

BRÍGIDA THAÍS LUCKWÜ DE LUCENA

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS CROMOSSÔMICOS
EM LINHAGENS DE LEVEDURAS DE
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

RECIFE

2004

BRÍGIDA THAÍS LUCKWÜ DE LUCENA

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS CROMOSSÔMICOS EM
LINHAGENS DE LEVEDURAS DE FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Genética da Universidade
Federal de Pernambuco para obtenção do
grau de Mestre em Genética**

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Ardaillon Simões

RECIFE

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DE

BRÍGIDA THAÍS LUCKWÜ DE LUCENA

**“Análise de Polimorfismos Cromossômicos em Linhagens de Leveduras de
Fermentação Alcoólica”**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA MOLECULAR

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **Brígida Thaís Luckwü de Lucena** aprovada com distinção.

Recife, 12 de fevereiro de 2004



Prof. Ana Maria Benko-Iscopon (PhD, UFPE)



Prof. Maria Raquel Moura Coimbra (PhD, UFRPE)



Prof. Janete Magali de Araújo (PhD, UFPE)

*A Deus minha fonte inesgotável de inspiração,
que sempre me fortalece. E aos meus Pais que
me direcionaram nos caminhos certos da vida,
estando sempre ao meu lado, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior, pela oportunidade concedida, pelo conhecimento transmitido, enfim pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Diogo Ardaillon Simões, por seus ensinamentos, pelo exemplo de simplicidade e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao Prof. José Otamar F. Moraes, pelo seu exemplo de vida e profissionalismo, agradeço pela oportunidade de com ele ter convivido e por todos os ensinamentos que recebi.

A todos do laboratório de práticas de fermentação do departamento de antibióticos, em especial a Marcela e Ivanilda, pelo auxílio em parte dos experimentos. Obrigado por tudo.

A todos os colegas do Setor de Biologia Molecular –LIKA, pelos momentos de convivência, e de maneira especial àqueles que estavam sempre dispostos a escutar os meus desabafos.

Aos colegas de turma do mestrado: Nilmara, Márcio, Amaro, Christian, Sandra, Raquel, Alessandra, Luciene, Klébia, Márcia por terem dividido comigo os primeiros desafios desta etapa.

Aos amigos Michelle Rose, Norma Gusmão e Bruno Machado Leão que mesmo à distância sempre me apoiaram.

A Humberto, por toda a paciência, pela amizade, companheirismo, dedicação, cumplicidade, preocupação, por estar sempre ao meu lado.

As minhas irmãs, Beatriz e Brunna, pelo convívio harmonioso e pelo apoio constante.

Aos meus Pais, Estanislau Barbosa de Lucena e Darcy Luckwü de Lucena, pelo exemplo que são em minha vida.

A Deus por tudo o que ele tem me propiciado e por me fortalecer nas dificuldades.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. As leveduras e o seu potencial biotecnológico.....	15
2.2. A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.3. Citologia e citogenética de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.4. Indústria Alcooleira.....	23
2.5. Técnicas utilizadas para a tipagem molecular.....	25
2.6. Rearranjos Cromossômicos.....	29
2.7. Dinâmica de populações microbianas.....	31
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
4. ARTIGO CIENTÍFICO	39
1. Introdução.....	42
2. Materiais e Métodos.....	44
3. Resultados.....	47
4. Discussão.....	50
5. Referências Bibliográficas.....	53
5. CONCLUSÕES	74
6. ANEXO	75

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1: Eletroforese em campo pulsátil de cromossomos da linhagem YPH80 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> migrado em gel de agarose a 1% através do sistema CHEF (BioRad).....	19
Figura 2: Segregação dos cromossomos da levedura <i>S. cerevisiae</i> dentro da estrutura nuclear, visualizada por hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH) aliada à microscopia de força atômica.....	21
Figura 3: Dinâmica do centrômero dos cromossomos de <i>S. cerevisiae</i> marcados por imunofluorescência pela fusão da proteína centromérica Cse4p a proteína GFP (Cse4–GFP).....	22
Figura 4: Mapa físico do genoma da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24

Artigo Científico

Figura 1: Perfis cariotípicos obtidos de isolados industriais pertencentes a o perfil P1 produzido por análise de <i>fingerprinting</i> utilizando o primer (GTG) ₅	61
Figura 2: Frequência de rearranjantes obtidos a partir do isolado IA1238 durante o ensaio fermentativo em condição de aerobiose.....	62
Figura 3: Frequência de rearranjantes obtidos a partir do isolado MF1(1) durante o ensaio fermentativo em condição de aerobiose.....	63
Figura 4: Eletroferograma dos rearranjantes obtidos a partir dos isolados IA1238 e MF1(1) durante o ensaio fermentativo em condição de aerobiose.....	64
Figura 5: Frequência de rearranjantes obtidos a partir do isolado JP1 durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose.....	65
Figura 6: Eletroferograma dos rearranjantes obtidos a partir do isolado JP1 durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose.....	66
Figura 7: Frequência de rearranjantes obtidos a partir do isolado MF1(1) durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose.....	67
Figura 8: Frequência de rearranjantes obtidos a partir do isolado IA1238 durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose.....	68

Figura 9: Eletroferograma dos rearranjantes obtidos a partir dos isolados IA1238 e MF1(1) durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose.....	69
Figura 10: Perfis (GTG) ₅ obtidos a partir do isolado IA1238 durante o ensaio fermentativo em condição de aerobiose.....	70
Figura 11: Perfis (GTG) ₅ obtidos a partir do isolado MF1(1) durante o ensaio fermentativo em condição de aerobiose.....	71
Figura 12: Perfis (GTG) ₅ obtidos a partir do isolado JP1 durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose	72
Figura 13: Perfis (GTG) ₅ obtidos a partir do isolado MF1(1) durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose.....	73
Figura 14: Perfis (GTG) ₅ obtidos a partir do isolado IA1238 durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose.....	74

Anexo 1

Figura A1: Perfis cariotípicos obtidos a partir do ensaio fermentativo em aerobiose com o isolado IA1238.....	77
Figura A2: Perfis cariotípicos obtidos a partir do ensaio fermentativo em aerobiose com o isolado MF1(1).....	78
Figura A3: Perfis cariotípicos obtidos a partir do ensaio fermentativo em anaerobiose com o isolado MF1(1).....	79
Figura A4: Perfis cariotípicos obtidos a partir do ensaio fermentativo em anaerobiose com o isolado IA1238.....	80
Figura A5: Perfis cariotípicos obtidos a partir do ensaio fermentativo em anaerobiose com o isolado JP1.....	81
Figura A6: Perfis cariotípicos obtidos a partir do ensaio fermentativo em anaerobiose com o isolado JP1.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Constituição dos meios de cultura WLN e MF.....	58
-----------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIACÕES

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)

FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*, Hibridização Fluorescente *In Situ*)

GFP (*Green Fluorescent Protein*, Proteína Verde Fluorescente)

ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*, Sequências Simples entre Repetições)

mtDNA (DNA mitocondrial)

PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Reação em Cadeia da Polimerase)

PFGE (*Pulsed Field Gel of Electrophoresis*, Gel de Eletroforese em Campo Pulsátil)

RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*, Polimorfismo de DNA gerado por Amplificações Aleatórias)

rDNA (DNA ribossômico)

RNA_m (RNA mensageiro)

RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism*, Polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição)

SDG (*Saccharomyces Genome Database*, Banco de Dados do Genoma de *Saccharomyces*)

Resumo

O bioetanol é hoje a principal fonte de energia renovável e não poluente, tendo sua produção recebido grande incentivo nos últimos anos. O Brasil é atualmente o maior produtor de álcool mundial, sendo responsável por uma produção anual de aproximadamente 10,4 bilhões de litros. A produção de álcool no Brasil ocorre através da fermentação do caldo de cana-de-açúcar e/ou melação por células de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Estudos de caracterização da dinâmica populacional do processo fermentativo têm sido feitos com o objetivo de se identificar linhagens mais adaptadas aos diferentes processos industriais para servirem de inóculo inicial na safra. O objetivo deste trabalho é investigar os rearranjos cromossômicos de isolados industriais de *Saccharomyces cerevisiae* através do monitoramento em laboratório da estabilidade cromossômica. O polimorfismo cromossômico foi evidenciado tanto em aerobiose quanto em anaerobiose. Os isolados MF1(1) e IA1238 apresentaram rearranjantes capazes de substituir o parental ao longo do processo. O isolado JP1, apesar de apresentar o maior polimorfismo, manteve o perfil parental ao longo do processo com frequências entre 25% e 30%. Portanto, a cariotipagem molecular pode ter sua aplicabilidade prejudicada em estudo de dinâmica populacional de processos industriais de fermentação alcoólica, pois a ocorrência de rearranjos cromossômicos poderia levar à imprecisão nos resultados e análise dos dados.

Abstract

Nowadays, the bioethanol is the main renewable and non-polluting energy source and, therefore, its production has been receiving large incentive. Currently, Brazil is the main ethanol producer in the world, being responsible for an annual production of approximately 10,4 billion liters. The alcohol production in Brazil occurs through the fermentative process using sugar cane juice and/or molasses as substrate by cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization studies of population dynamic of fermentative process has been done with the objective to identify more adapted strains to the different process that could be used as initial crop inoculate. The aim of this work was to investigate the chromosomal rearrangements in industrial isolates of *S. cerevisiae* through laboratory chromosomal stability experiments. The chromosomal polymorphism was evidenced in both aerobiosis and anaerobiosis conditions. The isolates MF1 (1) and IAI238 presented rearrangements able to substitute the parental along the process. For the isolate JP1, although presenting the highest polymorphism, the parental profile was maintained along the process in a frequency of 25% to 30%. Those results shows that chromosomal instability takes place in industrial yeast strains under laboratory condition, and that different strains presents their own pattern of genome rearrangement. Therefore, the use of molecular karyotyping in the evaluation of the population dynamic in industrial alcoholic fermentation can be impaired by the occurrence of chromosomal rearrangements, possibly leading to imprecision in the results and data analysis.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As leveduras são microrganismos eucariontes e constituem um dos mais importantes grupos de microrganismos comercialmente explorados. Seu alto valor comercial decorre de sua aplicação biotecnológica em diversas indústrias, dentre as quais a de maior destaque é a que utiliza processos fermentativos (vinho, cerveja, cachaça, álcool combustível e pão).

Diversos estudos têm mostrado que um grande número de linhagens de leveduras, principalmente de *Saccharomyces cerevisiae*, pode estar simultaneamente envolvido no processo de fermentação, seja do vinho ou de caldo-de-cana para produção de aguardente ou álcool combustível (Bidene et al., 1992; Vezinhet et al., 1990; Pataro et al., 2000; Guerra et al., 2001; Lucena, 2002; Bacelar, 2003; Silva Filho, 2003). Neste contexto, a identificação e caracterização de leveduras são de grande importância para processos industriais de fermentação, pois a qualidade do produto final obtido é, dentre outras coisas, consequência da diversidade e da composição dos microrganismos e da dinâmica das populações presentes durante o processo.

Diferentes técnicas baseadas na análise do polimorfismo de DNA têm sido utilizadas no estudo de identificação e caracterização de leveduras envolvidas em processos de fermentação industrial, dentre quais pode-se citar: a cariotipagem molecular, as técnicas de hibridização (RFLP e ribotipagem) e as análises de polimorfismos baseadas em marcadores de PCR (RAPD, ISSR, ribo-PCR, etc.).

A técnica de Cariotipagem Molecular utilizando eletroforese em campo pulsátil (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE) foi introduzida por Schawartz e Cantor (1984), sendo utilizada posteriormente por vários autores (Carle e Olson, 1985; Cantor et al., 1988; Chu et al., 1986; Johnston et al., 1988). Esta técnica constitui-se em um tipo especializado de eletroforese, que é capaz de separar moléculas de DNA muito longas, tais como cromossomos

inteiros. Como os cromossomos dos fungos são pequenos para os padrões eucarióticos, cromossomos inteiros podem ser visualizados por esta técnica.

A cariotipagem tem sido bastante utilizada no estudo de populações de leveduras do processo de produção de vinhos, e recentemente também na tipagem de leveduras envolvidas na produção de álcool carburante (Lopes, 2002; Lucena, 2002). No entanto, esta técnica é ainda laboriosa e demanda tempo, o que dificulta sua aplicação como uma rotina industrial. Além disso, os estudos de caracterização molecular através da técnica de cariotipagem molecular têm demonstrado uma variedade de perfis genéticos dada sua capacidade de detectar rearranjos cromossômicos, os quais não são revelados pelos outros métodos. Esta peculiaridade do método está começando ameaçar seu uso para a tipagem de linhagens de leveduras e estudos da dinâmica populacional de processos fermentativos. Entretanto, esta técnica se presta muito bem para avaliar a estabilidade genômica de uma população celular frente a diferentes condições ambientais. Com isso, questões como adaptabilidade celular e evolução genômica podem ser estudadas, comparando condições controladas de laboratório e condições de processos industriais.

Neste trabalho, a cariotipagem molecular foi utilizada para avaliar o polimorfismo cromossômico existente no processo de fermentação alcoólica e relacioná-lo com processos de recombinação genética mitótica em condições controladas de laboratório. Diferentes linhagens isoladas do processo industrial, e tipificadas através de marcadores de PCR, foram submetidas a cultivos sucessivos e analisadas. Os resultados mostraram uma diversidade de rearranjos cromossômicos que foram dependentes tanto das condições de cultivo quanto da linhagem utilizada. As implicações destes achados em termos de adaptabilidade e de utilização rotineira da cariotipagem para análise populacional são discutidos no texto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As leveduras e o seu potencial biotecnológico

As leveduras são microrganismos eucariontes unicelulares, pertencentes ao reino Fungi, ao filo Ascomycota, à ordem Saccharomycetales (Alexopoulos et al., 1996).

Estes microrganismos são heterotróficos, saprófitos ou parasitos. São dependentes de carbono orgânico como fonte de energia e podem ser encontrados em associação com vegetais, como em néctar de flores ou em frutos frescos ou deteriorados, ou ainda no trato digestivo de animais, no solo, em ambientes com baixa capacidade hídrica, bem como associados a qualquer substrato que lhe forneça o açúcar (Phaff, 1990; Alexopoulos et al., 1996).

A estrutura somática e o ciclo de vida das leveduras que compõem a ordem Saccharomycetales são muito variados, com algumas espécies sendo unicelulares e haplóides durante todo o ciclo celular e outras apresentando fases haplóide e diplóides durante o seu ciclo de vida. As formas partenogênicas ou assexuais podem permanecer haplóides, diplóides ou aneuplóides quanto ao seu número cromossômico. Algumas leveduras são capazes de produzir um número de brotos em sucessão que são mantidos juntos por um período de tempo, formando o que chamamos de pseudomicélio (Alexopoulos et al., 1996).

As leveduras podem apresentar reprodução sexuada e assexuada, embora seja a forma assexuada a mais comum. Em algumas leveduras do filo Ascomycota a única forma de reprodução é a assexuada que pode ser por brotamento, formação de conídios e artrósporos.

Dentro da ordem Saccharomycetales, a família que se destaca para a biotecnologia é a Saccharomycetaceae, pois engloba espécies que têm uma grande aplicabilidade para a indústria de fermentação. Dentro desta família incluem-se leveduras unicelulares, com

reprodução primariamente assexuada com brotamento multilateral e que produzem ascósporos livre de ascos, os quais se originam tanto de um zigoto como partenogeneticamente a partir de uma célula somática. O membro mais conhecido desta família é o gênero *Saccharomyces*, contudo também constituem essa família outros gêneros, como *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Dekkera* (Alexopoulos et al., 1996).

As leveduras constituem o mais importante grupo de microrganismos economicamente explorado pelo ser humano (Horii e Oettrer, 1998). Isto ocorre devido a sua importância para os processos fermentativos para produção de cerveja, pão, vinho e álcool combustível (Alexopoulos et al., 1996). Sendo também importantes para indústria farmacêutica, química, biomédica e tecnologia ambiental.

Estes microrganismos podem constituir uma ótima fonte não-convencional de proteínas e de vitaminas do complexo B, podendo ser utilizados para ração animal e para consumo humano em enriquecimento nutricional de alimentos, espessantes, espumantes e aromatizantes. Podem também ser obtidos através do crescimento de biomassa ou através do aproveitamento destes como subproduto de processos fermentativos (Horii e Oettrer, 1998).

O conhecimento empírico da fermentação por leveduras remonta aos primórdios da civilização. A capacidade destes microrganismos em produzir álcool em forma de cerveja já era conhecida pelos povos Babilônicos desde cerca de 6000 a. c. . Os Egípcios a 4000 a. c., por sua vez, já conheciam empiricamente a capacidade destes microrganismos de fermentar pão, enquanto que relatos sobre a fermentação do vinho podem ser encontrados no livro de Gênesis (Demain e Solomon, 1981).

Durante a Primeira Guerra Mundial, os avanços no campo da bioquímica permitiram identificar o metabolismo para produção de glicerol por leveduras em processos de fermentação alcoólica, sendo a produção aumentada quando se adicionava bissulfeto de sódio ao processo (Demain e Solomon, 1981). Isto permitiu o desenvolvimento da indústria de

fermentação, neste caso utilizada para produzir o glicerol que era utilizado em explosivos. Trata-se de um dos primeiros relatos da contribuição do conhecimento científico na produção industrial associado a processos microbiológicos.

Atualmente, as técnicas de engenharia metabólica de leveduras envolvidas em processos biotecnológicos apontam para uma terceira fase nos processos fermentativos. Através dessa nova ferramenta, tem-se procurado o melhoramento genético direcionado destes microrganismos com a finalidade de se obter aumento no rendimento e qualidade da produção.

2.2. A Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo eucarioto mais utilizado para estudos genéticos, este fato deve-se à facilidade e rapidez de seu crescimento, à existência de células haplóides e diplóides durante o seu ciclo de vida e ao seu pequeno genoma (Walker, 1998).

O genoma da *S. cerevisiae*, que já foi totalmente seqüenciado, contém aproximadamente 13 Mb, com poucos introns nas seqüências gênicas e pequenos trechos DNA repetitivo (Oliver, 1996). O cariótipo de linhagens de laboratório de *S. cerevisiae* apresenta cerca de 16 cromossomos entre metacêntricos, submetacêntricos a subtelocêntrico, e podendo ser separados através de eletroforese em campo pulsátil com os cromossomos variando entre 230 a 2000 Kb (Figura 1). Todas as linhagens desta espécie possuem um plasmídeo endógeno de 2 µm de diâmetro que é geneticamente detectado com o 17º grupo de ligação (Loidl, 2003).

As descrições de técnicas moleculares que envolvem manipulação gênica, aliadas às características fisiológicas e genéticas descritas acima fazem da *S. cerevisiae* um organismo

de escolha não só para estudos genéticos, como também para desenvolvimento de estratégias biotecnológicas (Walker, 1998).

Esta levedura tem sido muito utilizada na indústria fermentativa, para produção de pão, vinho, cerveja, sakê, cachaça, extrato de leveduras/vitaminas, probióticos, produção de álcool combustível, glicerol, invertases, ração animal e outras enzimas, dentre outros produtos. Células de *Saccharomyces cerevisiae* têm sido descritas como um hospedeiro ideal para a expressão de genes heterólogos que codificam proteínas de interesse industrial e farmacêutico, pelas suas características fisiológicas e genéticas bem documentadas, embora outras leveduras já desponhem neste cenário (Walker, 1998).

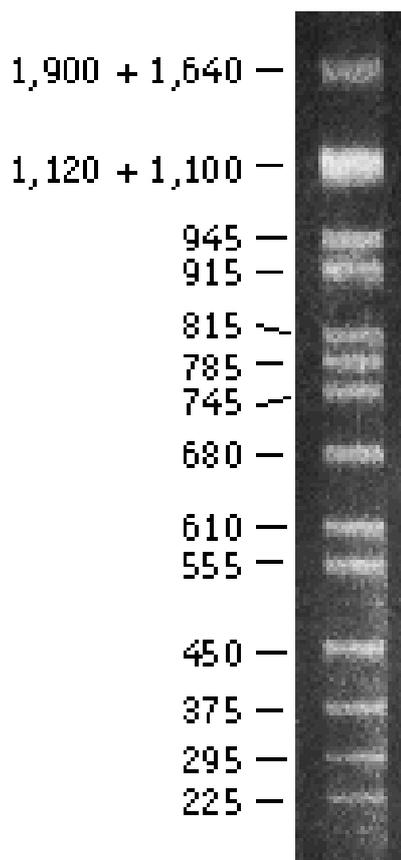


Figura 1: Eletroforese em campo pulsátil de cromossomos da linhagem YPH80 de *Saccharomyces cerevisiae* migrado em gel de agarose a 1% através do sistema CHEF (BioRad). À esquerda estão representados os tamanhos das bandas de cromossomos em kb. (Fonte: BioLabs Inc. <http://circuit.neb.com/neb/>).

Diversos estudos têm mostrado que um grande número de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* está simultaneamente envolvido no processo de fermentação de bebidas (Walker, 1998), bem como na fermentação de caldo-de-cana para produção de aguardente ou álcool combustível (Pataro et al., 2000; Guerra et al., 2001; Lucena, 2002; Bacelar, 2003; Silva Filho, 2003).

Tanto as linhagens isoladas em áreas tropicais como aquelas oriundas de processos fermentativos industriais podem apresentar formas genótípicas que diferem das linhagens de leveduras conhecidas (Pataro et al., 2000). As linhagens industriais, ao contrário das linhagens de referência ou de laboratório, são geneticamente mais complexas e não possuem estabilidade em seu estado haplóide, sendo as aneuploidias comuns em leveduras industriais (Walker, 1998).

Algumas características são desejáveis na levedura produtora de álcool tais como: rápida taxa de fermentação e alto rendimento em etanol; tolerância a alto teor de etanol e baixo pH, temperatura ótima elevada para fermentação; estabilidade genética, alta viabilidade celular, entre outras. Contudo não se possui uma linhagem com todas as características desejadas, o que proporciona um vasto campo de estudos da fisiologia e biotecnologia relacionada à produção de bioetanol (Walker, 1998).

2.3. Citologia e citogenética de *Saccharomyces cerevisiae*

Os cromossomos de *S. cerevisiae* não podem ser visualizados por métodos convencionais utilizados em estudos de citogenética. Apenas o estudo de bivalentes e do complexo sinaptonêmico, bem como a visualização do cromossomo em géis de eletroforese de campo pulsado, tem promovido uma melhor compreensão da estrutura e do comportamento cromossômico em leveduras de brotamento (Loidl, 2003).

Recentemente, com o desenvolvimento de técnicas como a hibridização *in situ*, e de metodologias de marcação fluorescente de cromossomos, tais como as técnicas de imunoenaios com anticorpos que reconhecem estruturas cromossômicas e as técnicas de pinturas cromossômicas por hibridização com sondas marcadas com *Green Fluorescent Protein* (GFP) capazes de marcar todas as regiões do cromossomo, permitindo um estudo sobre o comportamento, o estado de compactação e a orientação do cromossomo (Scherthan et al., 1992; Trelles-Sticken et al., 1999; Loidl, 2003).

Para *S. cerevisiae*, não existe uma metodologia de citogenética convencional que permita observar a condensação dos cromossomos durante a metáfase. A natureza dos cromossomos desta levedura está baseada no fato que estes permanecem aglomerados dentro do núcleo, onde permanecem confinados durante a divisão (Figura 2). Além disso, leveduras com genomas em torno de 13Mb por complemento haplóide parecem condensar seus cromossomos apenas moderadamente, o suficiente para alcançar a forma desejada para o transporte durante a mitose (Loidl, 2003).

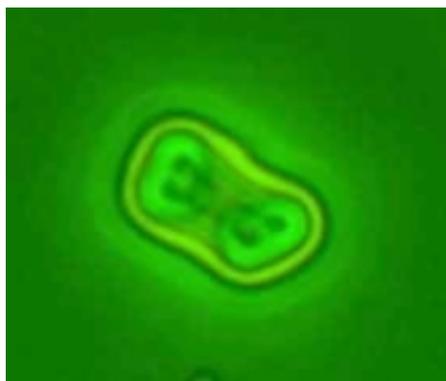


Figura 2: Segregação dos cromossomos da levedura *S. cerevisiae* dentro da estrutura nuclear, visualizada por hibridização fluorescente *in situ* (FISH, *Fluorescent In Situ Hybridization*) aliada à microscopia de força atômica (Fonte: T. Kobori, National Food Research Institute, Japão).

Cromossomos de *S. cerevisiae* podem ser visíveis sob a forma de bivalentes durante o paquíteno. Estes constituem um excelente objeto para investigações citológicas. O paquíteno é o único estágio em que cromossomos condensados podem ser visualizados através do corante

DAPI (Kuroiwa et al., 1984, 1986), devido à presença de complexos sinaptonêmicos que ajudam a preservar a integridade dos cromossomos durante a preparação citológica. Outro ponto importante é que o paquíteno é o único estágio do ciclo de vida da levedura no qual o cromossomo não é ligado ao fuso e deste modo são suficientemente separados para serem visualizados individualmente.

O maior obstáculo para o estudo de cromossomos de leveduras é o fato de que a mitose desses organismos ocorre dentro de uma membrana nuclear intacta, aliado ao baixo grau de condensação dos cromossomos durante a metáfase. A marcação das regiões centroméricas constitui uma alternativa para o estudo do processo de segregação cromossômica em leveduras (Figura 3). Contudo, a citologia de leveduras está limitada à análise de cromossomos meióticos e ao estudo de complexos sinaptonêmicos. O complexo sinaptonêmico aparece como uma estrutura distinta em todos os pares homólogos durante o paquíteno e, portanto são ótimos marcadores para rastrear cromossomos (Loidl, 2003).

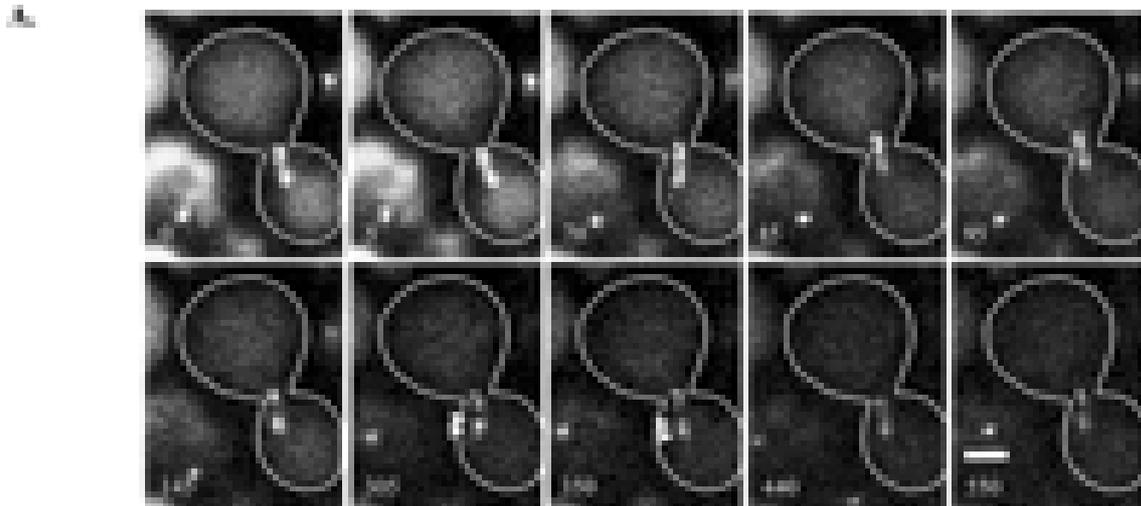


Figura 3: Dinâmica do centrômero dos cromossomos de *S. cerevisiae* usando marcação específica por imunofluorescência através da fusão da proteína centromérica Cse4p com a proteína GFP (Cse4-GFP). Cada painel representa a segregação de um dos cromossomos da levedura (Fonte: Pearson et al., 2001).

Byers e Goetsch (1975a, 1975b) construíram um mapa estrutural do cariótipo de *S. cerevisiae* baseado na extensão do complexo sinaptonêmico. Posteriormente, este mapa mostrou-se de acordo com o tamanho físico total descrito pelo projeto genoma e com a distribuição de bandas visualizadas em eletroforese de campo pulsátil (Loidl, 2003).

A análise do complexo sinaptonêmico tem se mostrado útil para a detecção de rearranjos cromossômicos e de cariótipos anormais, ajudando na caracterização de recombinações meióticas e/ou pareamentos mutantes em *S. cerevisiae* (Kupiec et al., 1997; Loidl, 2003).

Graças ao advento da genética e da biologia molecular, a *S. cerevisiae* está entre os poucos organismos em que a construção de mapas de ligação (Motimer e Schild, 1980) e mapas físicos dos cromossomos (Cherry et al., 2002) tem substituído a análise citológica para avaliação do “*status*” cromossômico (Loidl, 2003).

A *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a ter o seu genoma completamente seqüenciado através de um consórcio de laboratórios dos Estados Unidos, Europa e Japão (Oliver, 1996). Com isto, finalmente o mapa físico deste organismo foi completamente desvendado e a posição de cada um dos mais de 6400 genes (entre genes verdadeiros, os genes prováveis e os hipotéticos) devidamente anotados (Figura 4). Este mapa molecular está completamente de acordo com os mapas físicos e estruturais anteriormente descritos.

A descrição do genoma completo de *S. cerevisiae* pode ser encontrada no banco de dados SGD (*Saccharomyces Genome Database*) (www.yeastgenome.org). Além das seqüências de nucleotídios dos genes, a função biológica das proteínas codificadas e as características fisiológicas e genéticas dos mutantes para estes genes propiciam as informações necessárias para manipulações genéticas mais específicas.

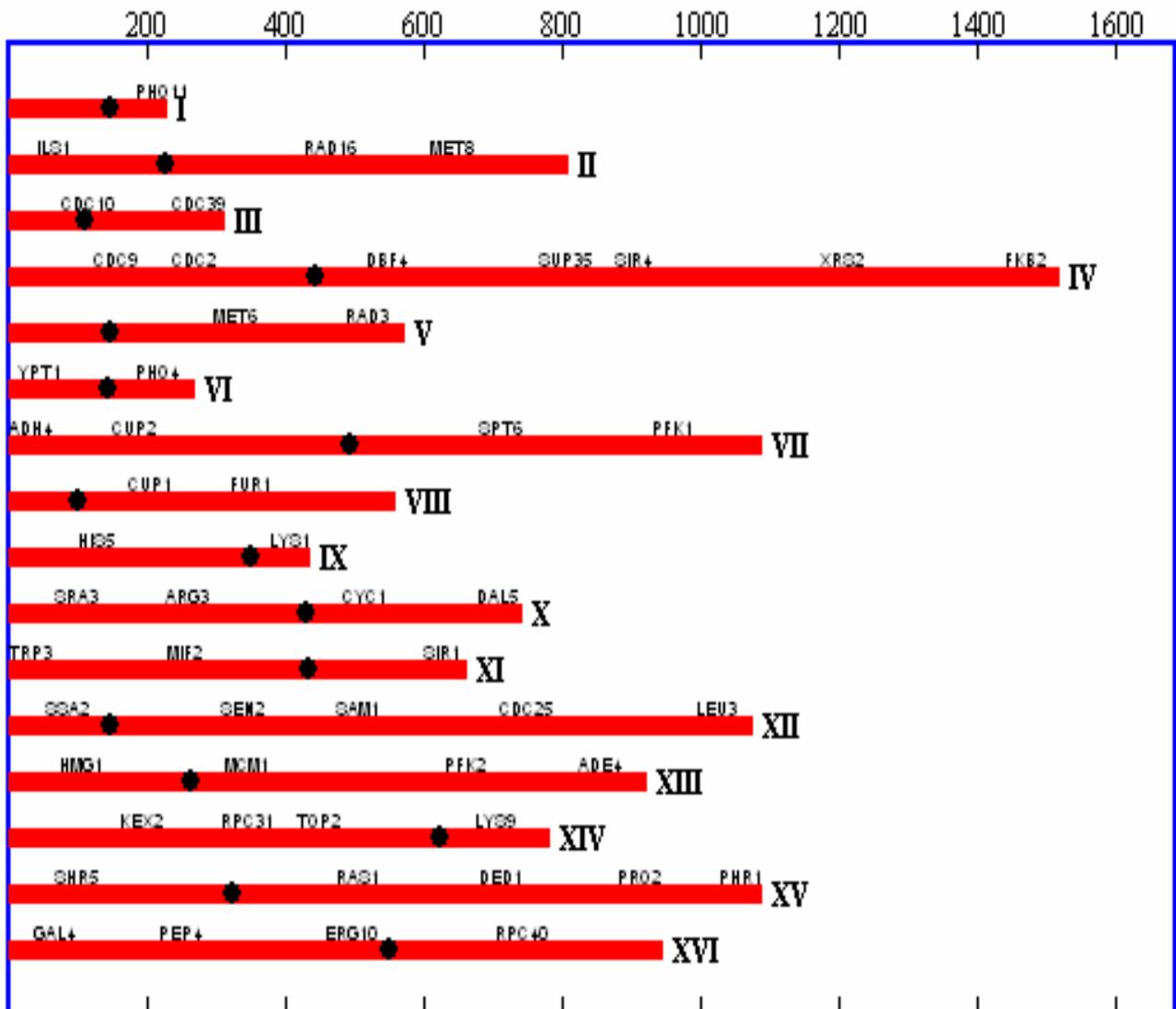


Figura 4: Mapa físico dos 16 cromossomos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como apresentado pelo SGD. Acima está apresentada uma escala de comprimento de moléculas de DNA, em kilobases, e ao lado de cada cromossomo está designado o grupo de complementação, determinado pelos experimentos de mapeamento genético descritos na literatura. (Fonte: www.yeastgenome.org).

2.4. Indústria Alcooleira

Com o desenvolvimento industrial crescendo rapidamente, existe a necessidade da obtenção de uma fonte de energia sustentável, como o bioetanol, termo que designa etanol obtido a partir da fermentação de microrganismos, constituindo-se em uma fonte atrativa de

energia renovável. Outros fatores contribuem para que o etanol se torne cada vez mais atrativo, dentre eles o fato de que este polui menos o meio ambiente quando comparado com os derivados do petróleo, suportado pela implementação de leis de proteção ambiental em muitos países, e por ser mais barato que os subprodutos do petróleo. A demanda por álcool combustível tem aumentado e a utilização de substratos mais baratos pode fazer deste produto uma fonte de combustível capaz de competir com o combustível fóssil (Zaldivar et al., 2001).

O primeiro e principal programa de incentivo à produção de álcool combustível (ProÁlcool) começou no Brasil em 1975, seguido por programas nos Estados Unidos da América em 1978 e mais recentemente no Canadá (Wheals et al., 1999).

O Brasil é o maior produtor mundial de álcool, seguido pelos Estados Unidos. Em 2001, a produção mundial de bioetanol foi de 33,6 bilhões de litros, sendo 2/3 produzidos no Brasil e nos EUA. A produção brasileira foi de 10,4 bilhões de litros o que representa 37% da produção mundial (www.unica.com.br), parte desse álcool utilizado para abastecer cerca de 3 milhões de veículos movidos a álcool hidratado e outra parte de álcool anidro para ser misturado à gasolina como aditivo.

O Brasil conta hoje com 284 usinas que fabricam o álcool combustível, das quais 74,6% localizam-se no Centro-Sul do país e 25,4% localizam-se no Norte-Nordeste. No Nordeste, a produção de bioetanol consiste em uma das principais atividades industriais da região da Zona-da-Mata, tendo no estado de Alagoas o seu maior produtor. Durante a safra 2002/2003, o estado de Pernambuco foi responsável pela produção de aproximadamente 306,2 milhões de litros de álcool (Silva Filho, 2003).

No Brasil, este processo baseia-se na atividade fermentativa de leveduras da espécie *S. cerevisiae* em caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço. Esse processo pode acontecer de maneira contínua, que consiste na fermentação através de dornas interligadas, ou em batelada, nas quais a fermentação ocorre em dornas individuais com capacidade de aproximadamente 1,5

milhões de litros de álcool por dia. Em ambos os processos, a levedura é separada do mosto fermentado por centrifugação e reutilizada em fermentações subseqüentes. Uma alta densidade de células, 8-17% em massa úmida, e temperaturas variando entre 33°C e 35°C contribuem para uma redução no crescimento celular, levando ao aumento nas concentrações (8-11% v/v) e nos rendimentos (90-92%) de etanol (Wheals et al., 1999).

O processo fermentativo para produção de álcool combustível é aberto e não controlado, de maneira que há uma substituição gradativa do inóculo puro inicial, geralmente uma levedura de panificação, por linhagens “selvagens”. Isto pode levar a uma queda no rendimento da produção do álcool combustível. Tal redução, muitas vezes, só pode ser revertida com a remoção da população microbiana presente e com a re-inoculação do sistema com a linhagem original, adicionando gastos nos custos de produção. Este processo ocorre durante todo o período de fermentação que pode durar mais de 200 dias (Basso et al., 1993).

Por esta razão, faz-se necessário diagnosticar a composição e a dinâmica das populações de leveduras existentes durante todo o processo fermentativo, a fim de exercer um controle microbiológico apropriado que assegure uma redução de custos. Além disso, a identificação e caracterização de leveduras são de grande importância para processos industriais de fermentação, pois a qualidade do produto final obtido (pão, vinho, cachaça ou álcool combustível) é uma consequência da diversidade e da composição dos microrganismos e da dinâmica das populações presentes durante o processo.

2.5. Técnicas utilizadas para a tipagem molecular

Diferentes técnicas baseadas na análise do polimorfismo de DNA têm sido utilizadas na identificação e na caracterização de leveduras envolvidas em processos de fermentação industrial, dentre outras se pode citar: mtDNA-RFLP (*Restriction Fragments Length*

Polymorphism of mtDNA, Polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição do DNA mitocondrial), RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*, Polimorfismo de DNA gerado por Amplificações Aleatórias), RFLP/rDNA (*Restriction Fragments Length Polymorphism of rDNA*, Polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição do DNA ribossomal), *DNA fingerprinting*, análise de Microssatélite e Cariotipagem Molecular.

O RAPD (Amplificação Aleatória do Polimorfismo de DNA) consiste em uma técnica que utiliza *primers* curtos aleatórios, que a baixas temperaturas hibridizam em *loci* distribuídos aleatoriamente no genoma. Tem como principal vantagem a utilização desses *primers* aleatórios, o que permite a sua utilização sem ser necessário o conhecimento do genoma a ser estudado. Contudo, apesar dessa técnica ser muito utilizada para discriminação inter e intra-específica em diversos organismos, possui como desvantagem sua baixa reprodutibilidade (Kurtzman, 1998; Gomes, et al., 2000).

A técnica RFLP/rDNA (Polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição) consiste na análise de restrição do produto de PCR de regiões do DNA ribossomal (rDNA). Uma das regiões muito explorada através dessa técnica é a região de ITS, que têm demonstrado alto poder discriminatório a nível interespecífico, sendo por isso utilizada como uma metodologia para rápida detecção de contaminantes em processos industriais de fermentação alcoólica (Guillamón, et al., 1998).

A técnica de *DNA fingerprinting* consiste em utilizar *primers* que hibridizam de forma específica em várias regiões do genoma do organismo alvo. Inicialmente, deve-se estabelecer o padrão mínimo de amplificação da espécie estudada, servindo como um primeiro parâmetro de distinção interespecífica. O polimorfismo do perfil de amplificação por estes *primers* deve refletir a variabilidade genômica entre indivíduos ou populações de indivíduos de uma dada espécie, servindo agora para a discriminação intraespecífica. *Primers* que amplificam regiões intrônicas do genoma do organismo a ser estudado são bastante promissores. Vários

precursores do RNAm em eucariontes contêm introns, que são retirados com precisão do pré-RNAm por um processo chamado *splicing*, que requer a participação do spliceossomo, um complexo ribonucleoprotéico, tornando o RNAm funcional (Newton, 1997). A razão para a existência e distribuição dos introns é muito discutida, permanecendo desconhecidas às funções destas seqüências.

O intron *splice site primer* EI-1 mostrou-se muito eficaz na discriminação de linhagens comerciais de *S. cerevisiae* isoladas da fermentação do vinho (Barros Lopes et al., 1996). A maior vantagem desta técnica está em sua simplicidade, rapidez e acessibilidade para laboratórios industriais com limitada experiência e recursos. A rapidez da técnica e a possibilidade de analisar vários exemplares em um único dia permitem seu uso no monitoramento do crescimento de leveduras durante o processo fermentativo propiciando um melhor controle de qualidade. Contudo, a principal desvantagem dessa metodologia deve-se ao seu baixo poder discriminatório no nível intraespecífico (Bacelar, 2003).

Microsatélites são seqüências curtas de até seis nucleotídeos repetidas em tandem encontradas no genoma de vários organismos. Essas seqüências vêm sendo muito utilizadas como marcadores moleculares, pois o polimorfismo gerado nestas regiões, devido à instabilidade destas seqüências, permite utilizá-las na construção de mapas genéticos e em estudos forenses, por exemplo (Jeffreys et al., 1997). A utilização de microsatélites como marcadores moleculares pode ocorrer de duas maneiras, dependendo da região a ser amplificada. A utilização de *primers* externos aos microsatélites permite avaliar o polimorfismo de tamanho destas regiões. Alternativamente, a utilização do próprio microsatélite como *primer* para a amplificação do DNA permite analisar as seqüências nucleotídicas localizadas entre os microsatélites, metodologia essa conhecida como ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*, Seqüências simples entre repetições) (Gupta et al. 1994).

O grupo de pesquisa em Genética de Microrganismos da Universidade Federal de Pernambuco vem utilizando a técnica de ISSR, onde o motivo (GTG)₅ vem sendo utilizado como *primer*, na tipagem e estudo populacional molecular de leveduras do processo de fermentação alcoólica para produção de álcool carburante. Essa metodologia permite a discriminação a nível intra e interespecífico, além de ser hoje a técnica mais rápida e precisa para discriminar linhagens de leveduras, o que é bastante interessante para o processo industrial (Lieckfeldt et al., 1993; Meyer e Mitchell, 1995; Weising et al., 1995; Baleiras Couto et al., 1996; Silva Filho, 2003).

A cariotipagem molecular através da eletroforese de campo pulsátil (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE) foi criada por Schwarz e Cantor em 1984 e consiste em uma eletroforese especializada útil para moléculas de DNA muito longas. Esta técnica é capaz de separar moléculas de DNA com cerca de 10 Mb de tamanho (Walz, 1995), e baseia-se na utilização de vários campos elétricos oscilantes orientados em diferentes direções. Essa metodologia é empregada para se estudar cromossomos que não são facilmente visualizados através de técnicas citológicas devido ao seu pequeno tamanho, como é o caso dos cromossomos dos fungos, tendo permitido a construção de mapas físicos destes cromossomos e também mapas de restrição de cromossomos individuais (Walz, 1995). A PFGE também tem sido empregada para estudos taxonômicos devido ao alto polimorfismo evidenciado tanto no número quanto no tamanho do cromossomo, permitindo a identificação de linhagens (Nadal et al., 1999; Puig et al., 2000).

Esta técnica vem sendo amplamente utilizada no estudo de populações de leveduras em processos fermentativos industriais para produção de vinho, cachaça, cerveja e álcool combustível, a exemplo de empresas brasileiras ligadas a consultorias em processos microbiológicos industriais como a Fermentec S/A (Piracicaba, SP) e Copersucar (Piracicaba, SP). Basso et al. (1993) afirmam que se trata de uma técnica de boa confiabilidade e que o

congelamento e a liofilização, da mesma forma que o estresse causado por ciclos fermentativos, não comprometem a utilização dessa metodologia na identificação de leveduras do processo de fermentação alcoólica. Contudo, diversos estudos de caracterização de leveduras de processos fermentativos para produção de vinho (Longo e Vezinhet, 1993; Nadal et al., 1999; Puig et al., 2000), cachaça (Pataro et al., 2000; Guerra et al., 2001), e álcool combustível (Lucena, 2002) tem demonstrado uma variabilidade enorme de perfis cariotípicos quando comparados a outros marcadores. Isto pode ser devido a rearranjos cromossômicos que ocorrem no genoma das leveduras em resposta ao estresse causado durante o processo de fermentação.

2.6. Rearranjos Cromossômicos

Rearranjos cromossômicos têm sido descritos no genoma destas leveduras durante seu crescimento vegetativo, devido à recombinação mitótica entre cromossomos homólogos ou recombinação entre seqüências repetidas ou paralelas (Longo e Vezinhet, 1993; Nadal et al., 1999). Sugere-se que a manutenção desse polimorfismo possa resultar no importante mecanismo adaptativo das leveduras (Puig et al., 2000).

A variabilidade dos perfis cariotípicos pode ser explicada por mecanismos de recombinação, tanto recíproca quanto não-recíproca, entre cromossomos homólogos de diferentes tamanhos, originando produtos que migram em diferentes posições com relação às bandas parentais (Nadal et al., 1999). Na natureza, a ocorrência de importantes variações no tamanho dos cromossomos é especialmente freqüente em fungos desprovidos de ciclo sexual, através de um processo chamado ciclo parassexual. Em muitos casos, a diferença no tamanho dos cromossomos é devido a rearranjos de DNA envolvendo grandes fragmentos cromossômicos que foram translocados, deletados ou duplicados por diferentes processos

(Fierro e Martin, 1999). Alguns autores detectaram alterações estruturais intercromossomais (translocações) em adição a mudanças intracromossomais (deleções e duplicações), bem como a presença de um número variável de cromossomos com homologia alta ou baixa (Vezinhet et al., 1990; Bidene et al., 1992; Guerra et al., 2001).

Um ponto importante do genoma fúngico é que este contém seqüências que podem permitir rearranjos cromossômicos. As regiões de seqüências repetidas do genoma são capazes de agir como substrato para recombinação ectópica ou para duplicações, deleções e inversões se elas ocorrem no mesmo cromossomo. Os transposons também podem atuar como substrato para recombinação ectópica, pois são elementos dispersos em várias cópias no genoma. Em alguns casos há seqüências no genoma dos fungos que podem promover recombinações em proporções maiores que o normal, esses são denominados de “*hot spots*” de recombinação (Fierro e Martin, 1999).

Os rearranjos cromossômicos podem ocorrer através de recombinações mitóticas intracromossômicas entre seqüências repetidas que podem originar deleções (se ocorrem em uma mesma cromátide), duplicações e deleções (se em cromátides irmãs de tamanho desigual) (Bi e Liu, 1996a, 1996b). Podem ainda causar inversões, se as seqüências estiverem situadas em uma posição invertida (Rothstein et al., 1987). A presença de seqüências repetidas também pode permitir deleções durante o processo de replicação, quando erros de replicação acontecem e o anelamento entre regiões homólogas de fita simples se dá sem a intervenção de proteínas pareadoras (Streisinger et al., 1996). A recombinação entre cromossomos homólogos que possuem tamanhos diferentes pode produzir deleções ou duplicações por conta da permuta desigual, gerando assim cromossomos de tamanho diferente do original. Finalmente, a recombinação também pode ocorrer entre cromossomos não homólogos nas repetições subteloméricas, causando variabilidade nas terminações dos cromossomos, ou em

regiões de repetição dispersas no genoma (recombinação ectópica) causando translocações (Fierro e Martin, 1999).

Bidene et al. (1992) demonstrou que o polimorfismo pode estar associado com o tamanho cromossômico e isto poderia ser parcialmente explicado por uma reorganização estrutural. Estas modificações podem ser observadas em cromossomos homólogos de linhagens diplóides ou poliplóides e ocorrem com uma frequência relativamente alta durante a mitose, durante o ciclo parassexual. As conseqüências dos rearranjos cromossômicos que ocorrem com alta frequência durante a mitose dependem da escala de tempo considerada. Contudo, rearranjos cromossômicos durante a mitose estão, provavelmente, envolvidos com processos evolutivos (Longo e Vezinhet, 1993). Mortimer et al. (1994) desenvolveram um modelo denominado “renovação genômica” (“*genome renewal*”) para explicar a rápida evolução de linhagens de leveduras da fermentação do vinho. Segundo estes autores, os novos genomas podem surgir de linhagens homotáticas diplóides modificando heterozigotos múltiplos em homozigotos diplóides. Alguns desses novos diplóides podem exibir maiores condições de adaptação do que seus ancestrais podendo substituir a linhagem original.

Enfim, esta flexibilidade do genoma fúngico tem uma importância na adaptação e aquisição de novos fenótipos, podendo ser aplicada na obtenção de linhagens de importância comercial.

2.7. Dinâmica de populações microbianas

Estudos de evolução microbiana têm utilizado populações em regime permanente (quimiostatos) ou bateladas sucessivas (sistema de transferência seriada), nos quais as células são continuamente incubadas em um meio definido suplementado com limitações de um nutriente essencial para restringir taxas de crescimento e o tamanho da população. Este

modelo cria na cultura condições ambientais que são essencialmente constantes, permitindo a seleção de fenótipos específicos. As mutações podem surgir e, assim, conferir uma vantagem seletiva nas células que as possuem. Desta forma, as novas células irão substituir a população com sua própria progênie em um processo denominado como “seleção periódica”. Geralmente o resultado dessa “seleção periódica” é a completa substituição da cultura pelas células com novo genótipo (Finkel e Kolter, 1999).

A adaptação envolvendo populações assexuais ocorre através de uma substituição seqüencial de um clone por outro. Tem sido demonstrado que esta substituição pode ocorrer rapidamente em populações de leveduras expostas a um ambiente limitado com glicose, bem como a ambientes limitados com fosfato. Além disso, as mutações adaptativas têm mostrado um alto grau de interações epistáticas, significando que o sucesso no desempenho da população pode diminuir quando comparado com a população inicial (Adams et al.,1985).

Com base nestes dados e sabendo-se que em processos de fermentação industrial ocorre uma sucessão de linhagens de leveduras (Basso et al.,1993; Lucena, 2002; Bacelar, 2003; Silva-Filho, 2003), faz-se necessário estudar quais os processos envolvidos nesta sucessão. É necessário conhecer como e quando os rearranjos cromossômicos ocorrem. É importante também conhecer como ocorre o processo de adaptação destas leveduras durante a sucessão de linhagens e como estes processos influenciaram no desempenho destas linhagens. E finalmente é fundamental conhecermos a consequência destes processos (rearranjos e evolução microbiana) para o rendimento final dos processos fermentativos.

Este trabalho trata da avaliação da estabilidade cromossômica de linhagens industriais de *S. cerevisiae* em bateladas sucessivas utilizando meios de cultura de laboratório, como subsídio para se tentar entender a variabilidade cariotípica encontrada em diferentes isolados desta levedura proveniente de dornas de fermentação alcoólica.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams J, Paquin C, Oeller P W e Lee L W (1985) Physiological characterization of adaptative clones in evolving populations of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 110:173-185.
- Alexopoulos C J, Mims C. W e Blackwell M (1996) *Introductory Mycology*. 4^a ed. John Wiley & Sons, INC, New York, pp.283-285.
- Bacelar R C (2003) Tipagem genética de leveduras isoladas do processo de fermentação alcoólica. Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.
- Baleiras Couto M M, Hartog B J, Huis In't Veld J H J, Hofstra H e Van Der Vossen J M B M (1996) Identification of spoilage yeasts in a food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting. *Food Microbiology* 13: 59-67.
- Barros Lopes M, Soden A, Henschke P A, Langridge P (1996) PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice *primers*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4514-4520.
- Basso L C, Oliveira A J, Orelli V F D M, Campos A A, Gallo C R e Amorim H V (1993) Dominância das leveduras contaminantes sobre as cepas industriais pela técnica de cariotipagem. V Congresso Nacional da STAB 5: 246-250.
- Bi X e Liu L F (1996a) DNA rearrangement mediated by inversion repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 918.
- Bi X e Liu L F (1996b) A replicational model for DNA recombination between direct repeats. *Journal of Molecular Biology* 256: 849.
- Bidene C, Blondin B, Dekuin S e Vezinhet F (1992) Analyses of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 22: 1-7.

- Byers B e Goetsch L (1975a) Behavior of spindles plaques in the cell cycle and conjugation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 124: 511-523.
- Byers B e Goetsch L (1975b) Electron microscopic observation on the meiotic karyotype of diploid and tetraploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72: 5056-5060.
- Carle G F e Olson MV (1985) An electrophoresis karyotype for yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 8: 3756 – 3760.
- Cantor C R, Smith C L e Mathew M K (1988) Pulsed-field gel electrophoresis of very large DNA molecules. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 17: 287 – 304.
- Cherry L M, Ball C, Dolinsky K, Dwight S, Harris M, Matese J C, Sherlock G, Binkley G, Jin H, Weng S e Botstein D (2002) *Saccharomyces* Genome Database. [http:// genome – www.stanford . edu / Saccharomyces/](http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/).
- Chu G, Vollrath D e Davis R W (1986) Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogenous electric fields. *Scienc.* 234: 1582 – 1585.
- Demain A L e Solomon N A (1981) Industrial microbiology. *Scientific American* 245(3): 43-50.
- Fierro F e Martín J F (1999) Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement in fungi. *Critical Reviews in Microbiology* 25 (1): 1 – 17.
- Finkel S E e Kolter R (1999) Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 4023-4027.
- Gomes L H, Duarte K M R, Argueso J L, Echeverrigaray S e Tavares F C A (2000) Methods for yeast characterization from industrial products. *Food Microbiology* 17:217-223.
- Guerra J B, Araújo R A C, Pataro C, Franco G R, Moreira E S A, Mendonça-Hagler L C, Rosa C A (2001) Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h

- fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Letters in Applied Microbiology* 33: 106-111.
- Guillamón J M, Sabaté J, Barrio E, Cano J e Querol A (1998) A rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology* 169:387-392.
- Gupta M, Chyi Y S, Romero – Severson J e Owen J L (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 998-1006.
- Horii J M e Oettler A M (1998) Caracterização de levedura e seu uso na alimentação. *Boletim SBCTA* 32 (1): 89-98.
- Jeffreys L, Neumann R (1997) Somatic mutation processes at human minisatellite. *Human Molecular Genetic* 6: 129-136.
- Johnston J R, Contopoulou C R e Mortimer R K (1998) Karyotyping of yeast strains of several genera by field inversion gel electrophoresis. *Yeast* 4: 191 – 198.
- Kupiec M, Byers B, Esposito R E e Mitchell A P (1997) Meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Pringle J R, Broach J R e Jones E W (eds) *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces – cell cycle and cellular biology*. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, pp 889-1036.
- Kuroiwa T, Kojima H, Miyakawa I e Sando N (1984) Meiotic karyotype of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental Cell Research* 153: 259-265.
- Kuroiwa T, Miyamura S, Kawano S, Hizume M, Tho-E A, Miyakawa I e Sando N (1986) Cytological characterization of NOR in the bivalent of *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental Cell Research* 165: 199-206.
- Kurtzman C P (1998) Yeast systematics – from phenotype to genotype. *Food Technology and Biotechnology* 36(4): 261-266.

Lucena, B. T. L. Análise de polimorfismos cromossômicos em leveduras...

Lieckfeldt E, Meyer W e Börner T (1993) Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology* 33: 413-426.

Loidl J (2003) Chromosomes of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Review of Cytology* 222: 141- 196.

Longo E e Vezinhet F (1993) Chromosomal rearrangements during vegetative growth of wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 322-326.

Lopes, ML (2002) Estudo do polimorfismo cromossômico da linhagem de levedura PE-2. Tese de doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), Piracicaba, São Paulo.

Lucena B T L (2002) Cariotipagem molecular de leveduras de fermentação alcoólica. Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

Meyer W e Mitchell T G (1995) Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single *primers* specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electrophoresis* 16: 1648-1656.

Motimer R K e Schild D (1980) The genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* 44: 519-577.

Mortimer R, Romano K, Suzzi P e Polsinelli G (1994) Genome renewal: A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast* 10: 1543 – 1552.

Nadal D, Carro D, Fernández-Larrea J e Piña B (1999) Analyses and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1688-1695.

- Newton S M C (1987) O que é gene. In: Genética molecular e de microrganismo. Editora Manole. São Paulo. pp 80-95.
- Oliver S G (1996) From DNA sequence to biological function. *Nature* **379**: 597 – 600.
- Pataro C, Guerra J B, Petrillo-Peixoto M L, Mendonça-Hagler L C, Linardi V R e Rosa C A (2000) Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associate with artisanal fermentation in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* **89**: 24-31.
- Pearson C G, Paul S, Maddox P S, Salmon E D e Bloom K (2001) Budding yeast chromosome structure and dynamics during mitosis. *The Journal of Cell Biology* **152**: 1255-1266.
- Phaff H J (1990) Isolation of yeast from natural source. In: Isolation of biotechnological organisms from nature. *Labeda (ed)*, US Mc-Graw-Hill INC., pp. 53-59.
- Puig S, Querol A, Barrio E e Pérez-Ortín J E (2000) Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(5): 2057-2061.
- Rothstein R, Helms C e Rosinberg N (1987) Concerted deletions and inversions are caused by mitotic recombination between delta sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **7**: 1198.
- Scherthan H, Loidl J, Schuster T e Schweizer D (1992) Meiotic chromosome condensation and pairing in *Saccharomyces cerevisiae* studied by chromosome painting. *Chromosoma* **101**:590-595.
- Schwartz D C e Cantor C R (1994) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulse field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**: 67 – 75.

- Silva Filho E A (2003) Caracterização genética de populações de leveduras em destilarias de álcool combustível com vistas à seleção de linhagens promissoras para a expressão heteróloga de genes de interesse industrial. Tese de doutorado em biologia de fungos da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE.
- Streisinger G, Okada Y, Emrich J, Newton J, Tsugita A, Terzaghi E e Inouye M (1996) Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 31: 77.
- Trelles-Sticken E, Loidl J e Scherthan H (1999) Bouquet formation in budding yeast: initiation of recombination is not required for meiotic telomere clustering. *Journal of Cell Science* 112:651-658.
- Única (2003) O álcool combustível. <http://www.única.com.br>. Julho,2003. acesso em 14 de outubro de 2003.
- Vezeiret F, Blondin B e Hallet J N (1990) Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32:568-571.
- Walker G M (1998) Yeast - physiology and biotechnology. John Wiley and Sons Ltd. England., 350pp.
- Walz M (1995) Electrophoretic Karyotyping. In: Esser K e Lemke P A (eds) *The Mycota – Genetics and Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, pp 61-73.
- Weising K, Atkinson R G e Gardner R C (1995) Genomic fingerprinting by microsatellite-primer PCR: a critical evaluation. *PCR Methods and Applications* 249-255.
- Wheals A E, Basso L C, Alves D M G e Amorim H V (1999) Fuel ethanol after 25 years. *TIBTECH* 17:482-487.
- Zaldivar J, Nielsen J e Olsson L (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56:17-34.

Artigo Científico

**Manuscrito preparado para
submissão à revista *FEMS Yeast
Research*. Delft, Holanda.**

ISSN: 1567-1356.

Elsevier Science

**Análise do Polimorfismo Cromossômico em Linhagens de Leveduras de
Fermentação Alcoólica**

**Brígida T. L. L.^{1,2}, Eurípedes A. S. F.², Maria Raquel M. C.⁵ José Otamar F.
M.⁴, Diogo A. S.³, Marcos A. M. Jr.^{1,2}**

1- Departamento de Genética, 2- Laboratório de Imunopatologia Keiso Azami, 3-

Departamento de Bioquímica, 4- Departamento de Antibióticos, 5- Departamento de

Pesca da Universidade Rural de Pernambuco.

Universidade Federal de Pernambuco.

Rua Prof. Moraes do Rego, s/n.

Recife, Brasil

Palavras –Chave: Cariótipo, Rearranjos Cromossômicos, Leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*

Resumo

Genomas de leveduras industriais são freqüentemente submetidos a uma forte pressão seletiva, principalmente em processos de fermentação alcoólica. Neste processo, as leveduras estão submetidas a grandes concentrações de etanol, altas temperaturas e ausência de oxigênio, o que pode tornar os rearranjos cromossômicos altamente vantajosos para a célula, podendo conduzir a um excelente desempenho em ambientes industriais. Este trabalho teve como objetivo estudar a estabilidade cromossômica de leveduras de fermentação alcoólica em culturas puras de laboratório. O polimorfismo cromossômico foi evidenciado tanto em aerobiose quanto em anaerobiose. Os isolados MF1(1) e IA1238 apresentaram rearranjantes capazes de substituir o parental ao longo do processo. Embora o isolado JP1 apresente o maior polimorfismo, o perfil parental se mantém ao longo do processo numa freqüência de 25-30%. Estes resultados demonstram que diferentes isolados, ou linhagens, apresentam diferentes padrões de rearranjos cromossômicos em condições de laboratório.

1. INTRODUÇÃO

O bioetanol é hoje a principal fonte de energia renovável, não polui o meio ambiente e por isso, sua produção vem recebendo grande incentivo. Além de razões econômicas, como o baixo custo de produção, razões sociais, como geração de emprego, tem estimulado a produção e utilização dessa *commodity* no Brasil [1]. O Brasil é atualmente o maior produtor de álcool mundial, com uma produção anual de aproximadamente 10,4 bilhões de litros, dos quais 4,9 bilhões destinam-se ao abastecimento de veículos e 5,5 bilhões de litros são misturados à gasolina como aditivo (www.única.com.br).

A produção de álcool ocorre através do processo fermentativo do caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Esse processo se dá de forma séptica de modo que favorece o aparecimento de contaminação por bactérias e outras leveduras. Nos dias de hoje, a principal preocupação da indústria sucro-alcooleira no Brasil é a busca por uma levedura ou linhagem que seja capaz de dominar durante todo o processo e que produza um bom rendimento em etanol [2]. Isto decorre do fato de que episódios de contaminações por outras leveduras durante o processo têm levado a uma queda no rendimento total, o que acarreta custos na produção. Para isso se faz necessário um estudo de caracterização da dinâmica populacional do processo fermentativo durante o período de uma safra para em seguida se identificar qual a melhor linhagem para servir de inóculo inicial na safra seguinte. Uma levedura ideal para processos fermentativos deve possuir um rápido crescimento em meio rico em glicose, alta tolerância a etanol, com alta produção deste produto [3].

Diversas técnicas baseadas em polimorfismos de DNA têm sido utilizadas para estudos populacionais de processos fermentativos industriais. Dentre elas pode-se citar a cariotipagem molecular através da eletroforese de DNA em campo pulsátil. Esta técnica vem

sendo bastante utilizada no Brasil para estudos populacionais de fermentações alcoólicas, a exemplo do que acontece na França, na Itália e na Espanha para a análise da população de leveduras de vinho [4-8] No entanto, trata-se de uma alternativa laboriosa e que demanda tempo, dificultando sua aplicação para utilização em rotinas industriais.

Os perfis cariotípicos são relativamente consistentes dentro de uma espécie, servindo, portanto, para estudos de sistemática entre espécies do gênero *Saccharomyces* [8-10]. Porém, diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* têm apresentado consideráveis variações em seus cariótipos, mesmo entre linhagens que possuem o mesmo padrão de restrição de mtDNA [11]. Polimorfismos do tamanho de cromossomos têm sido descritos em leveduras de panificação e de vinicultura [12], assim como em leveduras do processo de produção de cachaça [13-14]. As leveduras industriais são freqüentemente descritas pelo alto nível de aneuploidias e polimorfismos cromossômicos que podem ser visualizados pela eletroforese em campo pulsátil. Mudanças no cariótipo de linhagens industriais têm sido observadas durante o crescimento vegetativo ao longo de várias gerações sugerindo que esses rearranjos dos cromossomos durante a divisão mitótica são comuns [12, 15]. Estes rearranjos têm sido descritos em genomas de leveduras durante o crescimento vegetativo e podem ocorrer através da recombinação mitótica entre cromossomos homólogos [12], da recombinação entre seqüências repetidas [8, 16], através de *crossing over* desigual entre seqüências repetidas [15, 17], conversões gênicas [18], translocações, duplicações e deleções. Essas modificações no genoma da levedura podem promover uma adaptação rápida às mudanças do ambiente [3]. Sendo assim, a manutenção desses rearranjos cromossômicos constitui em um importante mecanismo de adaptação das leveduras industriais.

Com base nestes dados e sabendo-se que em processos de fermentação industrial ocorre uma sucessão de linhagens de leveduras, este trabalho teve como objetivo estudar a

estabilidade cromossômica de leveduras de fermentação alcoólica em culturas puras de laboratório, tentando reproduzir as condições de uma dorna de fermentação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Isolados

Os isolados utilizados neste trabalho foram coletados do processo de fermentação para produção de álcool combustível durante a safra 2000-2001 na destilaria Japungu Agro-Industrial S/A (Santa Rita, PB, Brasil). Estes foram previamente caracterizados morfológicamente e também ao nível molecular com a técnica ISSR (*Inter Simple Sequences repeats*) que amplifica regiões compreendidas entre microssatélites (GTG)₅. Isolados com o mesmo perfil de amplificação (GTG)₅ foram considerados pertencentes à mesma linhagem de *S. cerevisiae* e utilizados para se verificar o polimorfismo cromossômico entre representantes de uma mesma linhagem celular.

2.2. Ensaio Fermentativos

2.2.1. Ensaio fermentativo em Aerobiose

Os isolados MF1(1) e IA1238 foram cultivados em frascos de Erlenmeyer de 50 ml contendo 10 ml de meio YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose) a 30°C com aeração. Em períodos de 24 horas de cultivo, alíquotas de 1 ml de cada cultura foram utilizados para inocular novo meio durante 100 dias. O número de gerações celulares foi calculado a partir dos valores de densidade celular inicial e final das culturas de 24 h. As amostras foram coletadas após 50, 150, 300 e 400 gerações e semeadas em placas contendo meio WLN (Tabela 1) para produzir entre 10 e 20 colônias. Estas colônias foram utilizadas

para a caracterização molecular através das técnicas de cariotipagem molecular e de ISSR com o *primer* (GTG)₅, como descrito a seguir.

2.2.2. Ensaio fermentativo em Anaerobiose

Os isolados MF1(1), IA1238 e JP1 foram cultivados em tubos de ensaios (17 mm x 200 mm) contendo 16 ml de meio para fermentação (MF) (Tabela1) e 4ml de inoculo (20% da massa úmida celular) a 35°C sem aeração. Em períodos de 24 horas de cultivo, uma alíquota de 4 ml da cultura foi transferida para 16 ml de novo meio durante 150 dias. A determinação do número gerações foi feita como descrita acima. As amostras foram coletadas após 100 e 435 gerações e semeadas em placas contendo meio Sabouraud (1% peptona e 2% glicose) para produzir cerca de 20 colônias por placa, as quais foram utilizadas para a caracterização molecular através das técnicas de cariotipagem molecular e de ISSR com o *primer* (GTG)₅, como descrito abaixo.

2.3. Caracterização Molecular com a técnica ISSR com o *primer* (GTG)₅

Para a extração do DNA total, cada isolado foi cultivado em meio YPD à 30°C por 16 horas e 150 rpm. Em seguida, 1ml da cultura foi transferida para microtubos de 1,5 ml e centrifugado por 3 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 600 µl de solução de extração (Tris-HCl 200 mM pH 8,0, EDTA 25 mM pH 8,0, SDS 1%, NaCl 25 mM). Após incubação das células a 65°C por 30 minutos, o DNA total foi purificado por extração com Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico (24:1:1), seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. Foram transferidos 500 µl da fase superior para um novo microtubo e novamente purificado com igual volume de Clorofórmio-Álcool isoamílico (1:1), seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. Cerca de 400µl da fase superior foi transferida para um novo microtubo e misturados com 800 µl de etanol

absoluto a -20°C . A amostra foi incubada a -20°C por 2 horas para a precipitação do DNA, o qual foi coletado após centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos, lavado com etanol 70%, seco em estufa à 37°C e em seguida ressuspensão em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1mM pH 8,0) e mantido a -20°C . O DNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando como comprimento de onda 260nm segundo Sambrook et al [19].

O *primer* (GTG)₅ foi descrito por Lieckfeldt et al [20]. A mistura de PCR foi otimizada em nosso laboratório e consiste de 1x tampão de PCR (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl) contendo 50 ng DNA, 1.5 mM MgCl₂, 5 μmol *primer*, 0.2 mM mistura de dNTP, 25 μg BSA e 1.25 U Taq DNA polymerase em um volume final de 25 μl. As amostras foram pré-aquecidas a 93°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 93°C por 20 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e polimerização a 72°C por 90 segundos, com extensão final a 72°C por 6 minutos.

O produto da amplificação foi separado em gel de agarose a 1,3 %, submetido a 75 V por 150 minutos em tampão TBE 0,5 X. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio, visualizados em transiluminador ultravioleta e fotografado com câmera Polaroid.

2.4. Cariotipagem molecular através da eletroforese em campo pulsátil

Os isolados foram cultivados por uma noite em placas contendo meio WLN ou Sabouraud a 30°C . As colônias foram coletadas e ressuspensas em 60 μl de tampão SEM (1 M Sorbitol, 50 mM EDTA, 28 mM β-Mercaptoetanol) acrescido da enzima Liticase (2,5 mg.ml⁻¹). Em seguida, 60 μl de agarose de baixo ponto de fusão (LMA) liquefeita e diluída em SEM para 1,2 %, foram adicionados e, essa suspensão foi colocada em um molde para solidificação dos blocos. Os blocos foram imersos em 300 μl de SEML (2,5 mg.ml⁻¹ de Liticase em SEM) e incubados por 24 horas a uma temperatura de 37°C . Em seguida, estes foram lavados em 500 μl de tampão EST (100 mM EDTA pH 8.0, 1% N-Laurilsarcosil, 10

mM Tris pH8.0). A desproteíntização foi feita por incubação dos blocos em 500 µl de EST acrescido de Proteinase K (1 mg.ml⁻¹) por 48 horas a 50°C. Em seguida, os blocos foram lavados em EDTA 0,5 M pH 8.0 e estocados em EDTA 0,5 M pH 8.0 à 4°C.

Os cromossomos foram separados em gel de eletroforese em campo pulsado, utilizando-se o sistema Gene Navigator (Amersham-Pharmacia Biotech). As corridas foram feitas em tampão TBE a 12°C nas seguintes condições de migração: pulsos interpolados de 140 s-20 s por 35 horas e 75s-15 s por 7 horas. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio, visualizados em transiluminador UV e fotografados com câmera Polaroid. Cromossomos de *S. cerevisiae* da linhagem YNN295 foram utilizadas como padrão (*Yeast Molecular Marker*, Amersham-Pharmacia Biotech).

3. RESULTADOS

Polimorfismos cromossômicos dos isolados industriais de *Saccharomyces cerevisiae* coletados do processo de fermentação alcoólica que pertenciam a um mesmo perfil, segundo o *primer* (GTG)₅, foram evidenciados tanto no número de cromossomos observados quanto em relação ao peso molecular destes. Apesar de alguns isolados terem se mostrado altamente relacionados, a maioria deles apresentou perfis individuais. Todos os perfis cromossômicos obtidos são típicos de *Saccharomyces cerevisiae*, com cromossomos medindo de, aproximadamente, 300 a 1900 Kb (Fig. 1). Estes resultados sugerem um alto grau de polimorfismos cromossômicos nas leveduras industriais. A partir desses resultados fomos verificar a ocorrência de rearranjos cromossômicos nestes isolados, a partir do estudo da estabilidade cromossômica dos isolados MF1(1), IA1238 e JP1.

Nos experimentos de estabilidade cromossômica em aerobiose, o polimorfismo cromossômico foi evidenciado para os dois isolados testados (IA1238 e MF1(1)). Os clones

obtidos da IA1238 apresentaram dois perfis diferentes do parental (Fig. 2). O perfil B, que surgiu com 300 gerações de crescimento, difere do padrão parental por possuir uma banda de 740 kb no lugar da banda de 800 kb; já o perfil C, que surgiu com 400 gerações de crescimento, manteve a banda de 740 kb do perfil B e apresentou uma nova banda de 1020 kb (Fig. 4). Os clones da MF1(1) apresentaram 4 perfis diferentes do parental denominados W, Y, Z e V, que surgiram com 150, 300, 300 e 400 gerações de crescimento, respectivamente (Fig. 3). O perfil W difere do parental por possuir uma banda 785 kb. O perfil Y, surgido na terceira coleta com uma frequência de 90 % da população, difere do parental por possuir uma banda dupla na região de 610 kb ao invés de uma banda simples. Este perfil é predominante na quarta coleta com uma frequência de 95 %. Já os perfis Z e V mantiveram a banda dupla do perfil Y com modificações adicionais. Observou-se a diminuição da banda de 510 kb para 495 kb (perfil Z) que ocorre apenas na terceira coleta com uma frequência de 5 %, enquanto que houve o desaparecimento da banda parental de 480 kb (perfil V) em amostras da quarta coleta com uma frequência de 5 % (Fig. 4). Nenhum polimorfismo foi observado quando esses rearranjantes foram tipados com *primer* (GTG)₅, o que demonstra que estas células correspondem a variantes cariotípicas da linhagem parental, e não a possíveis contaminantes das culturas (Figs. 10 e 11).

Os experimentos de estabilidade cromossômica em anaerobiose também demonstraram uma alta frequência de aparecimento de formas rearranjantes. Estes experimentos tentaram se aproximar um pouco mais das condições de uma dorna de fermentação. Para o isolado JP1, o perfil parental permaneceu ao longo de todo o cultivo, com frequências variando entre 30% e 25%, após 90 e 435 gerações de crescimento, respectivamente. Adicionalmente, 12 rearranjantes cariotípicos foram observados para esta linhagem (PR1 ao PR12), (Fig. 5).

O perfil rearranjante que se apresentou com uma maior frequência durante o experimento foi o PR4, correspondendo a 20% dos clones tipados nas duas coletas. Este perfil caracteriza-

se pela ausência da banda parental de 470 kb (Fig. 6). O perfil PR5, por sua vez, ocorre com uma frequência de 10% nas duas coletas e difere do parental por não apresentar a banda de 470 kb, enquanto apresentou as bandas de 720 kb e 360 kb. Os perfis PR2 e PR3 diferem, respectivamente, do parental por possuírem uma banda de 720 kb e não apresentarem a banda de 760 kb (Fig. 6).

Os outros perfis cariotípicos ocorreram apenas em frequência de 5% e diferenciaram do parental pelas seguintes modificações: ausência da banda de 470 kb e pela adição da banda de 360 kb (PR1), por possuir as bandas de 520 kb, 500 kb e 480 kb (PR6), por apresentar as bandas de 720 kb e de 450 kb (PR7), presença da banda de 720 kb e ausência da banda de 470 kb (PR8), presença da banda de 450 kb no lugar da parental de 440 kb (PR9), perda das bandas de 510 kb e 470 kb (PR10), perda das bandas de 760 kb e 470 kb e ganhou uma banda de 360 kb (PR11) e perda das bandas de 760 kb, 530 kb e 470 kb e ganho da banda de 360 kb (PR12) (Fig. 6).

Para o isolado MF1(1), foram observados três perfis rearranjantes (perfis R, T, S), no processo fermentativo em anaerobiose. Todos os três rearranjantes foram visualizados depois de 435 gerações de crescimento, com frequências de 5%, 5% e 90%, respectivamente (Fig. 7). O perfil R diferencia-se do parental por não possuir a banda de 745 kb; já o perfil T não possui a banda parental de 480 kb e o perfil S não possui as bandas parentais de 745 kb e 480 kb (Fig. 9).

Assim como os rearranjantes de MF1(1), os rearranjantes D, E e F, do isolado IA1238, também surgiram após 435 gerações de crescimento com as frequências de 5%, 35% e 60%, respectivamente (Fig. 8). O perfil D não possui a banda parental de 680 kb. Já o perfil E não possui as bandas parentais de 680 kb e 480 kb, enquanto que o perfil F não possui estas duas bandas citadas e também a banda parental de 430 kb (Fig. 9).

Da mesma forma que observado para os rearrajantes produzidos em aerobiose, nenhum polimorfismo foi detectado para os rearranjantes em anaerobiose quando tipados com o *primer* (GTG)₅ (Figs. 12, 13 e 14).

4. DISCUSSÃO

Com relação ao polimorfismo cromossômico, a eletroforese em campo pulsátil tem revelado uma constituição complexa do genoma de leveduras de vinho [21], assim como de leveduras de produção de cachaça [13-14]. A origem dessa complexidade continua obscura, com muitos fatores podendo contribuir para essas variações no número e tamanho dos cromossomos observados em populações de leveduras industriais. Recombinações ectópicas entre famílias de transposons ou entre repetições subteloméricas Y' têm sido observadas em *S. cerevisiae* [21-23]. Modificações no tamanho do cromossomo podem ser resultantes de recombinações entre estas seqüências homólogas em diferentes posições do cromossomo [21].

Rearranjos cromossômicos durante a mitose não constituem eventos excepcionais e tem se verificado que tais modificações são irreversíveis. Modificações mitóticas ocorrem em linhagens diplóides e afetam cromossomos homólogos. Essas modificações, freqüentemente, implicam em simplificações no cariótipo como, por exemplo, na redução no número de bandas em eletroforese de campo pulsátil [12].

Os rearranjos cromossômicos durante o crescimento vegetativo têm sido objeto de muita discussão. Embora muitos rearranjos no cariótipo tenham um efeito deletério, propiciando o surgimento de variações clonais deletérias ou com baixa viabilidade de esporos, esses rearranjos podem também constituir uma importante fonte de variabilidade genética em linhagens desprovidas de ciclo sexual [24], propiciando uma maior adaptabilidade ao ambiente quando comparado ao parental [25].

Em nossos experimentos de estabilidade, os rearranjos cromossômicos observados parecem estar relacionados com a adaptabilidade às condições do meio. No experimento fermentativo em aerobiose, o isolado MF1(1) apresentou o perfil rearranjante Y que surgiu dominando a coleta, substituindo a seguir o perfil parental. Já no experimento em anaerobiose, o isolado MF1(1) também apresentou portadores de rearranjos que substituíram o perfil parental. Entretanto, os perfis de rearranjos produzidos pelo isolado MF1(1) foram completamente diferentes nas duas condições de cultivo. Este fato pode estar ligado a dois fatores intrínsecos: a alta variabilidade cromossômica deste isolado ou diferenças nas pressões seletivas dos diferentes processos (baixa atividade fermentativa em aerobiose e alta atividade fermentativa em anaerobiose com cerca de 7% de etanol produzido ao final do cultivo). Genomas de leveduras industriais são provavelmente submetidos a uma forte pressão seletiva, nos quais os rearranjos cromossômicos e as variações no número de cópias de cromossomos específicos podem ser altamente vantajosos para a célula. Sendo assim o aumento de determinados genes favoráveis ao crescimento no ambiente pode conduzir a um excelente desempenho em ambientes industriais [21,26], fato também observado para o isolado IA1238.

Rearranjos genômicos, especialmente deleções e duplicações, têm sido regularmente observados em resposta a pressões seletivas fortes em populações microbianas durante crescimento contínuo. A observação repetida de rearranjos cromossômicos em um mesmo sítio de quebra sugere que os genótipos resultantes têm um valor adaptativo e/ou que essas seqüências são particularmente susceptíveis a danos do DNA [27]. Contudo, uma importante questão nesta linha é descobrir como os organismos alteram seus genomas em resposta a pressões seletivas impostas pelo ambiente. Propõe-se, portanto, que rearranjos cromossômicos sejam a base dos processos adaptativos em resposta a pressões seletivas do ambiente [28]. O isolado JP-1 apresentou o maior número de rearranjos cromossômicos em nossas análises, entretanto o perfil molecular parental manteve-se inalterado ao longo dos cultivos. Desta

forma, podemos sugerir que o aparecimento dos rearranjos cromossômico pode significar uma fonte de variabilidade genética das leveduras que propiciam uma rápida adaptação às contínuas mudanças ambientais, principalmente em condições industriais. Este princípio está de acordo com a hipótese da renovação genômica (*genomic renewal*) descrita por Mortimer et al. [29], na qual novos genomas podem surgir de linhagens homotálicas diplóides modificando heterozigotos múltiplos em homozigotos diplóides.

Portanto, a alta frequência de rearranjos cromossômicos, observada para os isolados coletados diretamente do processo industrial deve estar relacionada às condições de estresse às quais as células são continuamente submetidas, tais como alta concentração de etanol, altas temperaturas e completa ausência de oxigênio. Este fato foi suportado pelos resultados aqui apresentados, nos quais rearranjos cromossômicos foram observados a partir de 150 gerações de crescimento em condições de laboratório. Portanto, se isto ocorre em condições controladas de laboratório, pode-se sugerir que nos processos industriais os rearranjos cromossômicos ocorram em um intervalo ainda menor devido às condições adversas nas quais as células são submetidas ao longo do ciclo celular durante a safra.

Com base nisto, sugere-se que a técnica de cariotipagem molecular pode ter sua aplicabilidade comprometida para estudos de dinâmica populacional em processos industriais de fermentação alcoólica, pois a ocorrência de rearranjos cromossômica pode comprometer em certo nível a confiabilidade dos resultados obtidos.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelos recursos de pesquisa do programa BNB/Fundeci e com recursos da Destilaria Japungu Agroindustrial. B.T.L. Lucena foi apoiada com bolsa de mestrado da CAPES.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Zaldivar, J., Nielsen, J. e Olsson, L. (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 17-34.
- [2] Silva Filho, E. A. (2003) Caracterização genética de populações de leveduras em destilarias de álcool combustível com vistas à seleção de linhagens promissoras para a expressão heteróloga de genes de interesse industrial. Tese de doutorado em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE.
- [3] Pérez-Ortín, J. E., Querol, A., Puig, S. e Barrio, E. (2002) Molecular characterization of chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. *Genome Research* 12, 1533-1539.
- [4] Vezinhet, F., Blondin, B. e Hallet, J. N. (1990) Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32, 568-571.
- [5] Bidene, C., Blondin, B., Dekuin, S. e Vezinhet, F. (1992) Analyses of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 22, 1-7.
- [6] Schütz, M. e Gafner, J. (1994) Dynamics of the yeast strains population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Letters in Applied Microbiology*. 19, 253-257.
- [7] Guillamón, J. M., Barrio, E. e Querol A. (1996) Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: relationships between genetic distance and geographic or ecological origin. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 122-132.

- [8] Nadal, D., Carro, D., Fernández-Larrea, J. e Piña, B. (1999) Analyses and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1688-1695.
- [9] De Jonge, P., De Jongh, F., Meijers, R., Steensma, H. e Scheffers, W. (1986) Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis banding patterns of DNA from yeast. *Yeast* 2, 193-204.
- [10] Guillamón, J. M., Barrio, E., Huerta, T. e Querol, A. (1994) Rapid characterization of four species of *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA pattern. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 708-714.
- [11] Nadal, D., Colomer, B. e Piña, B. (1996) Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1944-1950.
- [12] Longo, E. e Vezinhet, F. (1993) Chromosomal rearrangements during vegetative growth of wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 322-326.
- [13] Pataro, C., Guerra, J. B., Petrillo-Peixoto, M. L., Mendonça-Hagler, L. C., Linardi, V. R., Rosa, C. A. (2000) Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associate with artisanal fermentation in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* 89, 24-31.
- [14] Guerra, J. B., Araújo, R. A. C., Pataro, C., Franco, G. R., Moreira, E. S. A., Mendonça-Hagler, L. C., Rosa, C. A. (2001) Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Letters in Applied Microbiology* 33, 106-111.
- [15] Lockhart, L., Oliver, S. G. e Delneri, D. (2002) Tools for study genome rearrangements in laboratory and industrial yeast strains. *Yeast* 19, 441-448.

- [16] Wolfe, K. H. e Shields, D. C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708-713.
- [17] Wicksteed, B. L., Collins, I., Dershowitz, A. (1994) A physical comparison of chromosome III in 6 strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 39-57.
- [18] Puig, S., Querol, A., Barrio, E. e Pérez-Ortín, J. E. (2000) Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5), 2057-2061.
- [19] Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning - a laboratory manual*. 2ª edição.
- [20] Lieckfeldt, E., Meyer, W., Börnerm T. (1993) Rapid identification and differentiation of yeast by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology* 33, 413-426.
- [21] Ibeas, J. I. e Jimenez, J. (1996) Genomic complexity and chromosomal rearrangements in wine-laboratory yeast hybrids. *Current Genetics* 30, 410-416.
- [22] Kupiec, M. e Peter, T. D. (1988) Meiotic recombination between repeated transposable elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 8, 2942-2954.
- [23] Louis, E. J. e Haber, J. E. (1990) Mitotic recombination among subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 124, 547-559.
- [24] Carro, D. e Piña, B. (2001) Genetic analysis of the karyotype instability in natural wine yeast strains. *Yeast* 18,1457-1470.
- [25] Adams, J., Puskas-Rozsa, S., Simlar, J. e Wilke, C.M. (1992) Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 22, 13-19.
- [26] Martinez, P., Códon, A. C., Perez, L. e Bertinez, T. (1995) Physiological and molecular characterization of flor yeast: polymorphism of flor yeast population. *Yeast* 11, 1399-1411.

[27] Dunham, M. J., Badrane, H., Ferea, T., Adams, J., Brown, P. O., Rosenzweig, F. e Botstein, D. (2002) Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(25), 16144-16149

[28] Paquin, C. e Adams, J. (1983) Frequency of fixation of adaptive mutations is higher in evolving diploid than haploid yeast populations. Nature 302, 495-500.

[29] Mortimer R, Romano K, Suzzi P e Polsinelli G (1994) Genome renewal: A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. Yeast 10: 1543 – 1552.

Tabela 1: Constituição dos meios de cultura WLN e MF.

Meio WLN	Meio para fermentação (MF)
Glicose..... 50g l ⁻¹	Sacarose..... 120g l ⁻¹
Extrato de Levedura..... 4g l ⁻¹	Extrato de Levedura..... 5g l ⁻¹
Caseína..... 5g l ⁻¹	Peptona de caseína..... 2g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄ * 0,55g l ⁻¹	KH ₂ PO ₄ 2g l ⁻¹
KCl * 0,43g l ⁻¹	MgSO ₄ .7H ₂ O..... 0,5g l ⁻¹
CaCl ₂ .7H ₂ O * 0,13g l ⁻¹	Solução de elementos traços..... 1ml l ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O * 0,13g l ⁻¹	** Ajustado para pH 4.0 com H ₂ SO ₄
FeCl ₃ .6H ₂ O * 0,0025g l ⁻¹	
MnSO ₄ .4H ₂ O * 0,0025g l ⁻¹	
Ácido nalidíxico * 0,050g l ⁻¹	
Ampiclina * 0,050g l ⁻¹	

Legenda das Figuras

Figura 1: Perfis cariotípicos obtidos de isolados industriais pertencentes a o perfil P1 produzido por análise de *fingerprinting* utilizando o *primer* (GTG)₅. Onde: P1= perfil P1 segundo o *primer* (GTG)₅, MP= padrão de peso molecular.

Figura 2: Frequência de rearranjantes obtidos a partir do isolado IA1238 durante o ensaio fermentativo em condição de aerobiose.

Figura 3: Frequência de rearranjantes obtidos a partir do isolado MF1(1) durante o ensaio fermentativo em condição de aerobiose.

Figura 4: Eletroferograma dos rearranjantes obtidos a partir dos isolados IA1238 e MF1(1) durante o ensaio fermentativo em condição de aerobiose.

Figura 5: Frequência de rearranjantes obtidos a partir do isolado JP1 durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose.

Figura 6: Eletroferograma dos rearranjantes obtidos a partir do isolado JP1 durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose.

Figura 7: Frequência de rearranjantes obtidos a partir do isolado MF1(1) durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose.

Figura 8: Frequência de rearranjantes obtidos a partir do isolado IA1238 durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose.

Figura 9: Eletroferograma dos rearranjantes obtidos a partir dos isolados IA1238 e MF1(1) durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose.

Figura 10: Perfis (GTG)₅ obtidos a partir do isolado IA1238 durante o ensaio fermentativo em condição de aerobiose. Onde: PA= perfil parental, B= perfil rearranjante B, C= perfil rearranjante C, MR= linhagem MF261(7) de *S. cerevisiae* referência para o perfil (GTG)₅ do tipo P1.

Figura 11: Perfis (GTG)₅ obtidos a partir do isolado MF1(1) durante o ensaio fermentativo em condição de aerobiose. Onde: PA= perfil parental, W= perfil rearranjante W, Z= perfil rearranjante Z, V= perfil rearranjante V, Y= perfil rearranjante Y, MP= marcador de peso molecular 100bp ladder.

Figura 12: Perfis (GTG)₅ obtidos a partir do isolado JP1 durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose. Onde: PA- perfil parental, PR- perfil rearranjante.

Figura 13: Perfis (GTG)₅ obtidos a partir do isolado MF1(1) durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose. Onde: P= perfil parental, R= perfil rearranjante R, T= perfil rearranjante T, S= perfil rearranjante S, MP= marcador de peso molecular 100 bp ladder.

Figura 14: Perfis (GTG)₅ obtidos a partir do isolado IA1238 durante o ensaio fermentativo em condição de anaerobiose. Onde: PA= perfil parental, D= perfil rearranjante D, E= perfil rearranjante E, F= perfil rearranjante F.

Figura 1

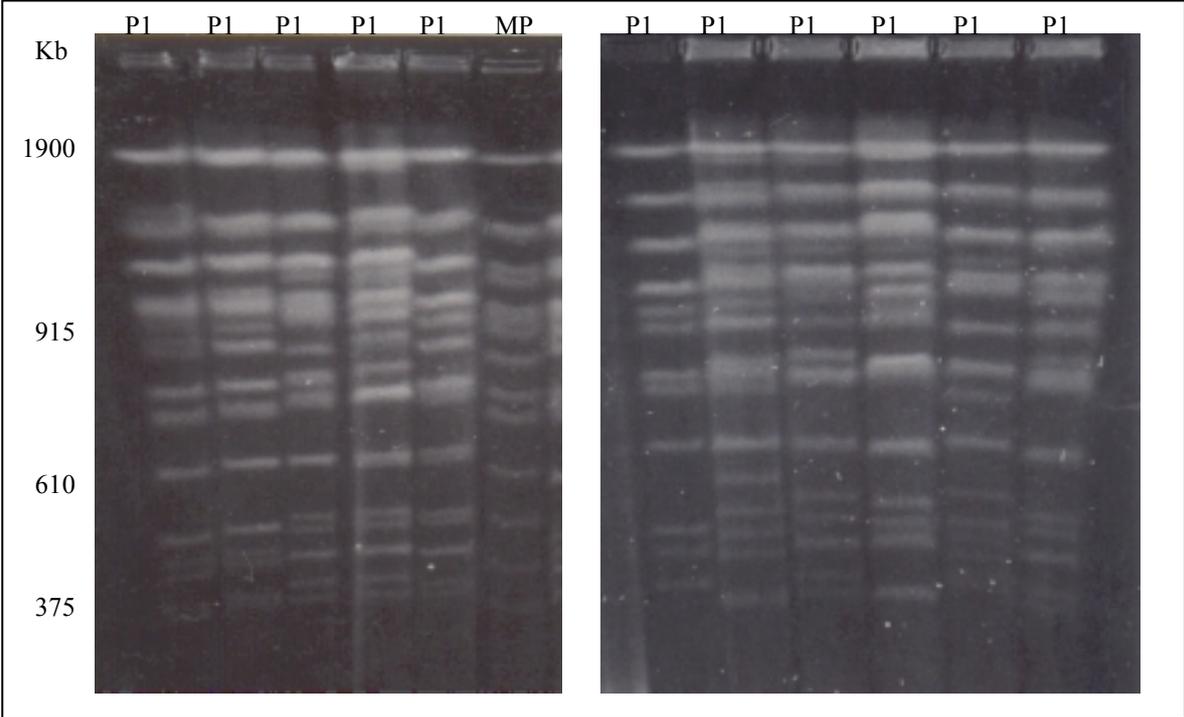


Figura 2

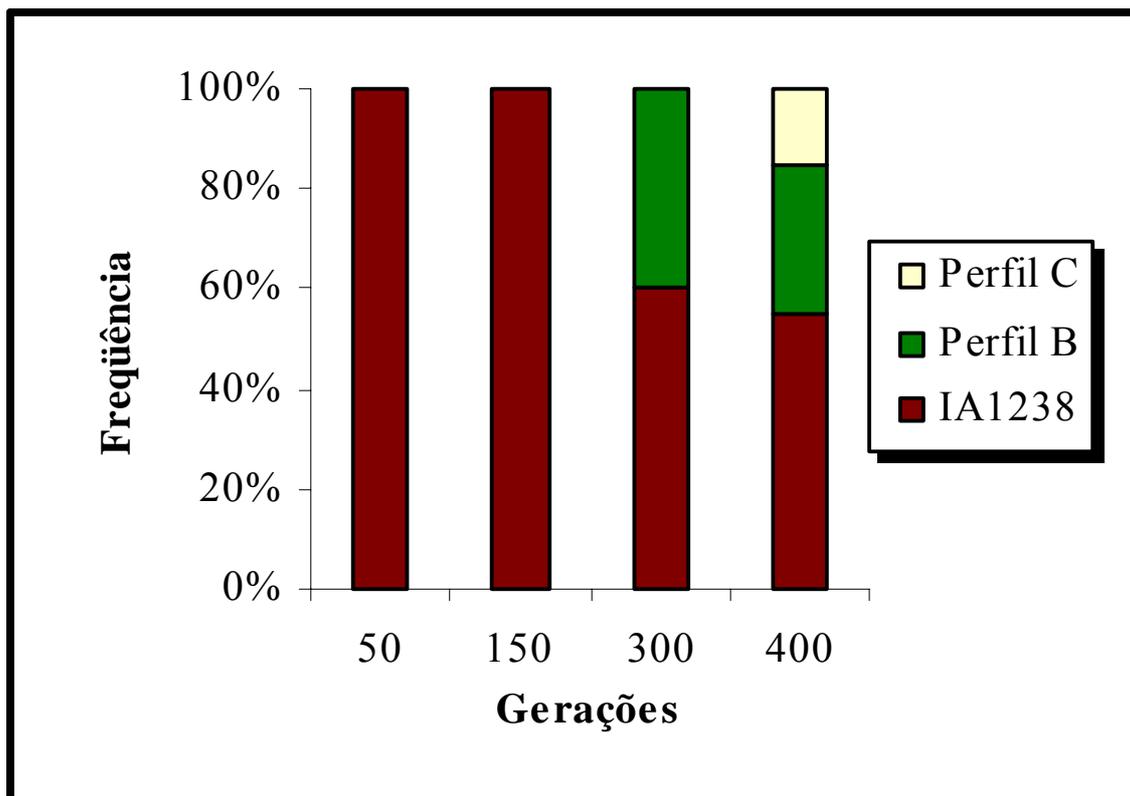


Figura 3

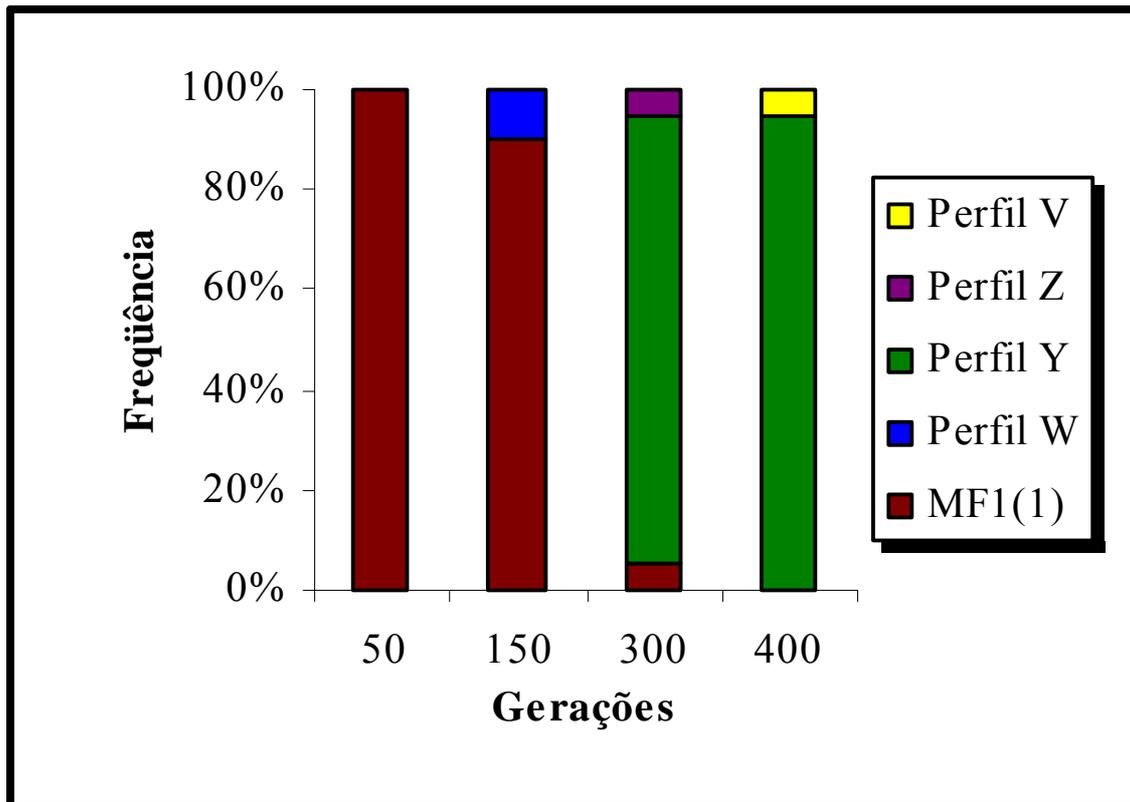


Figura 4

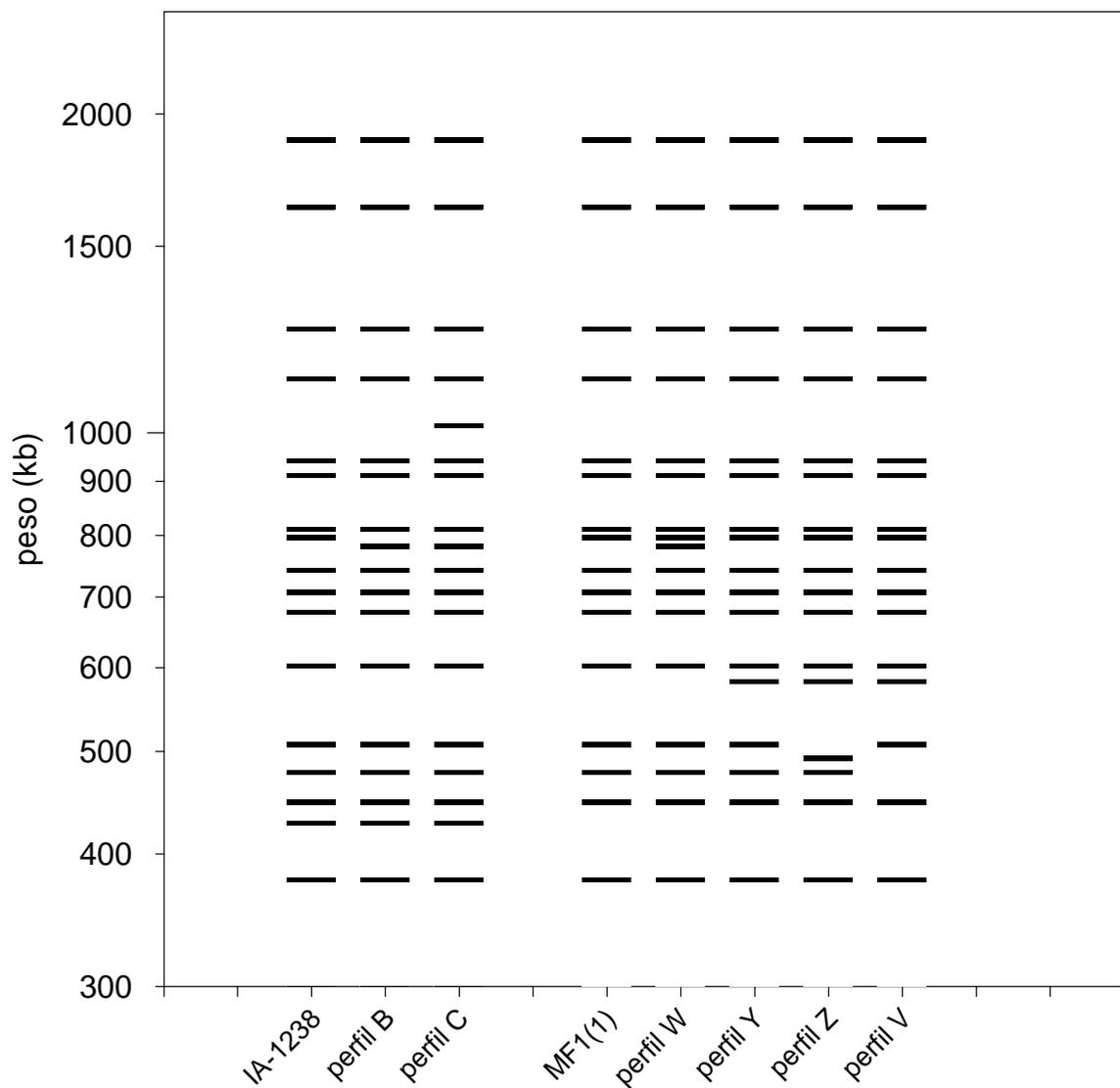


Figura 5

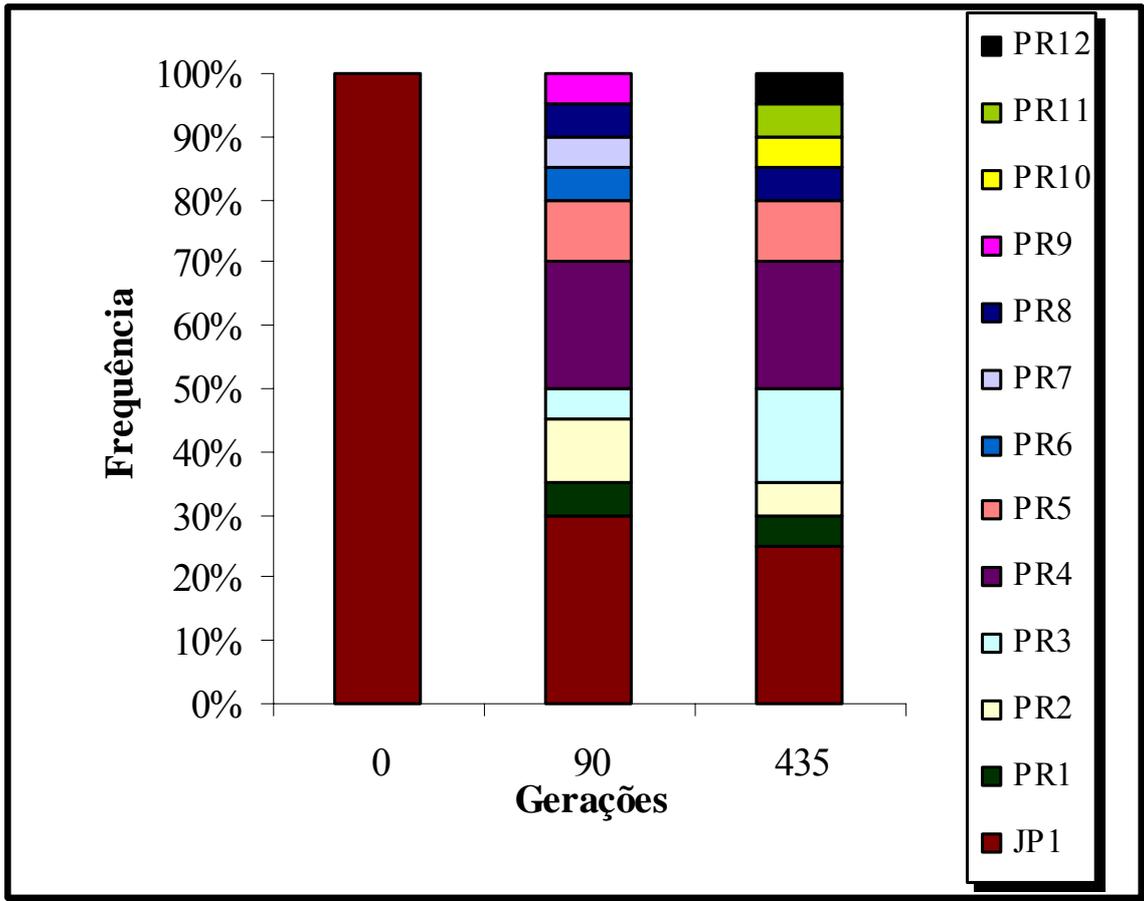


Figura 6

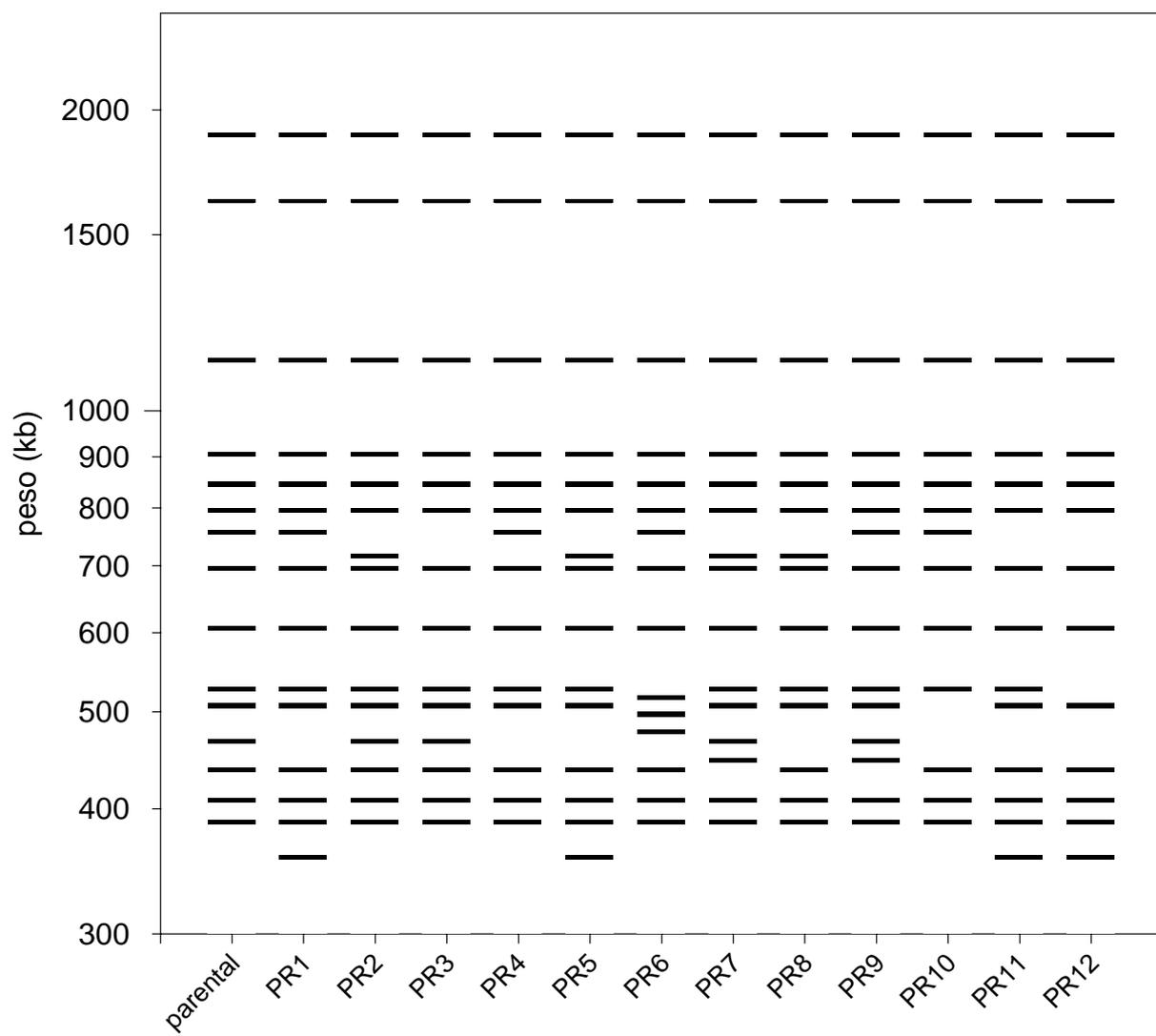


Figura 7

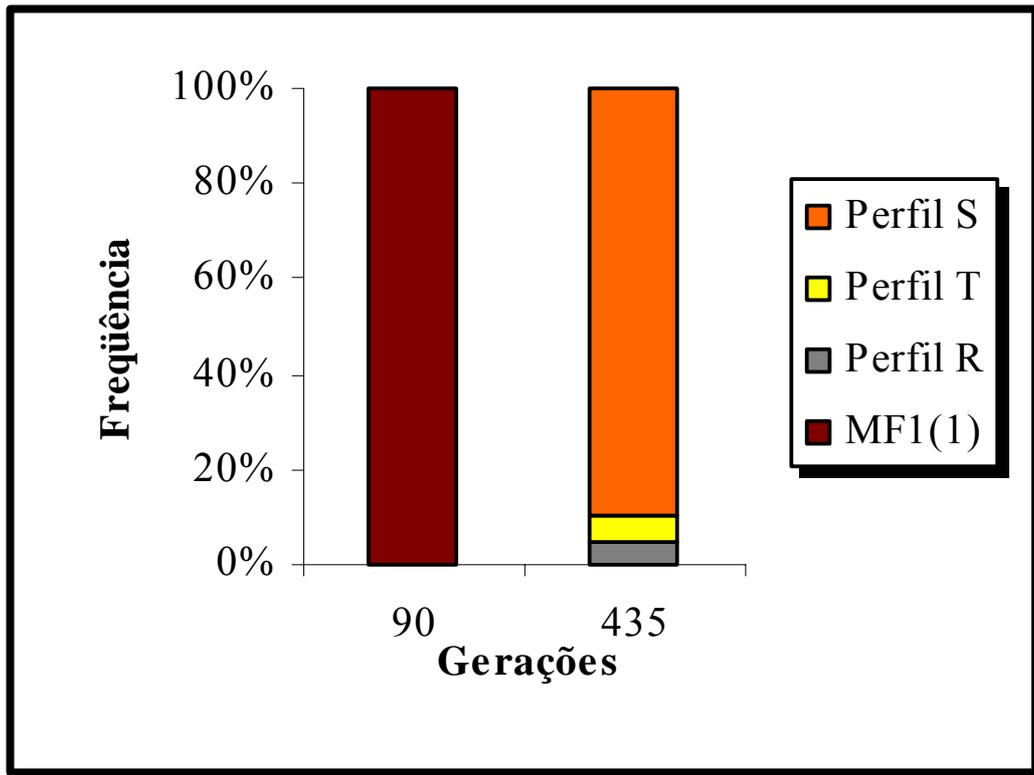


Figura 8

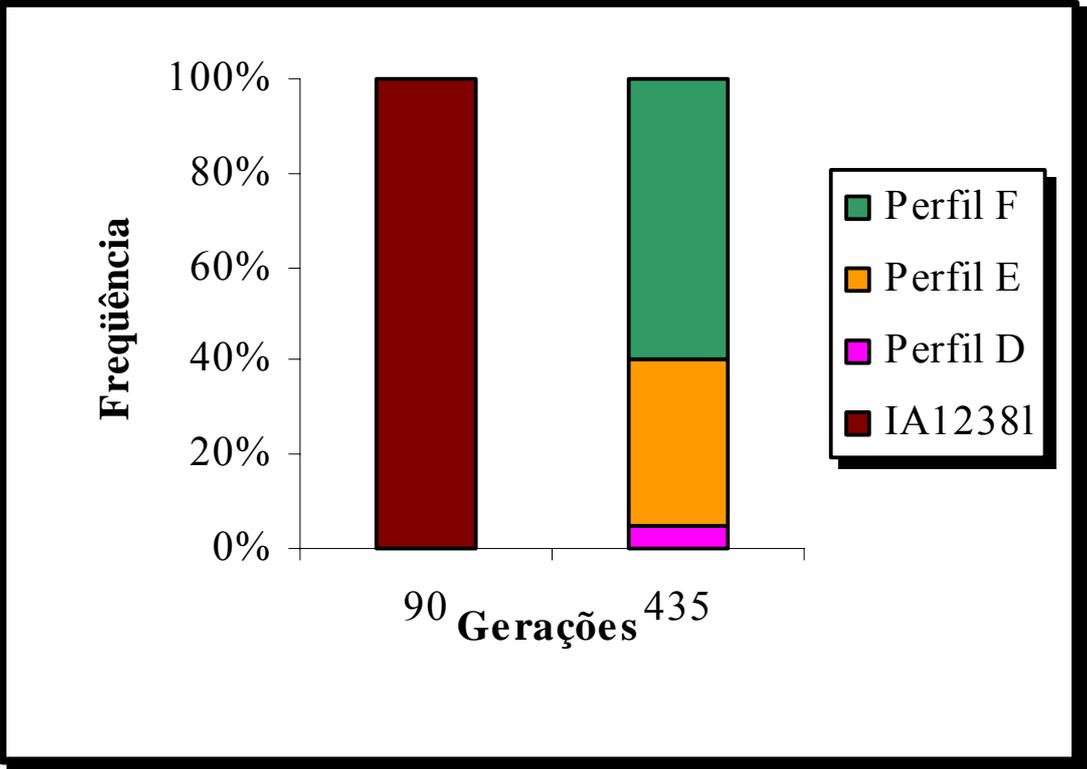


Figura 9

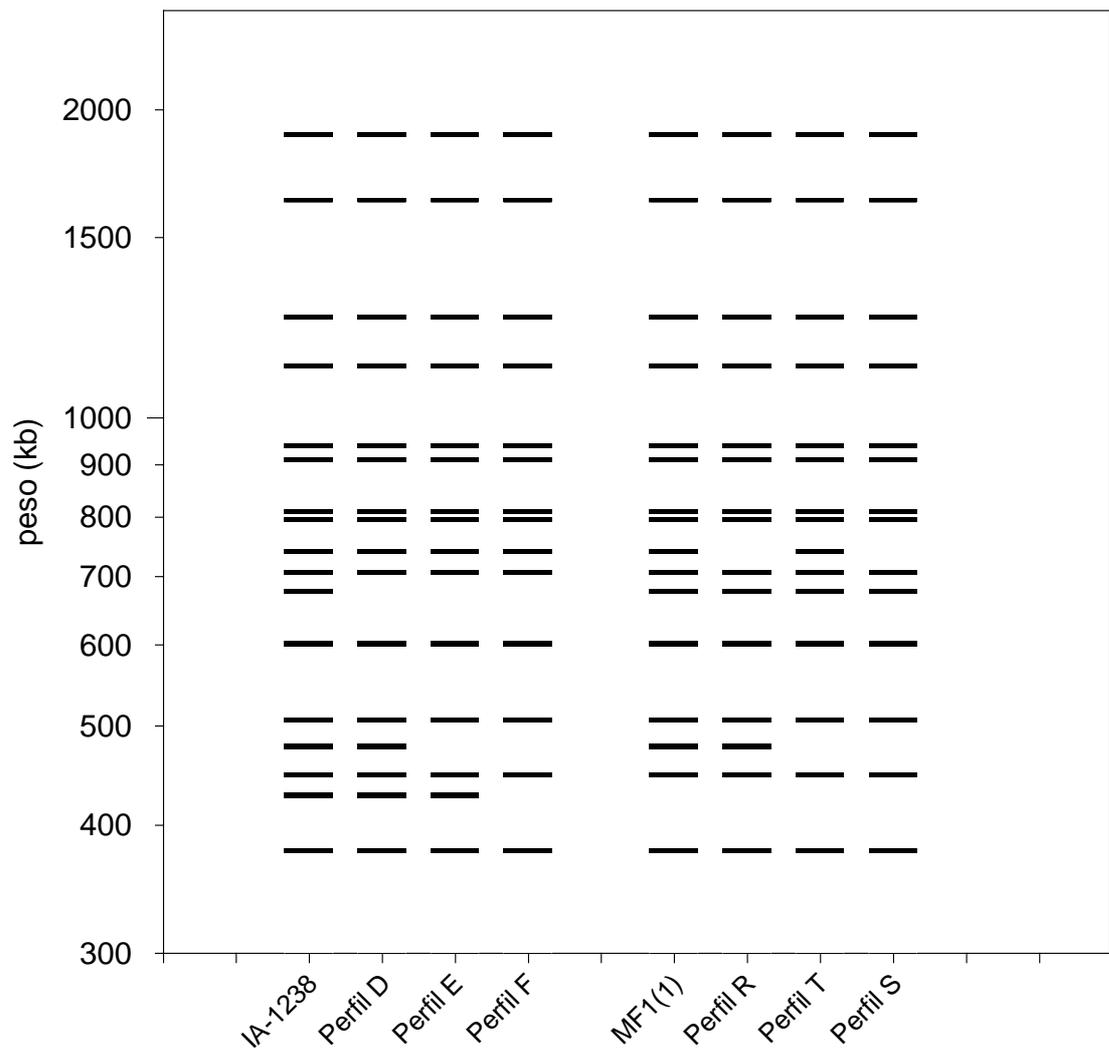


Figura 10

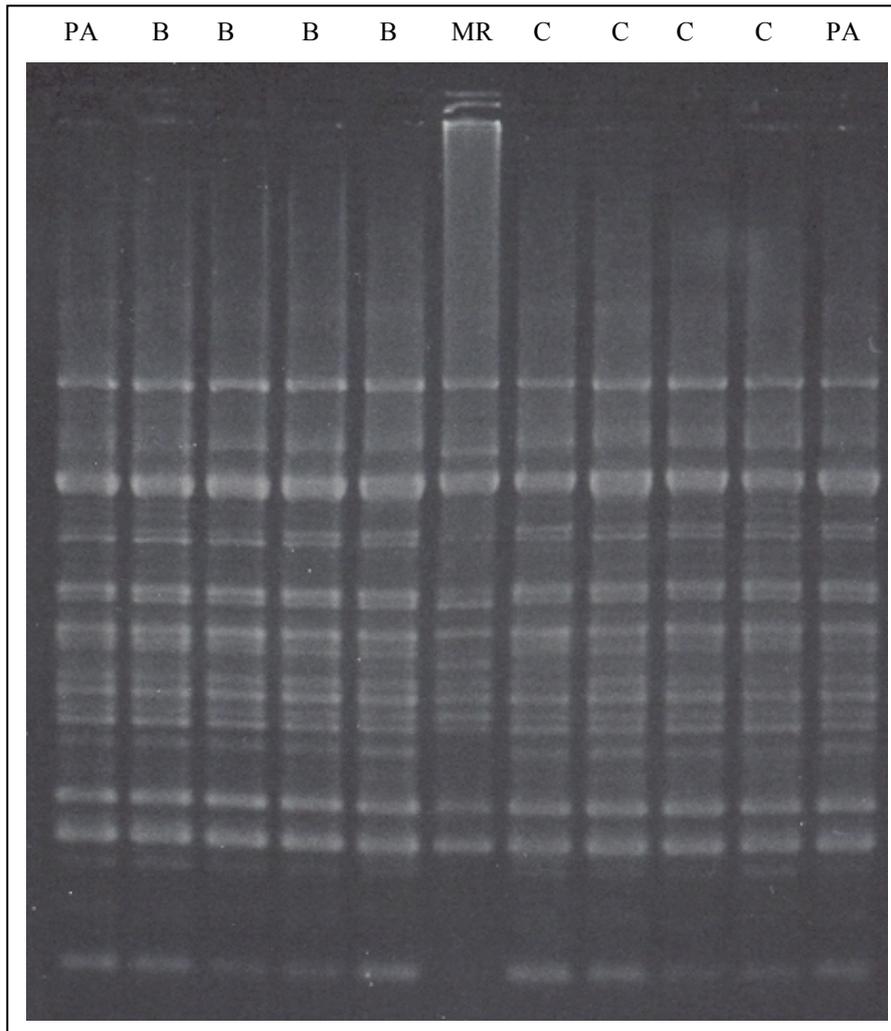


Figura 11

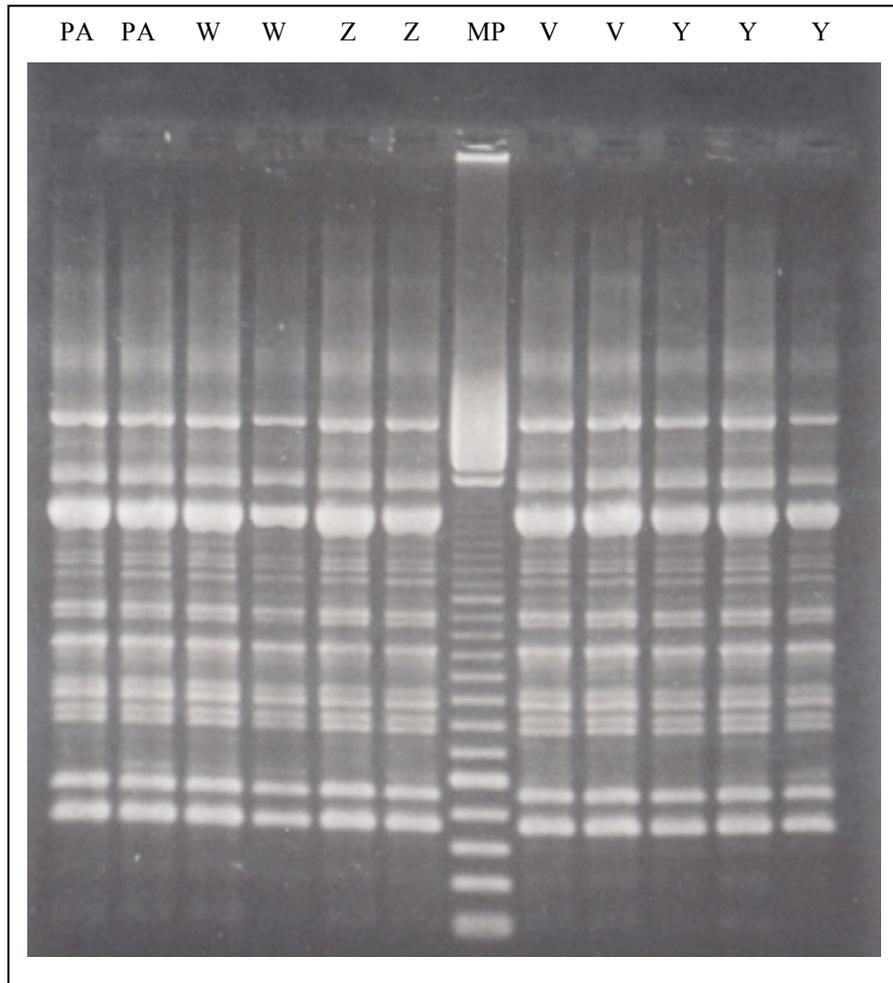


Figura 12

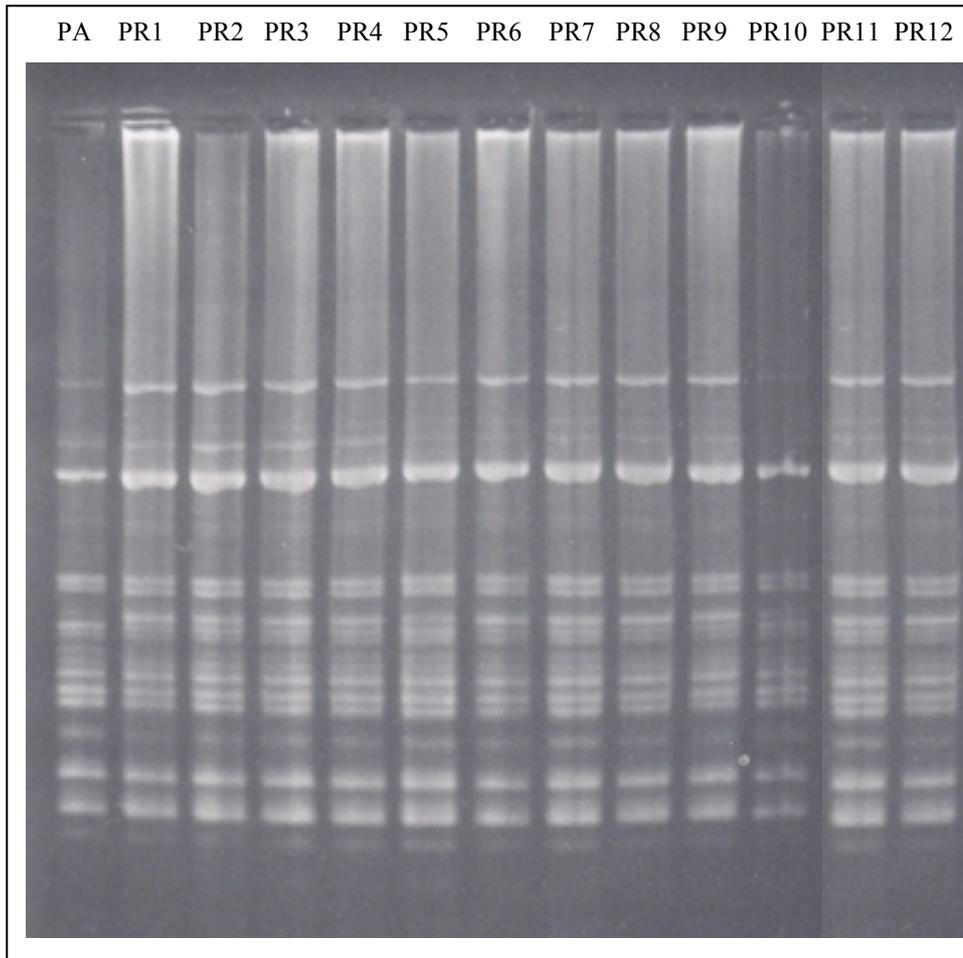


Figura 13

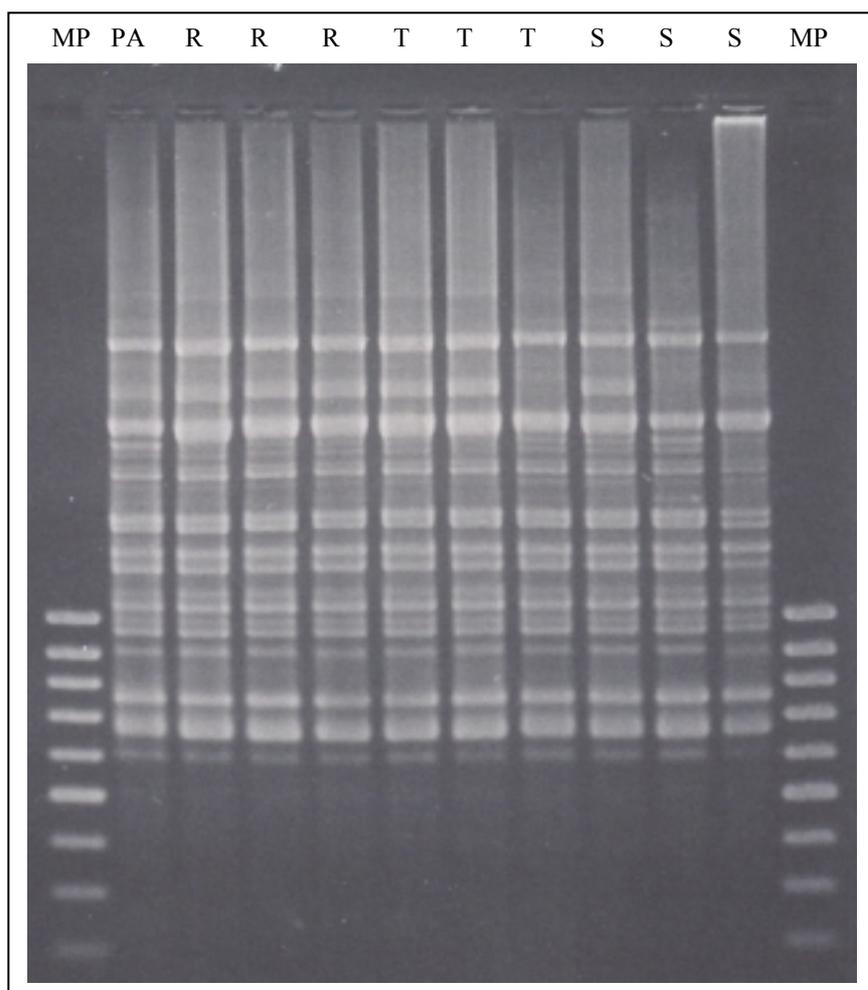
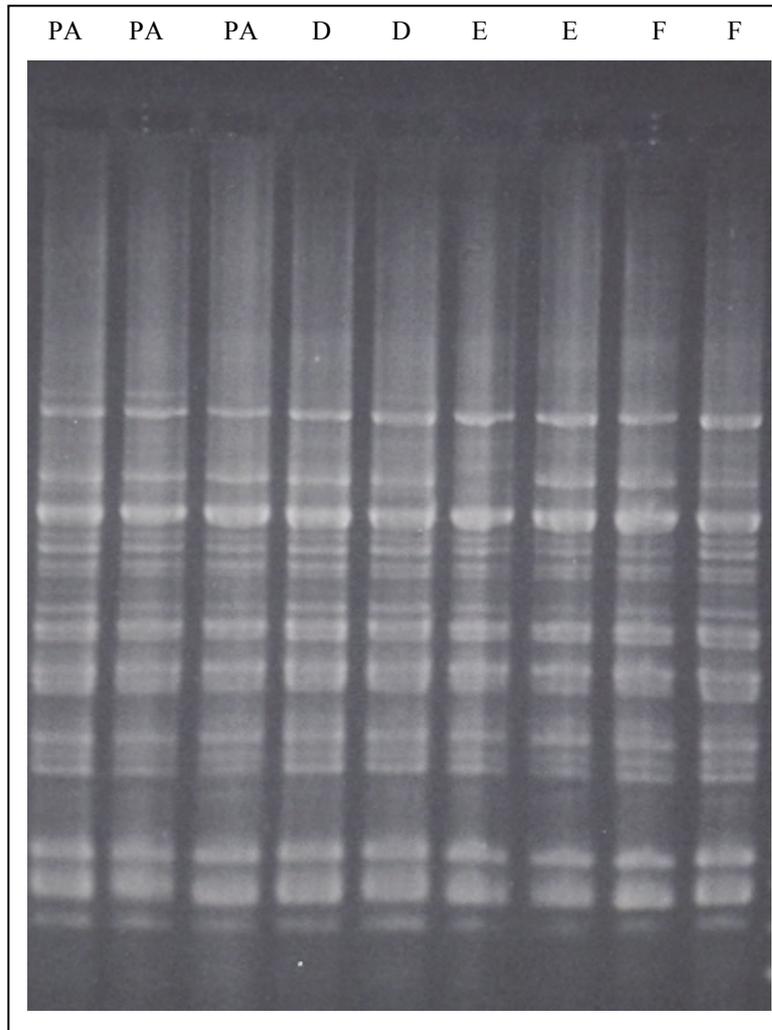


Figura 14



7. CONCLUSÕES

- O polimorfismo cromossômico foi evidenciado para os isolados MF1(1), IA1238 e JP1, tanto em condições aeróbicas quanto em anaerobiose. Os rearranjos cromossomos observados parecem está relacionados com a adaptabilidade as condições do meio.
- Os perfis rearranjantes produzidos pelos isolados MF1(1) e IA1238 foram completamente diferentes nas duas condições de cultivo. Este fato pode estar ligado a dois fatores intrínsecos: a alta variabilidade cromossômica deste isolado ou a diferenças nas pressões seletivas dos diferentes processos.
- O isolado JP-1 apresentou o maior número de rearranjantes cromossômicos, entretanto o perfil parental manteve-se ao longo dos cultivos. Desta forma, o aparecimento dos rearranjos cromossômico pode significar uma fonte de variabilidade genética das leveduras que propiciam uma rápida adaptação às contínuas mudanças ambientais, principalmente nas condições industriais.
- A técnica de cariotipagem molecular pode ter sua aplicabilidade comprometida em estudo de dinâmica populacional em processos industriais de fermentação alcoólica, pois a ocorrência de rearranjos cromossômicos, que são visualizados por esta técnica, podendo comprometer em certo nível a confiabilidade dos resultados obtidos.

Anexo

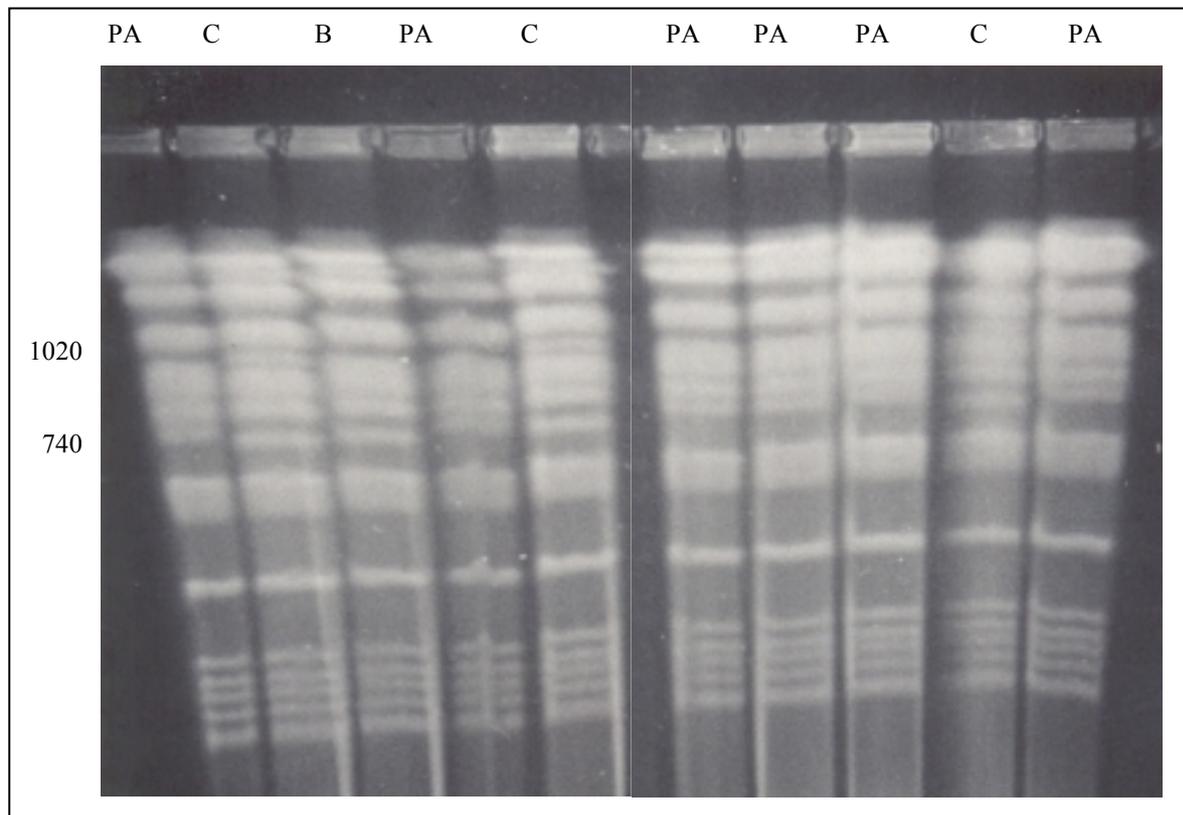


Figura A1: Perfis cariotípicos obtidos a partir do ensaio fermentativo em aerobiose com o isolado IA1238 (PA= perfil parental, B= perfil rearranjante B, C= perfil rearranjante

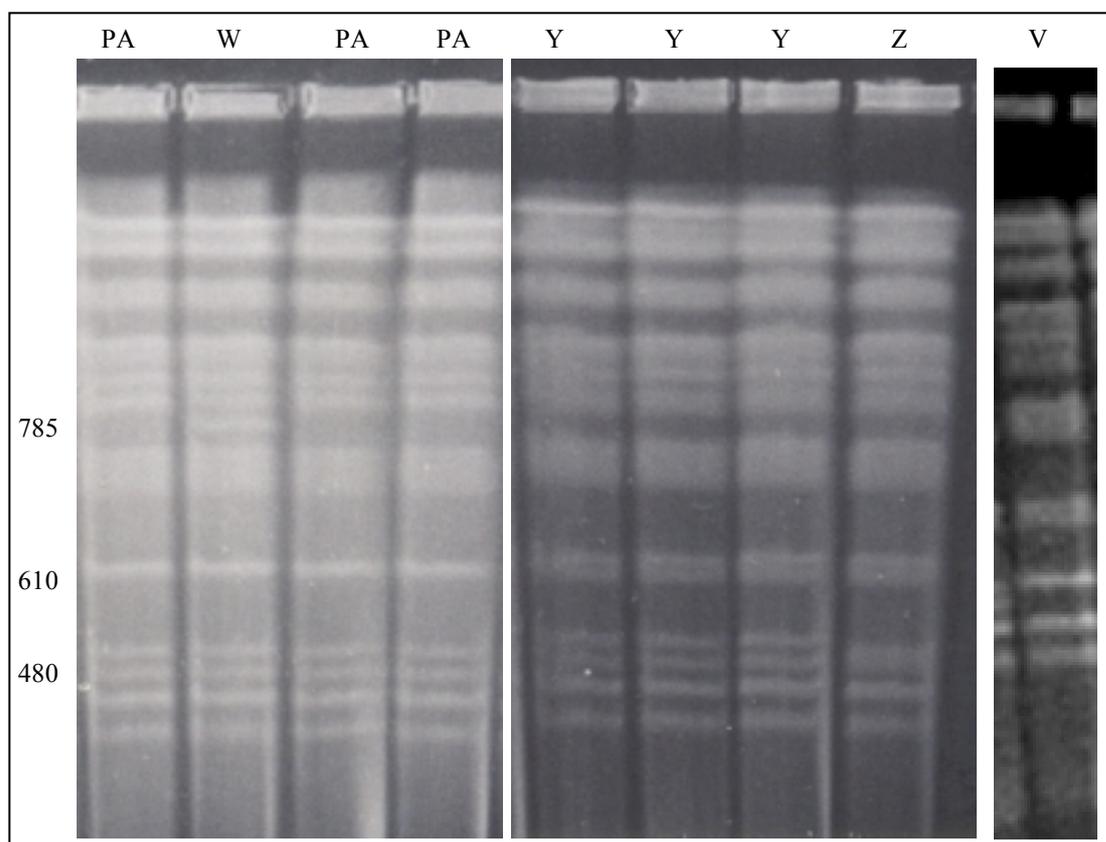


Figura A2: Perfis cariotípicos obtidos a partir do ensaio fermentativo em aerobiose com o isolado MF1(1) (PA= perfil parental, W= perfil rearranjante W, Y= perfil

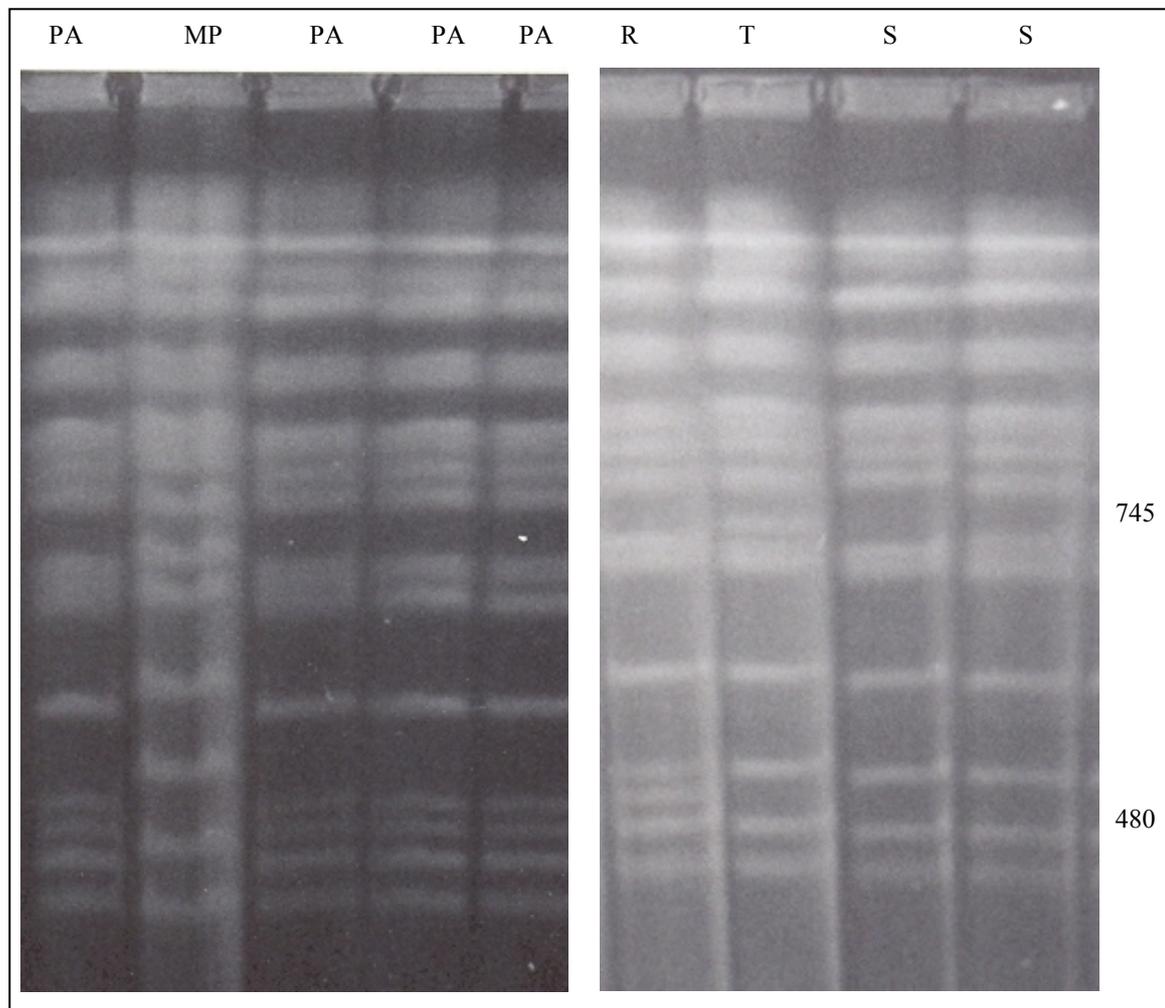


Figura A3: Perfis cariotípicos obtidos a partir do ensaio fermentativo em anaerobiose com o isolado MF1(1) (PA= perfil parental, R= perfil rearranjante R, T= perfil rearranjante T, S= perfil rearranjante S, MP= peso molecular)

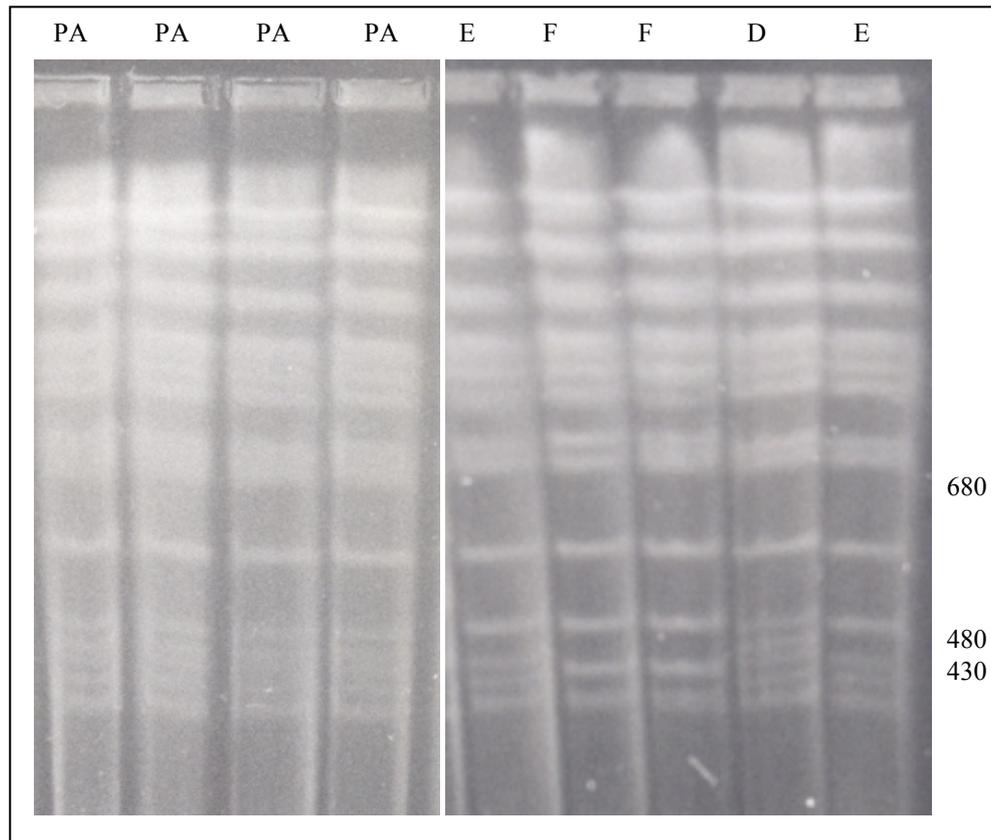


Figura A4: Perfis cariotípicos obtidos a partir do ensaio fermentativo em anaerobiose com o isolado IA1238 (PA= perfil parental, D= perfil rearranjante D, E= perfil rearranjante E, F= perfil rearranjante F)

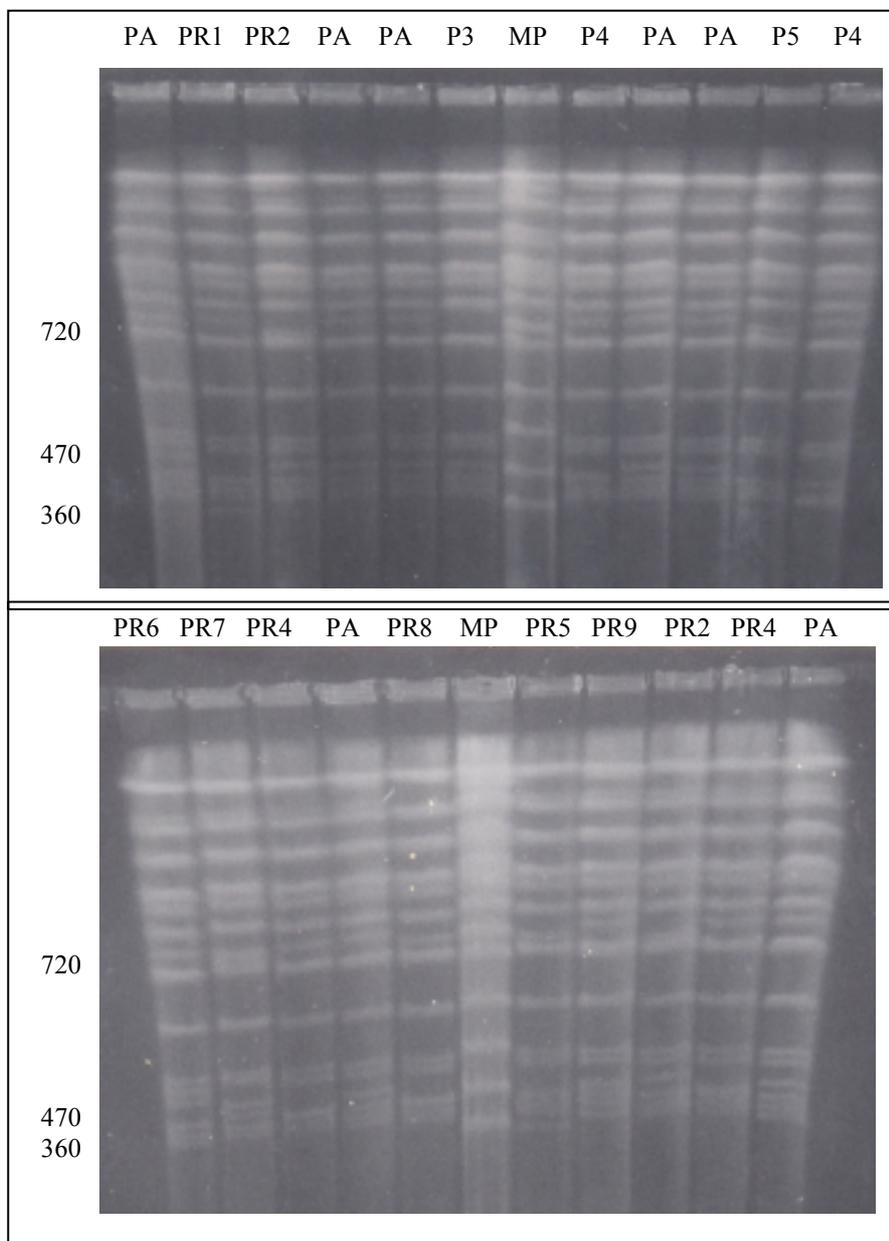


Figura A5: Perfis cariotípicos obtidos a partir do ensaio fermentativo em anaerobiose com o isolado JP1 (PA= perfil parental, PR= perfil rearranjante, MP= peso molecular)

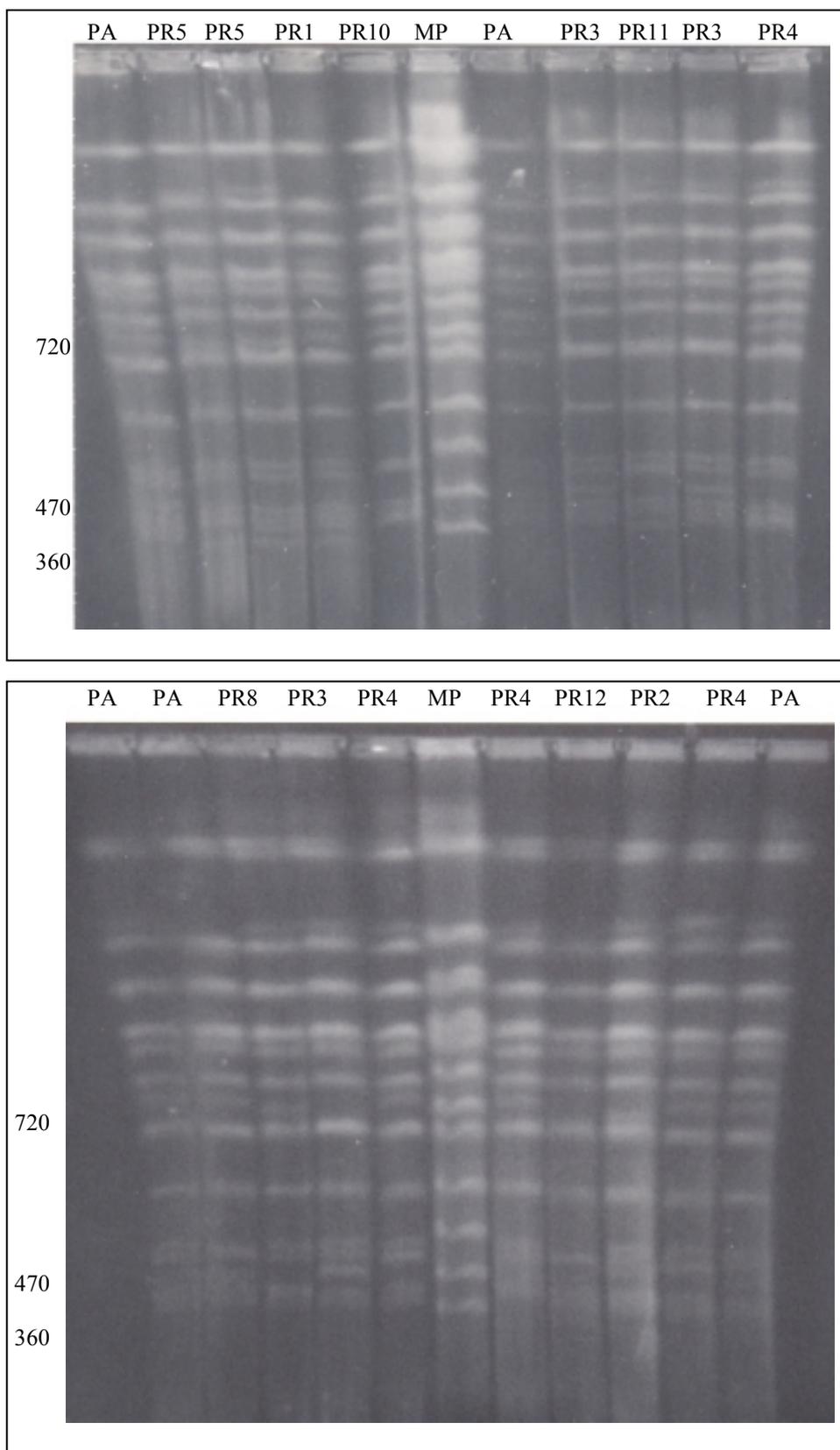


Figura A6: Perfis cariotípicos obtidos a partir do ensaio fermentativo em anaerobiose com o isolado JP1 (PA= perfil parental, PR= perfil rearranjante, MP= peso molecular)