI, 1978. Reversible tenfold reduction in mitochondrial DNA content of human cells treated with ethidium bromide. Molecular General Genetics, 167: 51-53.
- WRIGHT, M.D., K.L. WILLIAMS e P.C. NEWELL, 1977. Ethidium bromide resistance: A selective marker located on linkage group IV of Dictyostelium discoideum. Journal of General Microbiology, 102: 423-426.
- YIELDING, L.W., B.R. BROWN, D.E. GRAVES e K.L. YIELDING, 1979. Ethidium bromide enhancement of frameshift mutagenesis caused by photoactivatable ethidium analogs. Mutation Research, 63: 225-232.

ZINCHENKO, V.V. e I.V. BIRYUKOVA, 1980. Genetic control of the pathways of pyrimidine metabolism in Aspergillus nidulans: 1-Isolation and genetic analysis of mutants resistant to 6-azauracil. Genetika 16(9): 1551-1555.