

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



FABIANA DE MELO DUARTE

**“ANÁLISE DA VARIAÇÃO CARIOTÍPICA E DOS
MECANISMOS DE RECOMBINAÇÃO EM LEVEDURAS
INDUSTRIAIS (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*) DURANTE O
PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
FABIANA DE MELO DUARTE
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para obtenção
do Título de Mestre em Genética e
Biologia Molecular, na área de
Genética de Microrganismos.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
Co-orientador: Prof. Dr. Juan Lucas Argueso Gomes de Almeida

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

D85a

Duarte, Fabiana de Melo

Análise da variação cariotípica e dos mecanismos de recombinação em leveduras industriais (*Saccharomyces cerevisiae*) durante o processo de fermentação alcoólica / Fabiana de Melo Duarte. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Juan Lucas Argueso Gomes de Almeida.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Etanol – Produção. 2. Linhagem industrial. 3. Variação cariotípica. 4. Recombinação mitótica. 5. Perda de Heterozigosidade. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães. II. Almeida, Juan Lucas Argueso Gomes de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Analysis of the karyotypic variation and the recombination mechanisms in industrial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) during the alcoholic fermentation process.

Palavras-chave em inglês: Ethanol – Production; Industrial strain; Karyotypic variation; Mitotic recombination; Loss of Heterozygosity.

Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Marcelo Brocchi, Marco Antonio de Castro e Souza.

Data da defesa: 06/08/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 6 de agosto de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
(Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi



Assinatura

Dr. Marco Antonio de Castro e Souza



Assinatura

Prof. Dr. Fábio Papes

Assinatura

Dr. Luiz Humberto Gomes

Assinatura

RESUMO

O etanol de cana-de-açúcar brasileiro ocupa um lugar de destaque entre as alternativas energéticas disponíveis atualmente. No processo fermentativo de produção de etanol é utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, com destaque para a linhagem industrial PE-2, utilizada por cerca de 30% das usinas brasileiras, o que representa 10% da produção mundial. Essa linhagem associa uma alta eficiência na produção de etanol com uma excelente capacidade de adaptação ao ambiente altamente hostil e competitivo das dornas de fermentação. O nosso grupo de pesquisa realizou previamente uma caracterização genética e molecular detalhada de uma linhagem diplóide derivada diretamente de PE-2 (JAY270), o que forneceu inúmeras possibilidades para a manipulação genética dessa levedura com o objetivo de desenvolver linhagens mais produtivas. No entanto, alguns estudos observaram a ocorrência de variação cariotípica nessa linhagem durante o processo fermentativo, o que pode representar uma barreira para a manipulação dessa levedura. Sendo assim, é extremamente importante estudar o comportamento do genoma dessa linhagem durante a produção de etanol. Este projeto de Mestrado teve como objetivo principal a determinação do mecanismo de recombinação genética responsável pela geração de rearranjos cromossômicos na linhagem JAY270 durante a produção de etanol. Foi realizado um experimento de fermentação em escala semi-industrial iniciado com um inóculo puro de JAY270, com duração de 50 dias. A partir de amostras coletadas ao final do processo foram obtidos isolados que foram analisados através de PFGE (Gel de Eletroforese em Campo Pulsado) para identificação de derivados de JAY270 portadores de variação cariotípica. Dos derivados analisados, 36% possuíam algum tipo de rearranjo cromossômico em relação à linhagem inicial, dos quais 11 foram selecionados (FDY1-FDY11) para análises detalhadas. As sequências genômicas de dois derivados haplóides de JAY270 possibilitaram o desenvolvimento de 9 marcadores moleculares para genotipar regiões heterozigotas de JAY270 com o objetivo de identificar eventos de recombinação genética. Os 11 isolados selecionados foram analisados com esses marcadores e, exceto por um deles, todos continuavam heterozigotos em todas as regiões genotipadas. Dois mecanismos de recombinação genética podem ser responsáveis pela geração dos rearranjos, recombinação mitótica,

que ocorre em pontos isolados e recombinação meiótica, que envolve todo o genoma simultaneamente em um único ciclo celular. A possibilidade dos rearranjos terem sido gerados por recombinação meiótica foi excluída, visto que a probabilidade dos 10 isolados continuarem heterozigotos em todas as regiões analisadas após um evento de meiose seguido de cruzamento é extremamente baixa (entre 10^{-24} e 10^{-14}). Sendo assim, concluiu-se que os rearranjos cromossômicos foram gerados durante o crescimento vegetativo, e que, portanto, o mecanismo de recombinação genética responsável pela geração dos mesmos é a recombinação mitótica. Os 11 isolados também foram analisados através de CGH-array, que possibilitou a comparação de sua dosagem gênica com a da linhagem JAY270, que lhes deu origem. Com essa metodologia foi possível detectar eventos de recombinação mitótica que resultaram em perda de heterozigosidade nas extremidades de alguns cromossomos.

ABSTRACT

Brazilian sugar cane ethanol stands out among the energetic alternatives available nowadays. In the fermentation process to produce ethanol it is used the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. One of the most widely adopted strains is the industrial isolate PE-2, currently used by ~30% of Brazilian distilleries, generating ~10% of the world's ethanol supply. This strain combines a high performance in ethanol fermentation and an excellent adaptation to the hostile environment in the fermentation vats. Our research group previously carried out a thorough genetic characterization of an isolate of the PE-2 strain, known as JAY270. This analysis offers several opportunities for the improvement and modification of this strain. However, some studies observed the occurrence of karyotypic variation in this strain during the fermentation process, what can represent a barrier to the genetic manipulation of this yeast. Therefore, it is extremely important to study the genome behavior of this yeast during the ethanol production process. The main objective of this Master's Project was to determinate the genetic recombination mechanism responsible for generating chromosomal rearrangements in JAY270 during the ethanol production. A fermentation experiment in semi-industrial scale was carried out with a pure initial inoculum of JAY270. After 50 days, samples were collected and used to obtain single colony isolates. This isolates were analyzed through PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) to the identification of JAY270 derivatives carrying karyotypic variation. Of the analyzed derivatives, 36% had at least one chromosomal rearrangement. 11 of these derivatives were chosen to perform detailed analyses and were called FDY1-FDY11. The genome sequences of two haploid derivatives of JAY270 were used to develop 9 molecular markers to genotype heterozygous regions of JAY270 to identify genetic recombination events. The 11 isolates were analyzed with these markers and, except by one of them, all isolates were heterozygous in all genotyped regions. Two genetic recombination mechanisms can be responsible for generating the rearrangements, mitotic recombination, which occurs in isolate points of the genome, and meiotic recombination, that simultaneously affects all the genome in one single cellular cycle. The probability of the 10 isolates stay heterozygous in all genotyped regions after one event of meiosis followed by mating is extremely low (between 10^{-24} e 10^{-14}). This result showed that these rearrangements

couldn't be generated through meiotic recombination. Therefore, it was possible to conclude that the chromosomal rearrangements were generated during vegetative growth through mitotic recombination. The 11 isolates also were analyzed through CGH-array to compare their gene dosage with the strain JAY270. With this methodology it was possible to detect mitotic recombination events that resulted in loss of heterozygosity in peripheral regions of some chromosomes.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. PRODUÇÃO DE ETANOL NO BRASIL	1
2. LEVEDURAS INDUSTRIAIS	2
3. CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM INDUSTRIAL PE-2.....	3
4. VARIAÇÃO CARIOTÍPICA EM LINHAGENS INDUSTRIAIS DE LEVEDURA	5
4.1. <i>Variação cariotípica em linhagens de levedura utilizadas em processos de fermentação no Brasil</i>	9
5. OBJETIVOS E IMPORTÂNCIA DO TRABALHO	11
MATERIAL E MÉTODOS	14
1. LINHAGENS UTILIZADAS.....	14
2. MEIOS DE CULTURA	14
3. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM ESCALA INDUSTRIAL COM A LINHAGEM JAY270	14
4. PRÉ-SELEÇÃO DOS ISOLADOS OBTIDOS DA AMOSTRA COLETADA NA DORNA DE FERMENTAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DE DERIVADOS DE JAY270	15
5. PFGE (GEL DE ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO)	16
6. GENOTIPAGEM DOS ISOLADOS FDY1-FDY11 COM OS MARCADORES MOLECULARES M1-M9.....	17
6.1. <i>Extração de DNA genômico</i>	17
6.2. <i>PCR com os primers correspondentes aos marcadores moleculares M1-M9</i>	18
6.3. <i>Reações de digestão com as enzimas de restrição correspondentes aos marcadores moleculares M1-M9</i>	18
7. CGH-ARRAY - HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA EM MICRO-ARRANJOS	19
7.1. <i>Preparação do DNA</i>	19
7.2. <i>Marcação do DNA e hibridização em micro-arranjos</i>	19
7.3. <i>Análise computacional dos resultados obtidos</i>	20
RESULTADOS.....	21
1. OBTENÇÃO DE COLÔNIAS ISOLADAS.....	21
2. IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE ISOLADOS COM REARRANJOS CROMOSSÔMICOS	22
2.1. <i>Cariotipagem molecular dos isolados através de PFGE</i>	22
2.2. <i>Pré-seleção das colônias isoladas</i>	24
2.3. <i>Cariotipagem molecular por PFGE dos isolados pré-selecionados</i>	25
3. DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES PARA GENOTIPAGEM DE REGIÕES HETEROZIGOTAS DO GENOMA DE FDY1-FDY11	29
3.1. <i>Desenvolvimento dos marcadores moleculares</i>	29
3.2. <i>Teste dos marcadores moleculares em linhagens com constituição genética conhecida</i>	35
3.3. <i>Genotipagem de FDY1-FDY11 através dos marcadores M1-M9</i>	40
4. ANÁLISE DE CNVs EM FDY1-FDY11 ATRAVÉS DE CGH-ARRAY	46
DISCUSSÃO	57
1. VARIAÇÃO CARIOTÍPICA EM JAY270 DURANTE A PRODUÇÃO DE ETANOL	57
2. MECANISMOS DE RECOMBINAÇÃO GENÉTICA RESPONSÁVEIS PELA GERAÇÃO DOS REARRANJOS CROMOSSÔMICOS	58
CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

INTRODUÇÃO

1. Produção de etanol no Brasil

Nos últimos tempos a preocupação com os efeitos alarmantes das mudanças climáticas e com a instabilidade do mercado de petróleo tem afligido nações em todo o mundo. Impulsionados por essas questões, diversos países estão cada vez mais adotando políticas que têm como objetivos a independência energética e a redução na emissão dos gases causadores do efeito estufa. Dentre as alternativas energéticas a serem exploradas, destacam-se os biocombustíveis, grupo que compreende todos os combustíveis de origem biológica e com fonte renovável (Robertson et al. 2008). Dentre as alternativas mais viáveis de biocombustível disponíveis, o etanol de cana-de-açúcar brasileiro se destaca como uma referência mundial, sendo considerado um dos maiores e mais substanciais sucessos mundiais na utilização de biocombustíveis (Marris 2006). Esse sucesso se deve principalmente ao fato de sua produção ser baseada em uma plataforma tecnológica já provada e utilizada por muito tempo, visto que o Brasil foi pioneiro na adoção de um programa nacional de produção de etanol de cana-de-açúcar (Proálcool) como fonte alternativa de energia após o primeiro choque na oferta de petróleo na década de 70 (Marris 2006). Em resposta ao alto custo do petróleo e à crescente demanda por fontes renováveis de energia, o país tem expandido drasticamente a sua produção de etanol, ocupando um lugar de destaque na produção mundial desse biocombustível.

A produção de etanol a partir da fermentação dos açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar é realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esse processo é tipicamente iniciado com um inóculo puro, que na maioria das vezes é reutilizado ao longo de toda a safra de cana-de-açúcar, que pode durar até 9 meses. Após o final da fermentação de cada batelada de caldo, as leveduras são separadas por centrifugação, recebem um tratamento ácido para eliminar as bactérias contaminantes e são transferidas novamente para a dorna de fermentação para iniciarem o processamento de uma nova batelada (Wheals et al. 1999). Além do processo de fermentação em batelada, a produção de etanol também pode ser realizada através de um processo de fermentação contínua. Outra característica importante do processo de produção de

etanol no Brasil é a alta carga de contaminantes microbiológicos, que são introduzidos nas dornas juntamente com o caldo de cana, visto que não ocorre uma etapa prévia de esterilização completa. Além disso, durante o processo as leveduras também são submetidas a vários tipos de estresses abióticos, como altas concentrações de etanol, altas temperaturas, estresses osmóticos e elevada acidez.

2. Leveduras industriais

A reutilização das células durante toda a safra associada à contínua entrada de microrganismos contaminantes no sistema e à exposição a vários tipos de estresses ambientais resulta na criação de um ambiente altamente competitivo e seletivo no interior das dornas de fermentação, o que constitui uma importante barreira para a introdução de leveduras melhoradas no processo. Sendo assim, apesar de alguns trabalhos terem obtido sucesso no desenvolvimento de linhagens mais produtivas através do melhoramento genético tradicional (Tavares et al. 1987), a permanência dessas leveduras no processo é muitas vezes comprometida pela maior capacidade de adaptação de linhagens selvagens invasoras, que podem vir a colonizar as dornas e eventualmente substituir por completo o inóculo inicial. Essa substituição, por sua vez, frequentemente é acompanhada por uma simultânea redução no rendimento do processo devido às propriedades indesejáveis de muitos desses contaminantes (Wheals et al. 1999).

Reconhecendo essa limitação, um trabalho realizado por pesquisadores acadêmicos em parceria com o setor industrial selecionou entre as leveduras selvagens contaminantes com alta capacidade de adaptação aquelas que também apresentavam propriedades fermentativas desejáveis (Basso et al. 2008). Como resultado, atualmente estão disponíveis linhagens que associam características de importância industrial, como elevado rendimento fermentativo, alta viabilidade durante o processo de reaproveitamento celular e baixa produção de espuma, com uma excelente capacidade de competir com as leveduras invasoras e dominar a população microbiológica das dornas de fermentação, o que possibilita sua implantação e permanência no processo durante toda a safra (Basso et al. 2008). Dentre esse grupo, destacam-se as linhagens PE-2, CAT-1, e BG-1, que estão entre as mais utilizadas pelas usinas de etanol

brasileiras (Basso et al. 2008).

3. Caracterização da linhagem industrial PE-2

Dentro desse grupo de leveduras selvagens isoladas do próprio processo, um dos exemplos de maior sucesso é a linhagem PE-2 (Basso et al. 2008), utilizada por aproximadamente 30% das usinas brasileiras, o que representa uma parcela de cerca de 10% na produção mundial de etanol. Apesar de sua enorme importância para a produção de etanol no Brasil, até recentemente a linhagem PE-2 ainda permanecia completamente desconhecida do ponto de vista genético-molecular. Essa falta de informações sobre a biologia molecular dessa linhagem representava uma barreira para o eventual melhoramento de suas habilidades naturais. Desde 2007, no entanto, nosso grupo de pesquisa vem dando passos importantes para romper essas barreiras e desvendar as características genéticas e moleculares da linhagem PE-2 com o objetivo final de desenvolver estratégias de manipulação e domesticação (Argueso et al. 2009).

Como os estoques da linhagem PE-2 disponíveis comercialmente são constituídos por uma população mista de células com perfis cariotípicos muito similares, foi necessário purificá-la através da obtenção de colônias isoladas. Foi então selecionada uma única colônia isolada que apresentava um perfil cariotípico representativo da média da população original (Argueso et al. 2009). Esse novo isolado, denominado JAY270, é indistinguível da cultura original da linhagem PE-2 em testes fenotípicos (Argueso et al. 2009).

Nosso grupo realizou uma caracterização genética molecular detalhada do isolado JAY270, que incluiu a análise estrutural de seus cromossomos e o sequenciamento completo do genoma de duas linhagens haplóides irmãs derivadas do mesmo (JAY291 e JAY292) (Argueso et al. 2009). Os resultados obtidos demonstraram que JAY270 é uma linhagem diplóide naturalmente heterotática que apresenta um genoma altamente heterozigoto, com alta frequência de polimorfismos estruturais e de nucleotídeos (Argueso et al. 2009).

Em relação à variação na sequência de nucleotídeos, o sequenciamento do genoma de JAY291 e JAY292 revelou que o genoma de JAY270 apresenta uma densidade estimada de ~2,6 SNP/Kb entre regiões alélicas em cromossomos

homólogos (Argueso et al. 2009).

A cariotipagem molecular através de PFGE (Gel de eletroforese em campo pulsado) revelou claros polimorfismos de tamanho entre os cromossomos de JAY270 e da linhagem padrão de laboratório S288c. Essa análise também revelou polimorfismos entre vários pares de cromossomos homólogos em JAY270. Essa variação estrutural abundante está confinada às regiões periféricas dos cromossomos de JAY270, enquanto as porções centrais permanecem estruturalmente conservadas. Nessas regiões terminais são encontrados genes em hemizigose, que se caracterizam pela presença de apenas uma cópia em um par de cromossomos homólogos. Devido a essa estrutura heterogênea nas porções periféricas, em alguns casos os genes localizados nessas regiões estão representados em um número de cópias alterado em relação a outras regiões do genoma. Alguns desses genes com alto número de cópias estão relacionados com mecanismos de tolerância a estresses ambientais enfrentados nas dornas de fermentação (Argueso et al. 2009).

Apesar do nível elevado de variação estrutural, a linhagem JAY270 apresenta uma alta eficiência de esporulação e uma alta frequência de esporos viáveis (~93%) (Argueso et al. 2009).

Esses resultados sugerem que o genoma de JAY270 apresenta uma organização cromossômica na qual os setores centrais, que contêm os genes essenciais, são refratários a rearranjos cromossômicos, enquanto as regiões periféricas apresentam uma alta plasticidade e podem submeter-se a mecanismos de recombinação (Argueso et al. 2009).

A frequência elevada de polimorfismos estruturais e de nucleotídeos demonstra que existe um nível muito alto de diversidade genética em JAY270. Os níveis elevados de heterozigose no genoma são frequentemente associados com o crescimento robusto e a alta produtividade de plantas e animais híbridos. Esse fenômeno já foi bem estudado e caracterizado e é conhecido como vigor do híbrido ou heterose (Hochholdinger et al. 2007).

As condições ambientais no interior da dorna de fermentação estão sob constante alteração durante o processo industrial de produção de etanol. Nesse ambiente, diferentes alelos ou combinações de alelos podem ser favorecidos sob

diferentes situações. Dessa forma, é possível que o alto nível de heterozigose do genoma de JAY270 confira a essa linhagem uma capacidade de se adaptar melhor às alterações no ambiente, o que é extremamente importante para a habilidade dessa linhagem em competir com outras linhagens durante o processo (Argueso et al. 2009; Argueso et al. 2010). Sendo assim, é muito provável que exista uma forte associação entre a organização genômica complexa e heterogênea de JAY270 e sua capacidade de adaptação ao ambiente altamente hostil e competitivo encontrado no interior das dornas de fermentação (Argueso et al. 2009; Argueso et al. 2010).

4. Variação cariotípica em linhagens industriais de levedura

As diferentes linhagens da espécie *S. cerevisiae* possuem perfis cariotípicos característicos e altamente variáveis entre si, que são utilizados como critério de identificação e diferenciação (Bakalinsky et al. 1990; Vezinhet et al. 1990; Yamamoto et al. 1991; Vezinhet et al. 1992; Codon et al. 1995; Benítez et al. 1996). Além disso, alguns estudos já detectaram a ocorrência de instabilidade cariotípica durante o crescimento vegetativo em linhagens selvagens de levedura utilizadas na produção de vinho e cerveja (Adams et al. 1992; Longo et al. 1993; Miklos et al. 1997; Nadal et al. 1999; Schuller et al. 2007; James et al. 2008).

A prevalência desse fenômeno em linhagens selvagens de levedura utilizadas em processos industriais de fermentação sugere que a ocorrência de rearranjos cromossômicos pode ser capaz de conferir vantagens adaptativas, visto que durante tais processos essas linhagens enfrentam diversos tipos de estresses ambientais (Adams et al. 1992; Carro et al. 2003; James et al. 2008). Dessa forma, é possível que a instabilidade cariotípica seja capaz de gerar variantes mais adaptados, o que confere a essas linhagens selvagens uma capacidade de responder a condições ambientais mais extremas (Dunham et al. 2002; James et al. 2008). Alguns autores acreditam, no entanto, que seja difícil conciliar os efeitos potencialmente deletérios de alguns tipos de rearranjos cromossômicos, como perda de segmentos cromossômicos e perda de heterozigosidade, com seus possíveis efeitos adaptativamente vantajosos (Carro et al. 2003).

Em Schuller et al. 2007, 100 isolados de uma linhagem comercial de *S. cerevisiae* utilizada na produção de vinho em Portugal foram recuperados de fermentações espontâneas. Após a comparação com o perfil cariotípico da linhagem original, foi encontrada uma alta porcentagem de variações no tamanho dos cromossomos, mais evidentes para os cromossomos menores 3 e 6. Além disso, observou-se perda total de heterozigosidade em 2 dos isolados analisados, que também tiveram o crescimento e a capacidade fermentativa afetados. Os autores do trabalho sugerem que as alterações genéticas observadas podem estar relacionadas com mecanismos de adaptação a mudanças nas condições ambientais (Schuller et al. 2007).

Em um trabalho realizado com um derivado diplóide de uma linhagem de champagne de *S. cerevisiae*, também foi estabelecida uma relação entre a ocorrência de instabilidade cariotípica considerável e a exposição a condições ambientais extremas (Coyle et al. 2008). Os autores demonstraram que rearranjos cromossômicos ocorrem com alta frequência em populações de levedura sob privação completa de nutrientes e que alguns desses rearranjos são adaptativos, visto que as células que os continham tornaram-se mais resistente à escassez de nutrientes (Coyle et al. 2008).

Em um estudo realizado previamente com variantes tolerantes a altas temperaturas derivados de uma linhagem de levedura utilizada na produção industrial de cerveja (*Saccharomyces pastorianus*) observou-se que os mesmos possuíam rearranjos cromossômicos consideráveis em relação à linhagem parental (James et al. 2008). Para investigar se esses rearranjos ocorriam espontaneamente durante o processo de fermentação analisou-se a integridade cromossômica de variantes tolerantes a estresse e de seus parentais durante um ciclo de 8 dias de fermentação sob condições de estresse que são enfrentadas durante o processo (James et al. 2008). Os resultados demonstraram que essas linhagens apresentam uma instabilidade cromossômica evidente, principalmente quando submetidas a condições ambientais mais extremas (James et al. 2008). Nesse trabalho, no entanto, foi analisada apenas a média das alterações que ocorreram na população em relação à célula inicial. Sendo assim, não foi possível comprovar se linhagens com alterações cromossômicas específicas eram realmente mais adaptadas que a linhagem parental. Além disso, como

o experimento foi de curta duração, não seria possível verificar se algum dos variantes foi capaz de substituir a linhagem inicial devido a uma maior adaptação às condições do ambiente (James et al. 2008).

Em Nadal et al. 1999, analisou-se a estabilidade cariotípica durante o crescimento vegetativo de linhagens selvagens de levedura utilizadas na produção de vinho espumante na Espanha. Os resultados obtidos demonstraram que essas linhagens apresentam uma instabilidade cariotípica considerável e que tanto a frequência quanto a natureza das alterações cromossômicas variavam de acordo com a composição genética da linhagem e com o meio de cultura utilizado. Nesse trabalho não foi encontrado nenhum forte indicativo de que os cariótipos rearranjados possuísem alguma vantagem seletiva em relação aos parentais, sendo que em nenhum dos casos ocorreu a substituição da linhagem parental por algum dos variantes cariotípicos derivados da mesma. Após 100 gerações, todos os derivados portadores de variação cariotípica analisados eram diferentes entre si, ou seja, o único padrão cromossômico que se repetiu foi o original. De acordo com os autores, apesar dos dados obtidos sugerirem que a maioria dos rearranjos cromossômicos que ocorrem em populações selvagens são seletivamente neutros, eles podem fornecer uma fonte significativa de variabilidade genética que pode ser importante para a adaptação da linhagem a alterações nas condições ambientais (Nadal et al. 1999).

Em um trabalho posterior desse mesmo grupo de pesquisa, determinou-se que a taxa de rearranjos de uma dessas linhagens que apresentaram instabilidade cariotípica considerável era de 10^{-2} alterações cromossômicas por geração durante o crescimento vegetativo em meio não-seletivo (Carro et al. 2001), valor duas ordens de magnitude maior do que a taxa de rearranjos espontâneos em linhagens de laboratório diplóides (10^{-4} ; Hiraoka et al. 2000). Após análises de segregação nessa linhagem, os autores identificaram uma aparente ligação entre os rearranjos cromossômicos que ocorreram durante a mitose e a meiose (Carro et al. 2001). Os autores não levaram em consideração, no entanto, que os rearranjos cromossômicos observados após eventos de meiose podem ser o resultado de crossing over meiótico entre cromossomos homólogos de tamanho diferente, visto que já havia sido identificado que essas linhagens apresentam polimorfismo de tamanho entre cromossomos homólogos (Nadal

et al. 1999).

Diferentes derivados dessa linhagem apresentam variação de tamanho nas bandas correspondentes ao cromossomo 12. Os autores realizaram experimentos para comprovar que essas alterações estão relacionadas com as repetições dos genes que codificam o RNA ribossomal (DNAr) e sugeriram que ampliações, deleções e rearranjos nessas repetições são a fonte mais importante de variação de tamanho do cromossomo 12 (Nadal et al. 1999; Carro et al. 2001). A alta variabilidade de tamanho desse cromossomo, no entanto, é uma característica comum de diversas linhagens selvagens de levedura (Chindamporn et al. 1993; Pasero et al. 1993; Rustchenko et al. 1993), causada por aumento ou diminuição no número de repetições de DNAr, que está presente em até 200 cópias nesse cromossomo (Gangloff et al. 1996; Petes 1979; Rustchenko et al. 1994). Sendo assim, apesar da alta variabilidade de tamanho do cromossomo 12 gerar dúvidas sobre a estabilidade cariotípica de muitas linhagens industriais, os autores concluem após suas análises genéticas que a variação de tamanho nesse cromossomo não pode ser considerada um indicativo de instabilidade genética de uma dada linhagem (Carro et al. 2001).

Com o objetivo de investigar a natureza molecular das alterações detectadas na linhagem analisada no estudo anterior (Carro et al. 2001), os autores isolaram e caracterizaram vários variantes de tamanho do cromossomo 1, que apresentou uma das maiores variabilidades de tamanho entre os derivados da linhagem em questão (Carro et al. 2003). É importante ressaltar, no entanto, que devido ao seu menor tamanho, o cromossomo 1 está localizado em uma região do gel onde a resolução é muito maior. Sendo assim, alterações de tamanho nesse e em outros cromossomos de menor tamanho são detectadas mais facilmente, o que não significa que eles possuem uma maior variabilidade.

Os resultados demonstraram que os variantes de tamanho do cromossomo 1 diferiam apenas em suas regiões sub-teloméricas, sendo que a região central de 150 Kb permaneceu inalterada. Um mapeamento detalhado das extremidades cromossômicas indicou que sequências repetitivas de DNA nessas regiões desempenham um papel crucial na geração dos rearranjos nesse cromossomo (Carro et al. 2003).

Diversos trabalhos já relacionaram a instabilidade cariotípica em linhagens selvagens de levedura com eventos de recombinação entre sequências repetitivas de DNA espalhadas pelo genoma, como os elementos Ty, delta e Y' e os genes subteloméricos presentes em mais de uma cópia em diferentes cromossomos (Codón et al. 1997; Rachidi et al. 1999; Neuvéglise et al. 2000; Puig et al. 2000; Carro et al. 2001; Carro et al. 2003), o que também parece ocorrer em linhagens diplóides de laboratório (Umezu et al. 2002; Mieczkowski et al. 2006; Argueso et al. 2008). Entretanto, algumas linhagens selvagens apresentam uma frequência muito baixa de rearranjos cromossômicos (Gasent-Ramírez et al. 1999), o que indica que as sequências repetitivas de DNA podem ser necessárias mas não são suficientes para conferir instabilidade cariotípica, visto que elas estão presentes em todas as linhagens de *S. cerevisiae* (Carro et al. 2001).

4.1. Variação cariotípica em linhagens de levedura utilizadas em processos de fermentação no Brasil

Até hoje poucos trabalhos investigaram a ocorrência de instabilidade cariotípica nas linhagens selvagens de *S. cerevisiae* que são utilizadas nos processos fermentativos realizados no Brasil. Alguns estudos já caracterizaram os perfis cariotípicos de isolados obtidos de dornas de produção de cachaça e detectaram uma alta variabilidade cromossômica (Pataro et al. 2000; Guerra et al. 2001; Oliveira et al. 2008), mas as origens moleculares dessa variação ainda não foram investigadas.

Em relação às linhagens selvagens utilizadas na produção de etanol combustível, um trabalho realizado com isolados obtidos de uma destilaria na Paraíba também detectou uma alta variabilidade de perfis cariotípicos (Lucena et al. 2007). Além disso, após análises com três desses isolados, os autores observaram a ocorrência de instabilidade cariotípica durante o crescimento vegetativo sob condições de laboratório que simulam o ambiente industrial, sendo que em alguns casos os variantes cariotípicos substituíram completamente a linhagem parental (Lucena et al. 2007). Não foram realizadas análises moleculares para determinar quais os mecanismos responsáveis pela geração desses rearranjos.

Em Basso et al. 2008, foram analisadas diversas linhagens selvagens utilizadas

na produção de etanol combustível e verificou-se que todas possuem perfis cariotípicos únicos e altamente variáveis entre si, que são utilizados como critério de identificação e diferenciação. Além disso, observou-se uma porcentagem de 0-40% de rearranjos cromossômicos em isolados coletados de dornas de fermentação inoculadas inicialmente com as linhagens PE-2, CAT-1 e BG-1, que estão entre as mais utilizadas na produção de etanol no Brasil (Basso et al. 2008).

Em Lopes 2000, foram isolados 691 derivados da linhagem PE-2 a partir de amostras coletadas em 12 destilarias nos estados de São Paulo e Paraná cujas dornas de fermentação foram inoculadas inicialmente com essa linhagem. Desses 691, 273 (39,5%) apresentavam rearranjos cromossômicos em relação à linhagem inicial. Os resultados obtidos demonstraram que nenhum dos variantes cariotípicos foi capaz de substituir a linhagem original e os outros variantes presentes na população das dornas. O único perfil cariótipo que apresentou frequência elevada e persistência ao longo da safra, em diferentes unidades industriais, foi aquele da linhagem original (Lopes 2000).

Após a identificação e caracterização dos variantes cariotípicos, o autor procurou desvendar as origens moleculares das alterações observadas (Lopes 2000). Existem dois mecanismos de recombinação genética que podem ser responsáveis pela geração dos rearranjos cromossômicos: recombinação meiótica e mitótica.

O processo de recombinação meiótica é iniciado por quebras programadas em todos os cromossomos, através das quais a informação genética é trocada entre cromossomos homólogos durante a prófase I da meiose. Esse processo de recombinação afeta simultaneamente todos os cromossomos a uma frequência muito elevada, sendo que na levedura *S. cerevisiae* estima-se que aconteçam cerca de 100 recombinações por meiose (Pâques et al. 1999).

Por outro lado, os eventos de recombinação mitótica ocorrem a uma frequência muito menor. Em *S. cerevisiae*, estimativas indicam que a taxa de recombinação mitótica por divisão celular é cerca de 10^4 a 10^5 vezes menor que a taxa de recombinação meiótica (Pâques et al. 1999; Barbera et al. 2006). Esse tipo de recombinação é acidental e isolada e sua principal função é o reparo de quebras esporádicas nos cromossomos que ocorrem durante o crescimento vegetativo (Barbera et al. 2006).

De acordo com o trabalho de Lopes 2000, os rearranjos cromossômicos que foram observados em derivados da linhagem PE-2 durante o processo industrial de produção de etanol foram gerados por recombinação meiótica. O autor chegou a essa conclusão após esporular essa linhagem em condições de laboratório e observar que ela apresenta uma alta eficiência de esporulação e que os indivíduos gerados por meiose apresentam rearranjos similares aos encontrados nos isolados obtidos das dornas de fermentação.

É necessário ressaltar, no entanto, que a linhagem PE-2 apresenta polimorfismo de tamanho entre cromossomos homólogos (Lopes 2000; Argueso et al. 2009) e que eventos de recombinação meiótica entre cromossomos de tamanho diferente irão sempre resultar em cromossomos recombinantes com tamanho alterado em relação aos parentais. Sendo assim, a detecção de bandas com tamanho alterado no PFGE de indivíduos gerados por meiose não comprova que os rearranjos cromossômicos observados nos isolados obtidos das dornas de fermentação foram gerados por recombinação meiótica.

Sendo assim, apesar da importância do trabalho de Lopes 2000, que foi o primeiro a demonstrar que a linhagem PE-2 apresenta instabilidade cariotípica considerável durante o processo industrial de produção de etanol, as origens moleculares desse fenômeno ainda permaneciam desconhecidas.

5. Objetivos e importância do trabalho

Como já foi discutido previamente, a linhagem industrial PE-2 associa uma excelente capacidade de adaptação ao ambiente altamente hostil das dornas de fermentação com uma elevada eficiência fermentativa e por isso é amplamente utilizada pelas usinas de etanol brasileiras. A caracterização genética e genômica da linhagem JAY270 (Argueso et al. 2009), derivada diretamente da linhagem PE-2, oferece inúmeras oportunidades para o desenvolvimento de uma nova geração de linhagens industriais de levedura. Sendo assim, a partir das informações obtidas sobre essa linhagem, é possível desenvolver estratégias de manipulação genética para criar novas linhagens com uma capacidade ainda maior de produção de etanol. Além disso, devido à sua enorme capacidade de adaptação ao ambiente industrial, essa linhagem pode ser

utilizada como plataforma biológica para a produção de outros produtos de interesse industrial e para a aplicação de novas tecnologias que possam vir a ser desenvolvidas (Argueso et al. 2009; Argueso et al. 2010).

No entanto, como já foi demonstrado previamente (Lopes 2000), essa linhagem apresenta instabilidade cariotípica considerável durante o processo industrial de produção de etanol. Esse fenômeno pode representar uma séria ameaça para a aplicação de estratégias de manipulação genética nessa levedura, visto que devido a essa instabilidade, modificações no genoma dessa linhagem podem ser perdidas durante o processo.

Sendo assim, é extremamente importante estudar o comportamento do genoma dessa linhagem em condições de produção de etanol. Através dessa análise, será possível desvendar as origens moleculares de sua instabilidade cariotípica e o que induz a sua ocorrência. Além disso, também será importante investigar se os rearranjos cromossômicos estão relacionados com alguma alteração fenotípica.

Tendo em vista a importância desse fenômeno, esse projeto de mestrado teve como objetivo a determinação do mecanismo de recombinação genética responsável pela geração dos rearranjos cromossômicos na linhagem JAY270 durante o processo industrial de produção de etanol.

De acordo com o que foi exposto previamente, existem dois mecanismos de recombinação genética que podem ser responsáveis pela geração dos rearranjos cromossômicos: recombinação meiótica e mitótica. Os dois mecanismos podem resultar em perda de heterozigosidade. No entanto, eles possuem características distintas, visto que o processo de recombinação meiótica afeta simultaneamente todos os cromossomos, enquanto o processo de recombinação mitótica ocorre em pontos isolados do genoma.

O genoma altamente heterozigoto de JAY270 (Argueso et al. 2009) fornece inúmeras possibilidades para o desenvolvimento de marcadores moleculares capazes de detectar eventos de recombinação que resultaram em perda de heterozigosidade. Sendo assim, foram desenvolvidos marcadores moleculares capazes de genotipar regiões heterozigotas ao longo do genoma e determinar se elas perderam a heterozigosidade devido a eventos de recombinação. Através desses marcadores foi

avaliada a distribuição dos eventos de recombinação genética no genoma de derivados de JAY270 portadores de variação cariotípica. De acordo com essa distribuição e com as características da recombinação meiótica e mitótica, foi possível determinar o mecanismo de recombinação responsável pela geração de rearranjos cromossômicos durante a produção de etanol.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Linhagens utilizadas

O estoque da linhagem industrial PE-2 utilizado para purificar a linhagem derivada JAY270 é proveniente da coleção do nosso próprio laboratório. Também foi utilizada a linhagem de referência de *S cerevisiae* S288c, que também faz parte do estoque do nosso laboratório.

2. Meios de cultura

- YEPD - 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose, 2% agar (se necessário): Crescimento das leveduras e obtenção de colônias isoladas.
- Xarope de cana-de-açúcar diluído (10°Brix): Utilizado como meio de fermentação na dorna onde foi realizado o processo de fermentação em escala semi-industrial com a linhagem JAY270.

3. Processo de fermentação em escala industrial com a linhagem JAY270

A busca por derivados de JAY270 portadores de rearranjos cromossômicos foi realizada a partir de uma amostra coletada durante um processo de fermentação em escala semi-industrial realizado na destilaria piloto da ESALQ-USP, em Piracicaba-SP, sob supervisão do Prof. Dr. André Ricardo Alcarde.

Antes de ser inoculada na dorna a linhagem JAY270 foi cultivada durante 3 dias em meio YEPD em laboratório até que fossem obtidos 100g de massa úmida, nos quais foi adicionado xarope de cana-de-açúcar diluído (10°Brix) a cada dois dias durante 20 dias até que fossem obtidos 2kg de massa celular úmida. Essa massa celular foi então transferida para a dorna de fermentação, que têm capacidade para 4000L de xarope de cana-de-açúcar, para realização do processo de fermentação.

Durante o processo, que durou cerca de dois meses, ocorreram vários ciclos de fermentação seguidos, com centrifugação e reaproveitamento das células após cada ciclo, que corresponde ao período em que todo o açúcar da dorna é consumido pelas leveduras. A cada semana células de levedura foram coletadas e estocadas em glicerol 20% a -80°C.

As amostras coletadas desse experimento de fermentação também foram utilizadas para a realização de uma análise global de sua expressão gênica. (Osmar Vaz de Carvalho Netto – tese de Doutorado).

4. Pré-seleção dos isolados obtidos da amostra coletada na dorna de fermentação para identificação de derivados de JAY270

A pré-seleção dos isolados obtidos a partir da amostra coletada na dorna de fermentação teve como objetivo a identificação de derivados de JAY270, que foram posteriormente analisados através de PFGE. Para essa pré-seleção foram utilizados 4 marcadores moleculares baseados em PCR desenvolvidos previamente pelo nosso próprio grupo de pesquisa (Carvalho-Netto et al. 2010).

Os PCRs com os 4 marcadores moleculares foram conduzidos através da metodologia de PCR de colônia. Inicialmente foram obtidas colônias isoladas em meio YEPD a partir da amostra coletada na dorna de fermentação. Foram então misturados aproximadamente 1 mm³ de cada colônia com 10 µL de água destilada estéril em tubos de PCR. O conteúdo dos tubos foi aquecido a 94°C durante 6 minutos e logo em seguida resfriado a -80°C por 20 minutos. Essa variação brusca na temperatura tem como objetivo liberar o conteúdo celular e, conseqüentemente, o DNA das amostras. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 3 minutos (Centrífuga MiniSpin Eppendorf) e 4 µL dos sobrenadantes obtidos foram utilizados para as reações de PCR.

Cada reação de PCR continha 4 µL da suspensão contendo o DNA, 1 µL de tampão de PCR 10x (Invitrogen), 0,7 µL de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 2 µL de solução de dNTPs 1,25 mM (Invitrogen), 0,5 µL dos primers forward e reverse a 15 pmol/µL, 0,1 µL de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e 1,2 µL de água Milli-Q estéril.

Os PCRs foram realizados no equipamento Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) com os seguintes parâmetros: 1ª etapa - 94°C por 3 min, 2ª etapa - 35 ciclos a 94°C por 45 s, 55°C por 40 s e 72°C por 45 s, 3ª etapa - 72°C por 7 min.

Os produtos finais de cada reação de PCR foram aplicados em géis de agarose (LGC Biotecnologia) a 2% contendo brometo de etídio. Cada corrida foi realizada em tampão TAE 1x utilizando-se a fonte PowerPac 3000 (BioRad). Posteriormente os géis foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

5. PFGE (Gel de eletroforese em campo pulsado)

Esse tipo de eletroforese foi utilizado para realizar a cariotipagem molecular dos isolados obtidos a partir da amostra coletada na dorna de fermentação com o objetivo de encontrar derivados da linhagem JAY270 que apresentassem rearranjos cromossômicos. A separação dos cromossomos no gel é possível graças a inversões na direção do campo elétrico, que permitem a separação de moléculas de alto peso molecular.

Os PFGE foram realizados utilizando-se metodologias já bem estabelecidas e adotadas em estudos anteriores no nosso próprio grupo de pesquisa (Argueso et al. 2008; Argueso et al. 2009). Para a extração do DNA genômico, as linhagens foram crescidas previamente em meio de cultura YEPD líquido por 48 horas, período após o qual as células já atingiram a fase estacionária e não estão mais em divisão. Foram coletados 50mg de massa seca dessas células, aos quais foram adicionados ao mesmo tempo 20µL da enzima de lise *Novozym* na concentração de 25mg/mL e 450µL de uma solução de agarose *low melting* 0,5% (Invitrogen). Essa mistura foi homogeneizada e utilizada para preencher moldes de plugs de agarose para PFGE. Após a solidificação, os plugs foram retirados dos moldes e incubados por 12 horas a 37°C em uma solução contendo 500mM EDTA e 10mM Tris a um pH 7,5. Posteriormente foram adicionados 400µL de uma solução contendo sarcosil 5% e proteinase K 5mg/mL (LGC Biotecnologia) e as amostras foram incubadas a 50°C por 5 horas. Essas etapas têm como objetivo extrair o DNA genômico com a mínima manipulação mecânica a fim de evitar a fragmentação dos cromossomos. Durante o processo foram eliminados os componentes da parede celular, dos sistemas de membranas, e também as proteínas, sendo preservados ao final apenas os ácidos nucleicos originalmente contidos nas amostras. Após todas essas etapas os plugs de agarose contendo o DNA das amostras foram lavados em uma solução Tris 20mM e EDTA 50mM a um pH 8,0.

Foram então preparados géis de 180mL com agarose do tipo *pulsed field certified* (BioRad) a 1%, nos quais foram posicionados os plugs de agarose contendo o DNA das amostras. As corridas foram realizadas no equipamento da BioRad *CHEF (Contour-clamped Homogeneous Electric Field) DR III* durante 66 horas em uma solução de TBE 0,5% a 14°C. Os parâmetros utilizados foram: *initial switch*: 47s; *final*

switch: 2min e 50s; gradiente: 5V/cm. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado e fotografado sob luz ultravioleta.

6. Genotipagem dos isolados FDY1-FDY11 com os marcadores moleculares M1-M9

Durante o projeto foram desenvolvidos 9 marcadores moleculares (M1-M9) para genotipar regiões heterozigotas ao longo do genoma dos derivados de JAY270 portadores de rearranjos cromossômicos e verificar se essas regiões continuavam heterozigotas ou se perderam a heterozigosidade devido a eventos de recombinação genética. Os dois alelos de cada região heterozigota selecionada possuem sítios de restrição diferenciais entre si, o que permite que eles sejam identificados através da digestão com uma enzima de restrição.

Cada marcador molecular possui um par de primers correspondente, utilizado para amplificar uma região heterozigota e uma enzima de restrição correspondente, específica para os sítios de restrição de cada região. As análises foram realizadas a partir do DNA genômico dos derivados de JAY270 selecionados.

6.1. Extração de DNA genômico

Para a extração do DNA genômico, as linhagens foram crescidas overnight em 5 mL de meio de cultura YEPD líquido. Foram então transferidos ~1,5 mL de cada cultura para tubos eppendorf de 1,5 mL, que foram centrifugados a 14.000 rpm por 2 minutos (Centrífuga 5804 R Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e o pellet celular obtido foi ressuspendido em 200 µL de tampão de quebra (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0). Foram então adicionados 200 µL de glass beads e 200 µL de uma solução de fenol equilibrado / clorofórmio / álcool isoamílico em uma proporção de 25:24:1. Os tubos foram vortexados a velocidade máxima por 2 minutos e em seguida centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi então transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 20 µL de acetato de sódio 3M (pH 5,3) e 400 µL de etanol 100% gelado. Os tubos foram deixados a -20°C por 1 hora e em seguida foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O pellet de DNA obtido foi então lavado com etanol 70% e, após a evaporação completa do etanol, foi ressuspendido em 40 µL de água Milli-Q estéril.

Para a realização das reações de PCR, a solução contendo o DNA extraído foi diluída em uma proporção de 1:10.

6.2. PCR com os primers correspondentes aos marcadores moleculares M1-M9

Para a realização dos PCRs com os pares de primers correspondentes aos 9 marcadores moleculares desenvolvidos durante o projeto (M1-M9) foi utilizado o DNA genômico extraído na etapa anterior.

Cada reação de PCR continha 1 µL da solução contendo o DNA, 1 µL de tampão de PCR 10x (Invitrogen), 0,7 µL de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 2 µL de solução de dNTPs 1,25 mM (Invitrogen), 0,5 µL dos primers forward e reverse a 5 pmol/µL (Tabela 2), 0,1 µL de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e 4,2 µL de água Milli-Q estéril.

Os PCRs foram realizados no equipamento Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) com os seguintes parâmetros: 1ª etapa - 94°C por 7 min, 2ª etapa - 30 ciclos a 94°C por 50 s, 50 s na temperatura de anelamento de cada primer (Tabela 2) e 72°C por 2 min e 30 s, 3ª etapa - 72°C por 7 min.

Os produtos finais de cada reação de PCR foram aplicados em géis de agarose (LGC Biotecnologia) a 1% contendo brometo de etídio. Cada corrida foi realizada em tampão TAE 1x utilizando-se a fonte PowerPac 3000 (BioRad). Posteriormente os géis foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

6.3. Reações de digestão com as enzimas de restrição correspondentes aos marcadores moleculares M1-M9

Os fragmentos amplificados através das reações de PCR realizadas na etapa anterior foram digeridos com as enzimas de restrição correspondentes aos 9 marcadores moleculares desenvolvidos durante o projeto (M1-M9).

Cada reação de digestão continha: 3 µL do produto de cada reação de PCR, 1 µL do tampão de digestão 10x apropriado para cada enzima de restrição, 0,3 µL da enzima de restrição correspondente a cada marcador molecular (Tabela 1) e 5,7 µL de água Milli-Q estéril. Todas as reações foram incubadas overnight a 37°C (temperatura de atividade ótima de todas as enzimas utilizadas).

Os produtos finais de cada reação de digestão foram aplicados em géis de

agarose (LGC Biotecnologia) a 1% contendo brometo de etídio. Cada corrida foi realizada em tampão TAE 1x utilizando-se a fonte PowerPac 3000 (BioRad). Posteriormente os géis foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

7. CGH-array - Hibridização genômica comparativa em micro-arranjos

Essa metodologia permite a caracterização da dosagem gênica simultaneamente em todas as regiões do genoma e tem sido utilizada com sucesso para o estudo de rearranjos cromossômicos (Lemoine et al. 2005; Gresham et al. 2008; Argueso et al. 2008). Nesse projeto ela foi utilizada para comparar a dosagem gênica dos derivados FDY1-FDY11 com a dosagem gênica da linhagem inicial JAY270 para identificação de CNVs (Copy Number Variations).

7.1. Preparação do DNA

O DNA genômico utilizado para o CGH-array foi purificado de plugs de agarose previamente preparados para PFGE utilizando-se uma adaptação do protocolo do QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Em resumo, 4 plugs de agarose de ~70 µL por amostra foram dissolvidos em 840 µL de QIAGEN QG buffer. O DNA nessa solução foi fragmentado através de sonicação a 1-2 Kb de tamanho e 280 µL de isopropanol foram adicionados. A mistura foi ligada a colunas QIAquick, lavadas com QIAGEN PE buffer e eluídas em 32 µL de QIAGEN EB buffer. Com esse procedimento foram obtidos de 2-3 µg de DNA fragmentado, que foram posteriormente marcados e hibridizados em micro-arranjos.

7.2. Marcação do DNA e hibridização em micro-arranjos

O princípio do procedimento é a marcação do DNA genômico de duas linhagens com fluoróforos de cores distintas. O DNA dos isolados FDY1-FDY11 foi marcado com Cy5-labeled dNTPs (vermelho), enquanto o DNA da linhagem JAY270 foi marcado com Cy3-labeled dNTPs (verde), ambos da Amersham Biosciences. Para a incorporação desses nucleotídeos marcados no DNA genômico foi utilizado o BioPrime Array CGH Genomic Labeling Module (Invitrogen), um kit que utiliza random primers e uma forma mutante do fragmento Klenow da DNA polimerase I (Exo- Klenow) para marcar diferencialmente amostras de DNA genômico.

Após a marcação com fluoróforos distintos as amostras foram misturadas e hibridizadas competitivamente em uma lâmina na qual foram previamente spotadas milhares de sondas com seqüências que cobrem todo o genoma da linhagem padrão S288c (regiões gênicas e intergênicas). Após a hibridização, as lâminas foram lavadas e a intensidade de fluorescência em cada spot foi captada no scanner *GenePix4000B* (Molecular Devices). A intensidade relativa de cada cor em cada sonda (spot) está correlacionada à abundância gênica em cada região representada no micro-arranjo. Em sítios onde as intensidades de vermelho e verde são equivalentes não há alteração de dosagem gênica; em sítios onde a intensidade de vermelho é maior existem amplificações gênicas em FDY1-FDY11; e em sítios onde a intensidade de vermelho é menor existem deleções.

7.3. Análise computacional dos resultados obtidos

As imagens das lâminas de hibridação obtidas através dos *CGH-arrays* foram processadas em uma seqüência de etapas. Em primeiro lugar as imagens foram sobrepostas a um *grid* que associa cada sonda do micro-arranjo à região correspondente do genoma e os valores de intensidade de cores foram extraídos utilizando o software *GenePix Pro* (Molecular Devices). Esses dados foram então depositados em uma base de dados de micro-arranjos (*University of North Carolina Microarray Database*) onde os valores foram transformados e normalizados. A etapa final foi a importação dos dados da base de dados para o software *CGH-Miner* (Wang et al. 2005), que fez a correlação entre posição no mapa físico e a dosagem gênica.

RESULTADOS

1. Obtenção de colônias isoladas

A busca por indivíduos portadores de rearranjos cromossômicos em relação à linhagem inicial foi realizada a partir de uma amostra coletada durante um processo de fermentação em uma dorna de 4.000 L inoculada inicialmente com a linhagem JAY270. Durante esse processo ocorreram vários ciclos fermentativos seguidos, com centrifugação e reaproveitamento das células a cada ciclo. A amostra utilizada foi coletada após 50 dias de fermentação.

Inicialmente foram obtidas colônias isoladas a partir da amostra coletada com o objetivo de separar os microorganismos presentes na amostra. Com essa separação foi possível obter colônias derivadas de uma única célula mãe e também analisar a composição microbiológica da dorna.

Para que as colônias obtidas constituíssem uma boa representação do pool de células da amostra foram oferecidas as mesmas condições de crescimento aos indivíduos. Para isso a amostra foi diluída antes de ser plaqueada para que fosse obtido um número pequeno de colônias no meio de cultura da placa de Petri, sem que houvesse sobreposição entre as colônias e com um espaço entre elas que permitisse facilmente seu isolamento. Para determinar o fator de diluição adequado para que houvesse aproximadamente 30 colônias em cada placa, a concentração aproximada de células na amostra foi determinada através de contagem na câmara de Neubauer. A amostra diluída foi então plaqueada em meio de cultura YEPD e as colônias de levedura obtidas foram separadas para identificação de isolados com rearranjos cromossômicos.

As placas obtidas também foram utilizadas para identificar os diferentes indivíduos pertencentes à comunidade microbiológica da dorna. Foi possível observar que além das leveduras a amostra era composta por bactérias contaminantes. As leveduras e bactérias presentes nas placas foram então contadas para determinação de sua concentração. A concentração de leveduras na amostra foi de aproximadamente $1,1 \times 10^8$ células/mL, enquanto a de bactérias foi de aproximadamente 6×10^8 células/mL. Essa concentração é uma aproximação, visto que é possível que algumas células não se separem após o plaqueamento, dando origem a uma colônia que não é

derivada de uma única célula e que podem existir microrganismos na amostra que não sejam capazes de crescer em meio YEPD.

Apesar da concentração de bactérias ser aproximadamente 6 vezes maior que a de leveduras, seu volume médio é aproximadamente 175 vezes menor que o volume médio de uma levedura (Kubitschek 1990; Yang et al. 2010). Sendo assim, apesar da concentração menor, a biomassa de leveduras presente na dorna é aproximadamente 30 vezes maior que a biomassa de bactérias.

2. Identificação e seleção de isolados com rearranjos cromossômicos

2.1. Cariotipagem molecular dos isolados através de PFGE

As 30 colônias isoladas obtidas após o primeiro plaqueamento da amostra coletada da dorna de fermentação foram submetidas a Gel de Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE) para análise de seu cariótipo molecular (Figura 1). O padrão de bandas de cada uma – que representam os 16 cromossomos da espécie *S. cerevisiae* – foi comparado ao padrão de bandas da linhagem inicial JAY270. Após essa comparação foi constatado que a amostra coletada continha indivíduos com 3 tipos de padrões de bandas: 1) indivíduos com o padrão de bandas idêntico ao da linhagem JAY270; 2) indivíduos com o padrão de bandas semelhante ao da linhagem JAY270, mas com algumas bandas de tamanho diferente, que representam rearranjos cromossômicos em relação à linhagem inicial; 3) indivíduos com o padrão de bandas totalmente diferente da linhagem JAY270, que provavelmente pertencem a outras linhagens da mesma espécie ou de espécies diferentes de levedura que contaminaram a dorna durante o processo de fermentação.

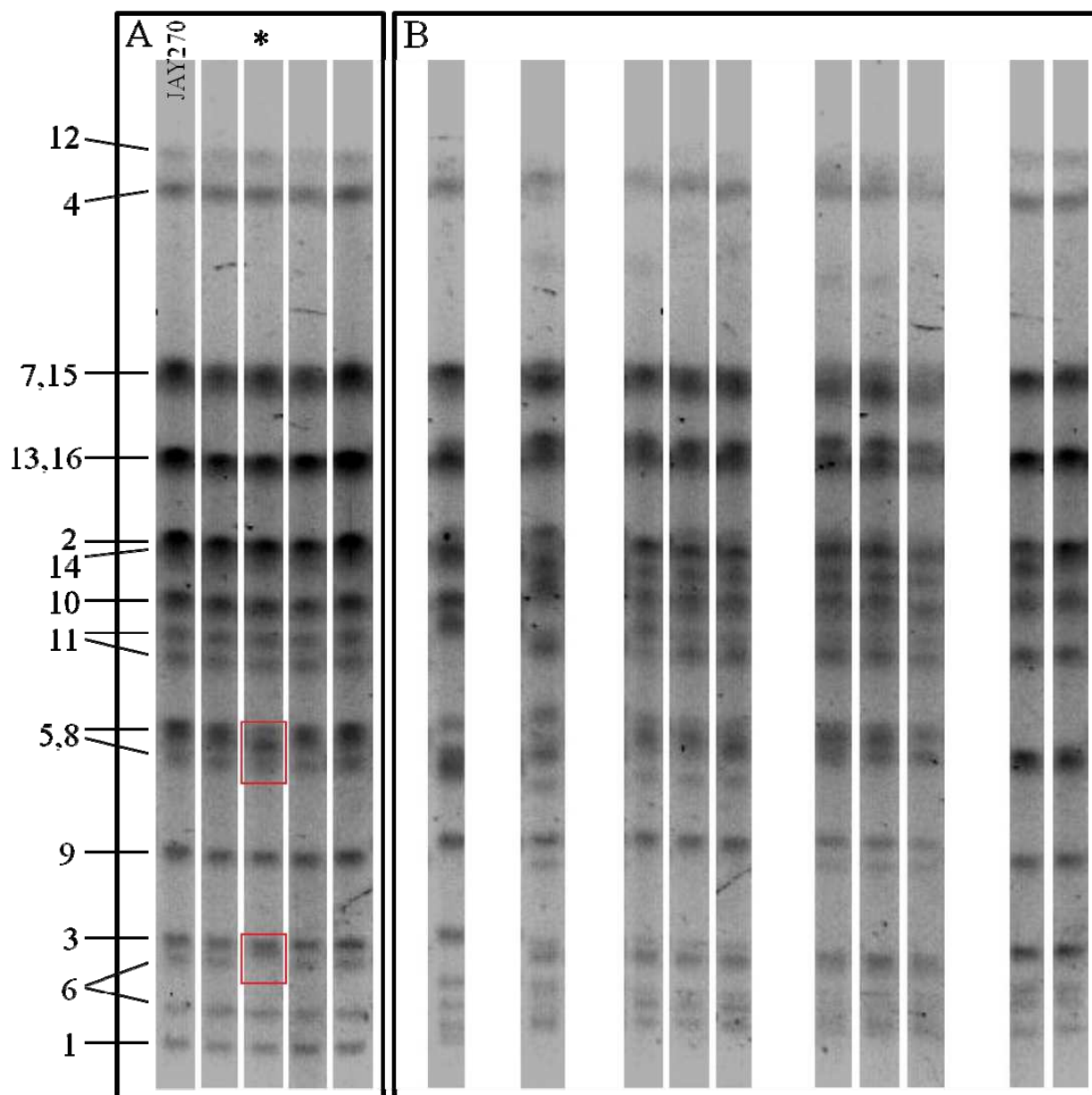


Figura 1: Resultado de um dos PFGE realizados com as colônias isoladas a partir da amostra coletada da dorna de fermentação. Para facilitar a visualização, a imagem foi cortada e editada e as colônias foram divididas em dois grupos. No painel **A** encontram-se a linhagem JAY270 e derivados da mesma, sendo que 3 desses derivados apresentam padrão de bandas idêntico ao de JAY270. Um dos derivados (*) apresenta bandas com tamanho diferente em duas regiões distintas (marcadas em vermelho), que correspondem a rearranjos cromossômicos em relação à linhagem inicial. No painel **B** encontram-se linhagens com padrão de bandas totalmente diferente de JAY270, que são provavelmente contaminantes do processo fermentativo. Os números à esquerda correspondem aos cromossomos de JAY270.

Através da análise do PFGE foi constatado que 15 das 30 colônias analisadas inicialmente não pertenciam à linhagem JAY270 e correspondiam, portanto, a linhagens contaminantes do processo fermentativo. Esse alto índice de contaminação iria prejudicar a busca por indivíduos com rearranjos cromossômicos, pois seria necessário realizar um alto número de PFGE, que é um processo trabalhoso, que consome muito tempo e de custo elevado. Sendo assim, para facilitar essa busca foi necessário realizar uma pré-seleção das colônias isoladas para que fosse realizado PFGE apenas de derivados da linhagem JAY270.

2.2. Pré-seleção das colônias isoladas

A pré-seleção dos isolados foi realizada através de uma ferramenta molecular desenvolvida pelo nosso próprio grupo de pesquisa. Com o objetivo de identificar e diferenciar linhagens industriais de *S. cerevisiae* utilizadas na produção de etanol, nosso grupo desenvolveu marcadores moleculares baseados em PCR. Esses marcadores correspondem a um conjunto de 11 pares de primers que amplificam regiões intragênicas hiper-variáveis de *S. cerevisiae*, o que permite que as linhagens sejam diferenciadas entre si de acordo com o padrão de bandas resultante da amplificação em um gel de eletroforese (Carvalho-Netto et al. 2010). Sendo assim, decidiu-se utilizar esses marcadores para identificar entre as colônias isoladas aquelas que eram derivadas da linhagem JAY270 para evitar a realização de PFGE de linhagens contaminantes.

Dos pares de primers disponíveis, foram utilizados apenas os 4 que apresentaram o maior poder discriminatório nas análises realizadas previamente com 21 linhagens industriais, que foram totalmente diferenciadas com esse conjunto de 4 primers (Carvalho-Netto et al. 2010).

Foram obtidas mais colônias isoladas a partir da amostra coletada da dorna de fermentação. Esses isolados foram então submetidos a PCR de colônia com os 4 pares de primers escolhidos e os padrões de bandas resultantes da amplificação com cada par foram analisados em géis de eletroforese (Figura 2).

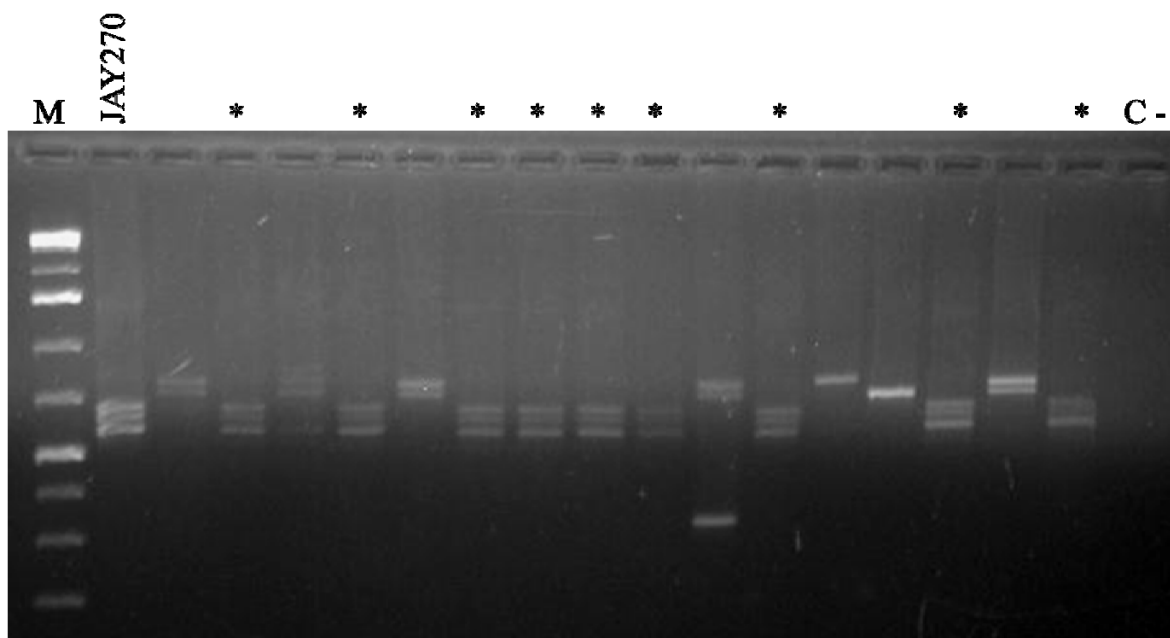


Figura 2: Resultado de um dos géis de eletroforese realizados para analisar o padrão de bandas resultante da amplificação por PCR – com um dos 4 pares de primers escolhidos – das colônias isoladas obtidas a partir da amostra coletada da dorna de fermentação. O padrão de bandas foi comparado com o padrão da linhagem JAY270 e os isolados que apresentaram o mesmo padrão (*) com esse e com os outros 3 pares de primers foram selecionados para posterior análise de seu cariótipo molecular por PFGE. **M:** Marcador de peso molecular; **C-:** Controle negativo.

O padrão de bandas dos isolados para cada par de primers foi comparado com o padrão da linhagem JAY270. Os isolados que apresentaram o mesmo padrão que JAY270 para todos os 4 pares de primers utilizados foram considerados pertencentes a essa linhagem, totalizando uma concentração de 34% de derivados de JAY270 na dorna. Os isolados derivados de JAY270 foram separados para realização de PFGE para análise do cariótipo molecular.

2.3. Cariotipagem molecular por PFGE dos isolados pré-selecionados

Os isolados pré-selecionados através dos 4 marcadores moleculares foram submetidos a PGFE para identificação de derivados da linhagem JAY270 que possuísem rearranjos cromossômicos. A análise dos géis de PFGE revelou a presença de derivados com o padrão de bandas idêntico ao da linhagem JAY270 e

derivados que apresentavam alterações em determinadas bandas em relação a JAY270, que correspondem a rearranjos cromossômicos (Figura 3). Não foram identificados isolados com padrão de bandas correspondente ao de linhagens contaminantes, o que demonstrou que a pré-seleção pelos 4 marcadores moleculares foi eficiente.

No total foram analisados 78 derivados de JAY270 através de PFGE, dos quais 28 (~36%) apresentaram algum tipo de rearranjo cromossômico. Este resultado obtido foi semelhante ao encontrado por Lopes 2000. Naquele trabalho foram analisados 691 derivados da linhagem PE-2 isolados de amostras coletadas durante 3 anos em dornas de fermentação inoculadas inicialmente com essa linhagem em usinas produtoras de etanol no Brasil. Desses isolados, 273 (39,5%) apresentaram algum tipo de rearranjo cromossômico, porcentagem semelhante à obtida em nosso trabalho.

Os rearranjos encontrados com mais frequência nos 28 isolados envolviam os cromossomos 6 curto e 6 longo, 9 e 5 e/ou 8. No trabalho de Lopes 2000, também foram encontrados rearranjos com maior frequência nos cromossomos 6 curto e 6 longo e 5 e/ou 8, além de nos cromossomos 11 curto e 11 longo.

Todos os rearranjos cromossômicos encontrados eram localizados isoladamente, em apenas um ou dois cromossomos de cada um dos 28 isolados. Essa característica sugere que o mecanismo responsável pela geração desses rearranjos seja a recombinação genética durante a mitose. Esse tipo de recombinação resulta em alterações locais no genoma, enquanto que a recombinação meiótica envolve todo o genoma e resulta em rearranjos em todos os cromossomos. A determinação do mecanismo de recombinação responsável pela geração desses rearranjos foi o objetivo principal desse projeto de Mestrado e por isso foi analisada detalhadamente através de ferramentas moleculares. Para essas análises foram selecionados 11 dos 28 isolados portadores de variação cariotípica, denominados FDY1 a FDY11 (Figura 4). Procurou-se escolher isolados com diferentes rearranjos que abrangessem todos os tipos encontrados nos 28 iniciais.

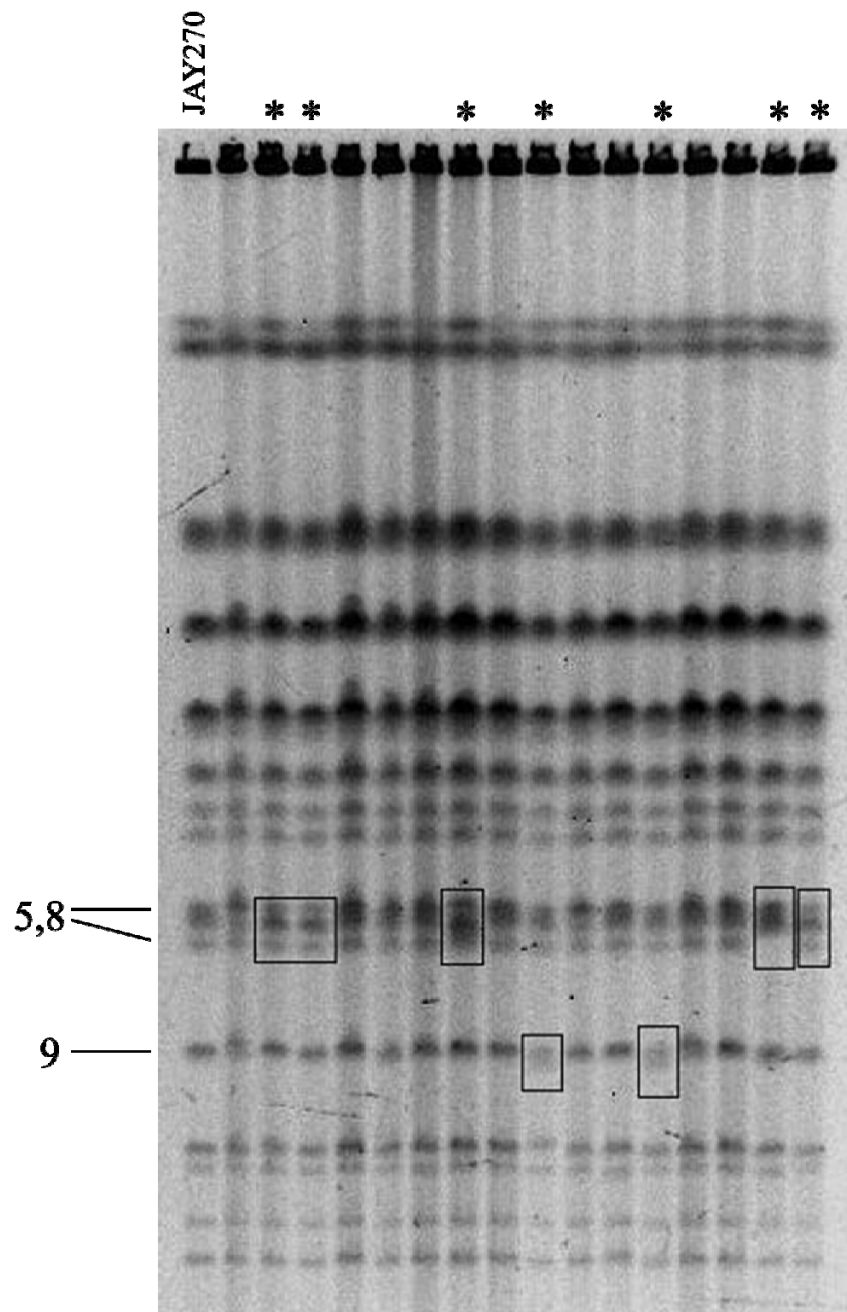


Figura 3: Resultado de um dos PFGE realizados com os isolados obtidos a partir da amostra coletada da dorna de fermentação após pré-seleção com os 4 marcadores moleculares. Nesse gel foi analisado o padrão de bandas de 16 derivados da linhagem JAY270 através da comparação com o padrão de bandas da mesma. Dos 16, 9 derivados apresentam padrão de bandas idêntico ao de JAY270. Os outros 7 (*) apresentam bandas com tamanho diferente em relação a JAY270 (marcadas em preto), que correspondem a rearranjos cromossômicos. Os números à esquerda correspondem aos cromossomos de JAY270.

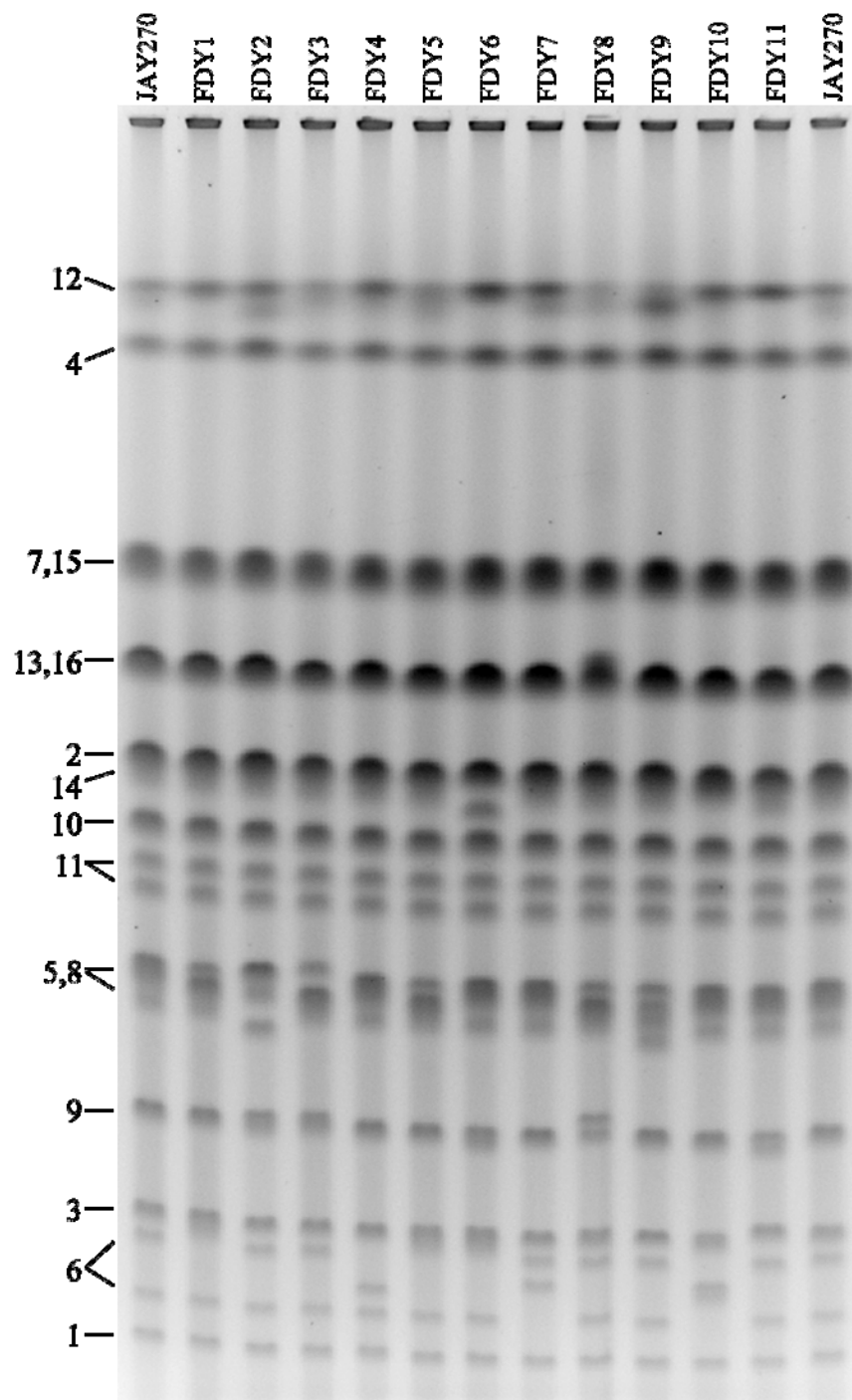


Figura 4: PFGE realizado com os 11 isolados selecionados entre os 28 portadores de variação cariotípica em relação à linhagem inicial JAY270. Ao se comparar o padrão de bandas dessas linhagens com o padrão de JAY270 é possível observar bandas com tamanho alterado, que correspondem a rearranjos cromossômicos. Os números à esquerda correspondem aos cromossomos de JAY270.

3. Desenvolvimento de marcadores moleculares para genotipagem de regiões heterozigotas do genoma de FDY1-FDY11

Após a identificação e seleção de derivados de JAY270 portadores de variação cariotípica (FDY1 a FDY11), os mesmos foram analisados através de marcadores moleculares co-dominantes para genotipagem de regiões heterozigotas ao longo do genoma. Essa análise teve como objetivo verificar se essas regiões continuavam heterozigotas ou se perderam a heterozigosidade devido a eventos de recombinação genética.

3.1. Desenvolvimento dos marcadores moleculares

3.1.1. Busca por regiões em heterozigose no genoma de JAY270

Os marcadores moleculares foram desenvolvidos para regiões heterozigotas ao longo do genoma de JAY270, linhagem diplóide inicial que originou os derivados FDY1-FDY11. Sendo assim, foi necessário inicialmente detectar essas regiões no genoma de JAY270, que possui uma densidade estimada de ~2,6 SNP/Kb entre regiões alélicas em cromossomos homólogos (Argueso et al. 2009). Como o genoma dessa linhagem ainda não estava disponível, foram utilizadas as seqüências genômicas das linhagens haplóides JAY291 e JAY292 (Argueso et al. 2009), derivadas de uma mesma tétrade de JAY270. Como JAY291 e JAY292 são linhagens haplóides irmãs, cerca de metade de seus genomas é idêntica por origem, enquanto a outra metade possui polimorfismos entre as duas linhagens, que correspondem a regiões heterozigotas do genoma de JAY270. Sendo assim, a densidade de SNPs entre essas duas linhagens é ~1.3 SNP/Kb, metade da densidade de SNPs entre as regiões alélicas do diplóide JAY270 (Argueso et al. 2009).

Na época em que os marcadores foram desenvolvidos a linhagem JAY291 já havia sido seqüenciada com uma alta cobertura (162x), que permitiu a montagem de todas as regiões de cópia única do seu genoma. Já a linhagem JAY292 só havia sido seqüenciada com uma cobertura mais baixa (15x). Como consequência, suas seqüências genômicas ainda estavam distribuídas em um número elevado de contigs de tamanho pequeno.

Devido a esse alto número de contigs disponível para JAY292, decidiu-se

começar a busca por regiões polimórficas entre JAY291 e JAY292 a partir dos 338 contigs de JAY292 com mais de 1 Kb de tamanho, que foram comparados com as sequências genômicas de JAY291 utilizando-se a ferramenta blastn (Altschul et al. 1997). Dos 338, 107 continham 1 ou mais SNPs (Single-nucleotide polymorphisms) em relação a JAY291.

Os 107 contigs com SNPs foram então comparados através da ferramenta blastn com o genoma da linhagem de referência S228c (SGD; <http://www.yeastgenome.org>), que é completamente conhecido. Após essa comparação foi possível determinar a localização cromossômica dos 107 contigs e eliminar aqueles que possuíam sequências presentes em mais de uma cópia no genoma, o que prejudicaria a construção dos marcadores. Ao final foram obtidos 62 contigs, que foram utilizados para o desenvolvimento dos marcadores.

3.1.2. Busca por SNPs que determinam sítios de restrição diferenciais

O funcionamento dos marcadores moleculares se baseia no princípio de que os SNPs entre JAY291 e JAY292 podem determinar sítios de restrição específicos de cada uma das linhagens. Consequentemente, dois alelos de uma região polimórfica entre JAY291 e JAY292 podem ser amplificados por PCR e diferenciados através da digestão por uma enzima de restrição capaz de cortar uma região específica de um dos alelos, determinada por um SNP entre as duas linhagens (Figura 5). Já a linhagem diplóide JAY270 será heterozigota para essa região, apresentando as duas versões de alelos após a amplificação e digestão. Baseando-se nesse princípio foi possível desenvolver marcadores moleculares capazes de detectar se as linhagens derivadas de JAY270 continuam heterozigotas em determinadas regiões ou se ficaram homozigotas devido à recombinação genética.

Assim, após a obtenção dos 62 contigs de JAY292 que contêm SNPs em relação a JAY291, foi necessário identificar entre esses SNPs aqueles que determinam sítios de restrição diferenciais entre as duas linhagens. Para isso os 62 contigs foram carregados juntamente com a região correspondente a cada um deles no genoma de JAY291 no programa SNP Detect (Einat Covo, comunicação pessoal), que identificou todos os sítios de clivagem diferenciais e as enzimas de restrição correspondentes

(Figura 6). No entanto, para facilitar a análise, foram separados apenas os SNPs associados a enzimas de restrição de uso comum em laboratórios de biologia molecular.

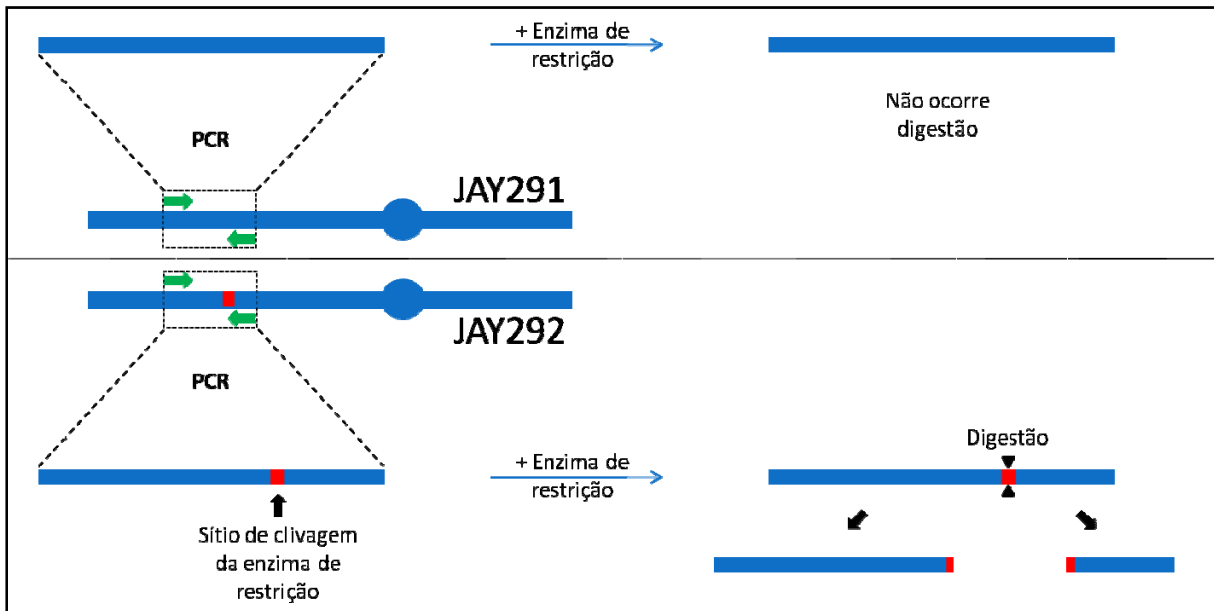


Figura 5: Representação gráfica esquemática do funcionamento dos marcadores moleculares. A linhagem JAY292 possui um sítio de clivagem diferencial em relação a JAY291 (marcado em vermelho). Após a amplificação por PCR da região que contém esse sítio seguida de digestão pela enzima de restrição correspondente, apenas o fragmento proveniente de JAY292 será clivado.

```

CLUSTAL W(1.81) multiple sequence alignment

jay292/211-231      AAACGCCAACTAGTGATGTAT
Jay291/211-231      AAACGCCAACCAGTGATGTAT
                    *****

1
>mismatch in pos 221 alignment range 211 231
##### SpeI      cut #frag seq1 2      cut #frag seq2 1      A^CTAGT

```

Figura 6: Exemplo de um resultado fornecido pelo programa SNP Detect. O programa realizou o alinhamento das sequências genômicas de JAY291 e JAY292 para identificar SNPs entre as duas linhagens que determinam sítios de restrição específicos de uma delas. Nesse exemplo, uma timina em JAY292 determina um sítio de restrição (barra preta) da enzima SpeI que não ocorre em JAY291.

3.1.3. Construção de primers para amplificação por PCR de regiões que contêm sítios de restrição diferenciais

A partir dos sítios de restrição diferenciais separados previamente, foram identificados aqueles que estivessem em regiões que após serem amplificadas e digeridas pela enzima de restrição gerassem fragmentos passíveis de serem diferenciados em um gel de eletroforese. Para isso foi analisada uma região de aproximadamente 2 Kb ao redor de cada sítio de restrição diferencial para verificar se a enzima correspondente clivava essa região em mais locais. Foram utilizadas para desenvolvimento dos marcadores apenas as regiões que continham no máximo 1 sítio de restrição além do sítio diferencial. Além disso, foram eliminadas as regiões que ao serem clivadas gerassem fragmentos de tamanho muito próximo, o que impossibilitaria sua distinção em um gel de eletroforese. Após a separação das regiões com características adequadas foram construídos primers para amplificar por PCR cerca de 1 Kb ao redor de cada uma delas.

Ao final foram desenvolvidos 9 marcadores moleculares (M1 a M9), capazes de genotipar 9 regiões heterozigotas ao longo do genoma de JAY270 (Tabela 1 e Figura 7). Cada marcador é composto por um par de primers (Tabela 2) e por uma enzima de restrição específica para digerir os fragmentos amplificados pelo PCR.

Tabela 1: Marcadores moleculares desenvolvidos para genotipar regiões heterozigotas do genoma de JAY270 e dos isolados FDY1 a FDY11.

Marcador	Localização		Enzimas de restrição
	Cromossomo	Coordenadas (pb)	
M1	III	18.717 - 19.802	<i>SpeI</i>
M2	VI	84.574 - 86.239	<i>EcoRI</i>
M3	VII	342.970 - 344.444	<i>HindIII</i>
M4	XI	16.680 - 17.794	<i>RsaI</i>
M5	XI	496.858 - 498.301	<i>RsaI</i>
M6	XIII	400.481 - 401.331	<i>KpnI</i>
M7	XIII	528.030 - 529.551	<i>HaeIII</i>
M8	XIV	758.946 - 760.388	<i>Sau3AI</i>
M9	XV	133.804 - 135.143	<i>HaeIII</i>

* Em relação ao genoma da linhagem de referência S288c

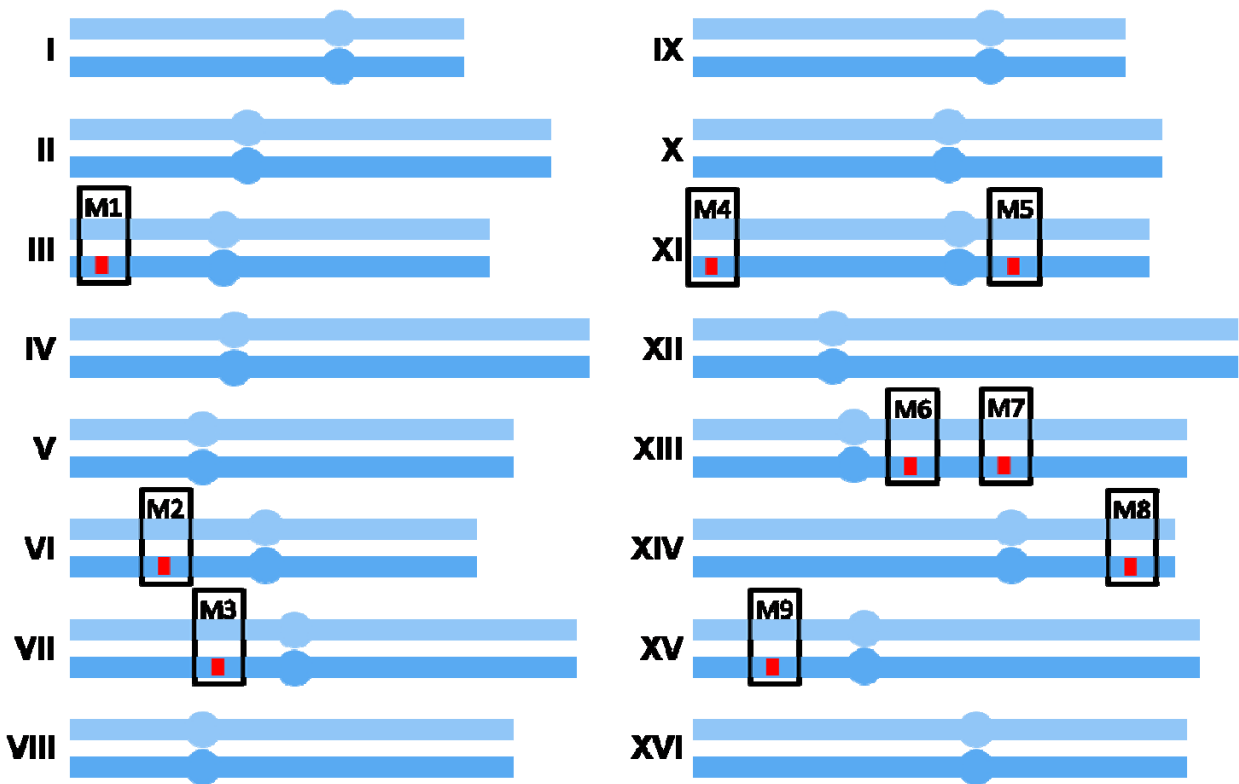


Figura 7: Representação esquemática da localização dos 9 marcadores moleculares (M1 a M9) no genoma da linhagem JAY270. As barras azuis representam os 16 pares de cromossomos da espécie *S. cerevisiae* e os círculos representam os centrômeros, cujas posições são aproximações das posições reais. O tamanho dos cromossomos não está em escala.

Tabela 2: Características dos primers que foram desenvolvidos para amplificar a região correspondente a cada marcador molecular (M1 a M9).

Marcador	Primers		Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho da região amplificada (pb)
	Nome	Sequência		
M1	FDO15	5' TATGGCTTGGCCTAGACTCG 3'	63	1083
	FDO16	5' CTGCCGCAGAAAATAAGGA 3'		
M2	FDO17	5' CAAACGCCATCTGGTATGGT 3'	65	1666
	FDO18	5' AATGGGTTCCACCAGCTTCAC 3'		
M3	FDO19	5' GTTCTGGTTCCGGCTGATTA 3'	59	1475
	FDO20	5' CATCCGATCTTCCTGCTGAT 3'		
M4	FDO3	5' ATGTGGCTGCTGCGAATATC 3'	55	1114
	FDO4	5' GTCCTTTTCAGGATCTGCAC 3'		
M5	FDO1	5' GCACTAGGCACCAGTGTGA 3'	59	1445
	FDO2	5' CACGCTTATCAGGCAATTCA 3'		
M6	FDO13	5' GATCTAGCCGATGAGCTTGC 3'	65	851
	FDO14	5' ATGATCCGGTGTCTTGAAT 3'		
M7	FDO23	5' TGAACGTGACAGCAAAGACC 3'	59	1522
	FDO24	5' AAGATCCGCTTGCAACACTT 3'		
M8	FDO5	5' GTGCCTGTTGCTTCTTCTCC 3'	55	1442
	FDO6	5' TGTGCAACATAAGGCTCACC 3'		
M9	FDO7	5' GGATAACAAATGCCGAGA 3'	65	1340
	FDO8	5' CCAGCAGAATACGAACACGA 3'		

3.2. Teste dos marcadores moleculares em linhagens com constituição genética conhecida

Após o desenvolvimento dos 9 marcadores moleculares foi necessário testá-los em linhagens com constituição genética conhecida. Para isso foram utilizadas a linhagem diplóide JAY270, as duas linhagens haplóides cujas sequências genômicas foram utilizadas para o desenvolvimento dos marcadores (JAY291 e JAY292) e as outras duas linhagens haplóides que completam a tétrade (JAY289 e JAY290). Por serem o resultado de uma esporulação de JAY270, essas 4 linhagens haplóides constituem os 4 produtos de uma meiose dessa linhagem. Sendo assim, os dois alelos de qualquer região heterozigota do genoma de JAY270 irão sempre se segregar de 2:2 nos 4 haplóides (Griffiths et al. 2008).

Tendo em vista que os marcadores foram desenvolvidos para genotipar regiões heterozigotas de JAY270, ao serem utilizados nessa linhagem cada marcador deve ser

capaz de detectar os dois tipos de alelos. Já para os 4 haplóides, dois devem apresentar o padrão correspondente a um dos alelos, enquanto os outros dois devem apresentar o padrão correspondente ao outro alelo.

Para realização dos testes inicialmente foi extraído o DNA genômico das 5 linhagens. Posteriormente foram realizados PCRs com os primers desenvolvidos (Tabela 2) seguidos de digestão pelas enzimas de restrição correspondentes a cada marcador (Tabela 1). Os resultados de todas as reações de digestão foram analisados através de géis de eletroforese (Figuras 8, 9 e 10). Após a análise dos géis concluiu-se que todos os 9 marcadores moleculares funcionavam corretamente, visto que para todos eles foi possível observar dois padrões de digestão para a linhagem JAY270 e uma segregação de 2:2 desses 2 padrões nas linhagens JAY289 a JAY292.

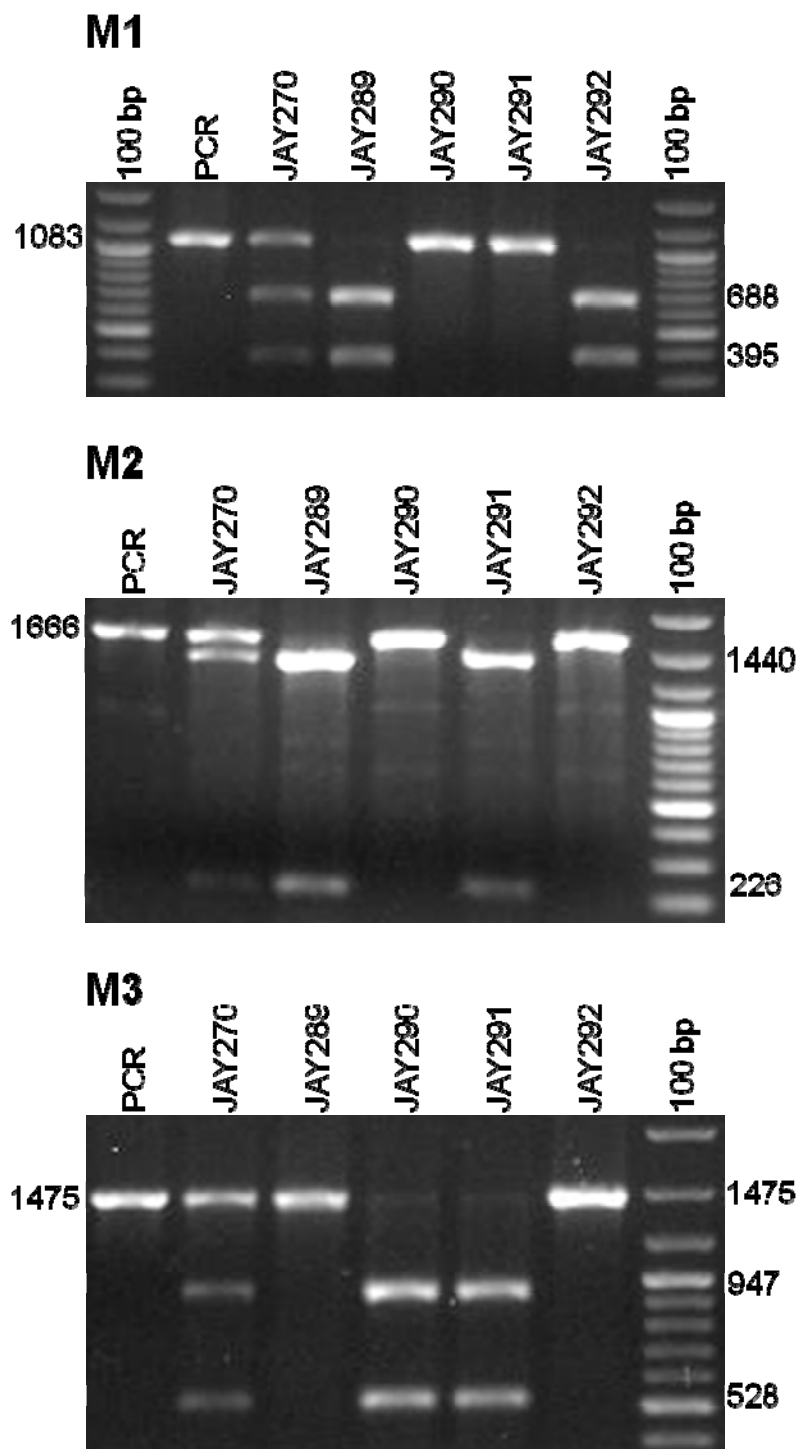


Figura 8: Teste dos marcadores moleculares M1, M2 e M3 nas linhagens JAY270, JAY289, JAY290, JAY291 e JAY292. **100 bp:** Marcador de peso molecular; **PCR:** Resultado da amplificação por PCR com os primers correspondentes a cada marcador molecular (tamanho igual para todas as 5 linhagens). **JAY270 e JAY289-JAY292:** Padrão de bandas resultante da digestão dos fragmentos amplificados por PCR com as enzimas de restrição correspondentes a cada marcador molecular.

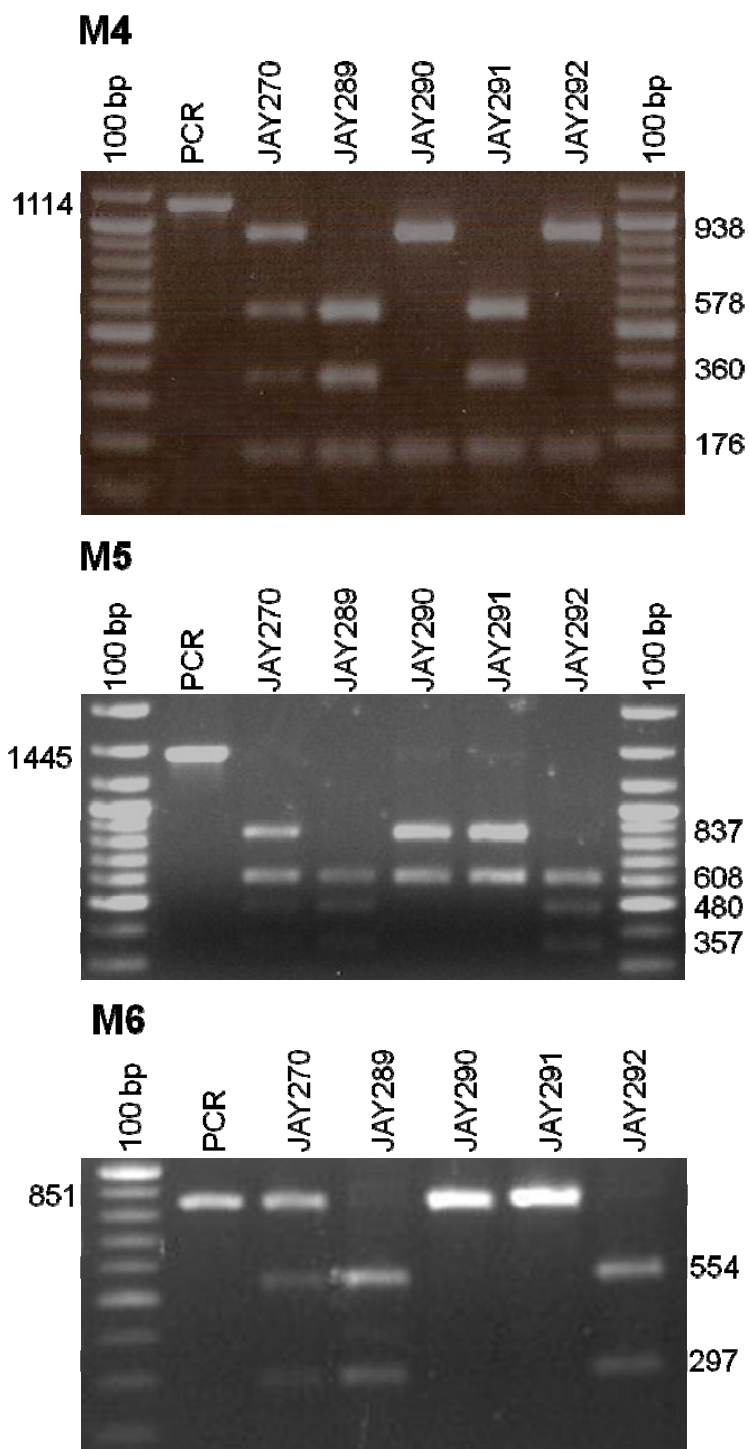


Figura 9: Teste dos marcadores moleculares M4, M5 e M6 nas linhagens JAY270, JAY289, JAY290, JAY291 e JAY292. **100 bp:** Marcador de peso molecular; **PCR:** Resultado da amplificação por PCR com os primers correspondentes a cada marcador molecular (tamanho igual para todas as 5 linhagens). **JAY270 e JAY289-JAY292:** Padrão de bandas resultante da digestão dos fragmentos amplificados por PCR com as enzimas de restrição correspondentes a cada marcador molecular.

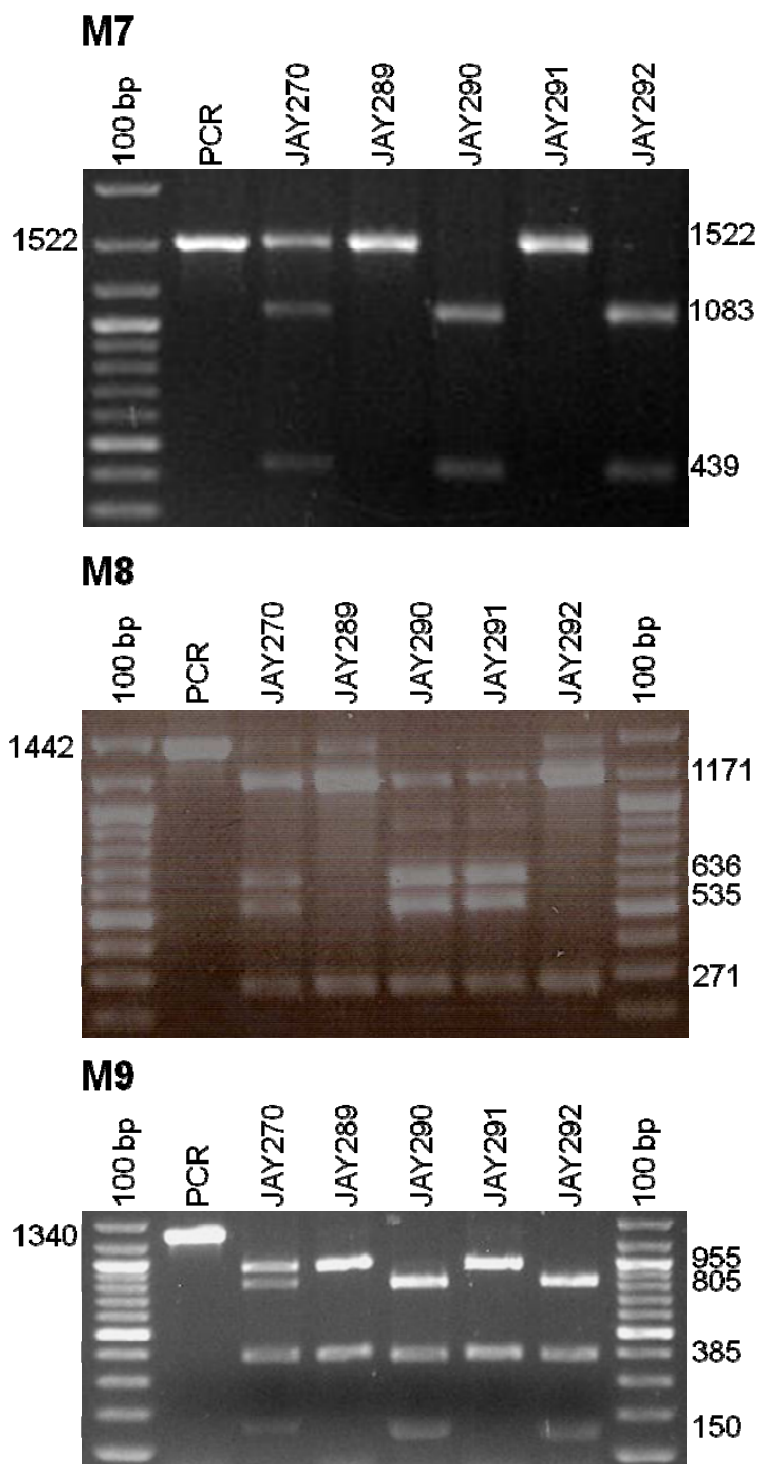


Figura 10: Teste dos marcadores moleculares M7, M8 e M9 nas linhagens JAY270, JAY289, JAY290, JAY291 e JAY292. **100 bp:** Marcador de peso molecular; **PCR:** Resultado da amplificação por PCR com os primers correspondentes a cada marcador molecular (tamanho igual para todas as 5 linhagens). **JAY270 e JAY289-JAY292:** Padrão de bandas resultante da digestão dos fragmentos amplificados por PCR com as enzimas de restrição correspondentes a cada marcador molecular.

3.3. Genotipagem de FDY1-FDY11 através dos marcadores M1-M9

Após a verificação de que todos os 9 marcadores moleculares eram capazes de detectar os 2 alelos de loci heterozigotos de JAY270, os mesmos foram utilizados para genotipar os 11 derivados de JAY270 portadores de variação cariotípica selecionados previamente (FDY1-FDY11). Essa análise teve como objetivo verificar se esses derivados continuavam heterozigotos como JAY270 ou se ficaram homozigotos devido a algum evento de recombinação. Foram utilizados como controle as linhagens JAY270, JAY291 e JAY292.

Após a extração do DNA genômico de todas as linhagens foram realizados PCRs com os primers desenvolvidos (Tabela 2) seguidos de digestão pelas enzimas de restrição correspondentes a cada marcador (Tabela 1). Os resultados de todas as reações de digestão foram analisados através de géis de eletroforese (Figuras 11, 12 e 13).

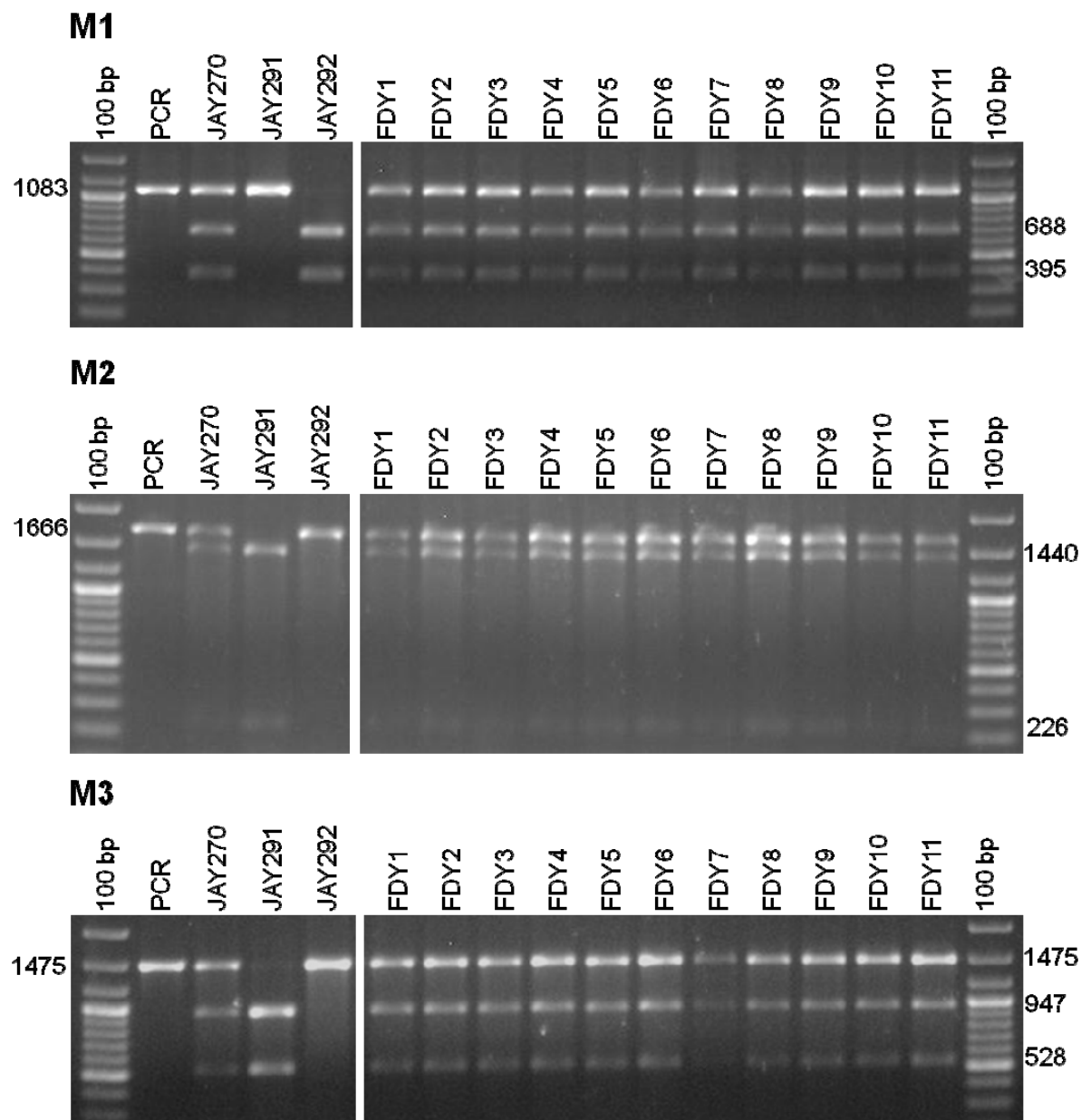


Figura 11: Genotipagem dos isolados FDY1-FDY11 através dos marcadores moleculares M1, M2 e M3. **100 bp:** Marcador de peso molecular; **PCR:** Amplificação por PCR com os primers correspondentes a cada marcador molecular (tamanho igual para todas as linhagens). **JAY270, JAY291, JAY292 e FDY1-FDY11:** Padrão de bandas resultante da digestão dos fragmentos amplificados por PCR com as enzimas de restrição correspondentes a cada marcador molecular. Note que os isolados FDY1-FDY11 apresentaram o mesmo padrão que JAY270 para todos os 3 marcadores, o que demonstra que todos continuam heterozigotos como a linhagem inicial.

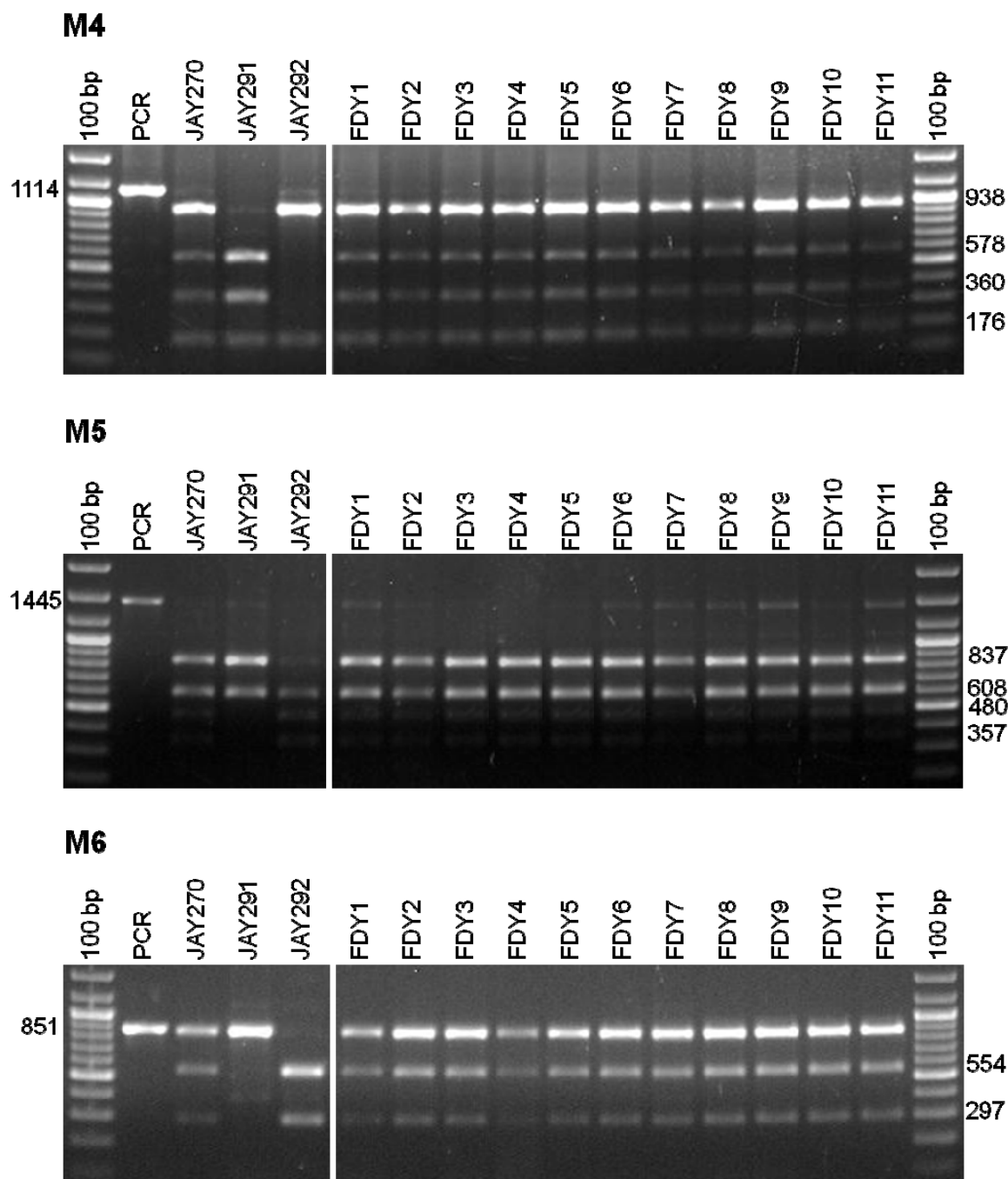


Figura 12: Genotipagem dos isolados FDY1-FDY11 através dos marcadores moleculares M4, M5 e M6. **100 bp:** Marcador de peso molecular; **PCR:** Amplificação por PCR com os primers correspondentes a cada marcador molecular (tamanho igual para todas as linhagens). **JAY270, JAY291, JAY292 e FDY1-FDY11:** Padrão de bandas resultante da digestão dos fragmentos amplificados por PCR com as enzimas de restrição correspondentes a cada marcador molecular. Note que os isolados FDY1-FDY11 apresentaram o mesmo padrão que JAY270 para todos os 3 marcadores, o que demonstra que todos continuam heterozigotos como a linhagem inicial.

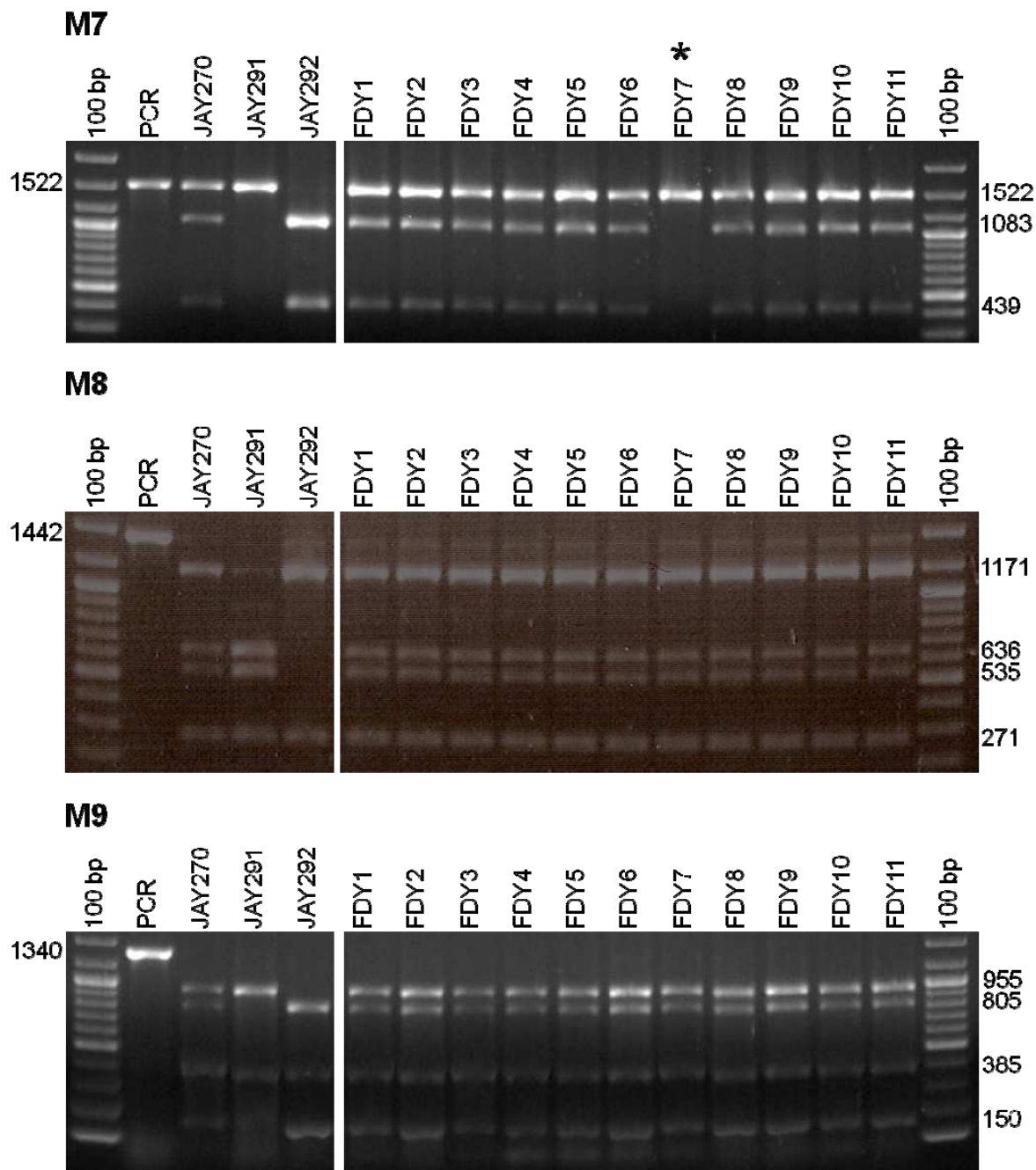


Figura 13: Genotipagem dos isolados FDY1-FDY11 através dos marcadores moleculares M7, M8 e M9. **100 bp:** Marcador de peso molecular; **PCR:** Amplificação por PCR com os primers correspondentes a cada marcador molecular (tamanho igual para todas as linhagens). **JAY270, JAY291, JAY292 e FDY1-FDY11:** Padrão de bandas resultante da digestão dos fragmentos amplificados por PCR com as enzimas de restrição correspondentes a cada marcador molecular. Note que ao ser testado com o marcador M7 o isolado FDY7 (*) apresentou o padrão referente a apenas um dos alelos, o que significa que esse isolado se tornou homozigoto nessa região. Para os marcadores M8 e M9 todos os isolados apresentaram o mesmo padrão que JAY270, o que demonstra que todos continuam heterozigotos como a linhagem inicial.

Após a análise dos géis de eletroforese observou-se que os isolados FDY1-FDY11 permaneciam heterozigotos em todas as regiões genotipadas pelos marcadores M1-M9. A única exceção foi o isolado FDY7, que se tornou homozigoto na região genotipada pelo marcador M7.

3.3.1. Análise dos resultados da genotipagem

A genotipagem com os marcadores M1-M9 demonstrou que os 11 isolados portadores de variação cariotípica permaneciam heterozigotos em pelo menos 8 regiões distintas do genoma. Esse resultado é um indicativo de que o mecanismo de recombinação genética responsável pela geração dos rearranjos cromossômicos nesses isolados é a recombinação mitótica, visto que após a recombinação meiótica seria improvável que todos os isolados permanecessem heterozigotos em todas as regiões analisadas.

Para reforçar essa hipótese foi estimada a probabilidade de um evento de esporulação de JAY270 seguido de cruzamento entre 2 esporos de mating types diferentes gerar um diplóide heterozigoto nas 9 regiões genotipadas. Dessas regiões, nenhuma é ligada ao locus *MAT* – que determina o mating type das leveduras. No entanto, foram consideradas nos cálculos apenas 8 regiões, visto que os loci genotipados por M6 e M7 são ligados entre si. Além disso, para o propósito desses cálculos, assumiu-se que o locus *MAT* e o centrômero do cromossomo 3 não são ligados.

Foram considerados dois cenários para os possíveis cruzamentos entre os esporos. No primeiro cenário considerou-se que os esporos de uma mesma tétrade iriam sempre cruzar-se entre si (cruzamento intra-tétrade, Figura 14), já que de acordo com algumas estimativas, a taxa de cruzamento entre esporos de tétrades diferentes em *S. cerevisiae* é muito baixa (Ruderfer et al. 2006). Nesse cenário, a probabilidade de um locus anteriormente heterozigoto continuar heterozigoto após a meiose e o cruzamento entre os esporos de diferentes mating types da mesma tétrade é de 2/3 (Knop 2006; Zakharov 2005).

Já no segundo cenário considerou-se que a probabilidade de os esporos da mesma tétrade cruzarem-se entre si é igual à probabilidade deles se cruzarem com

esporos de outras tétrades (cruzamento inter-tétrede, Figura 14). Para esse cenário levou-se em consideração estudos recentes que demonstraram que a taxa de cruzamento inter-tétrede em *S. cerevisiae* pode ser significativa (Murphy et al. 2010). Nesse cenário a probabilidade de um locus anteriormente heterozigoto continuar heterozigoto após a meiose e o cruzamento dos esporos com qualquer outro esporo da população com mating type oposto é de 1/2. Essa probabilidade foi calculada a partir da segregação mendeliana clássica para dois loci não ligados – locus em questão e locus *MAT* (Griffiths et al. 2008).

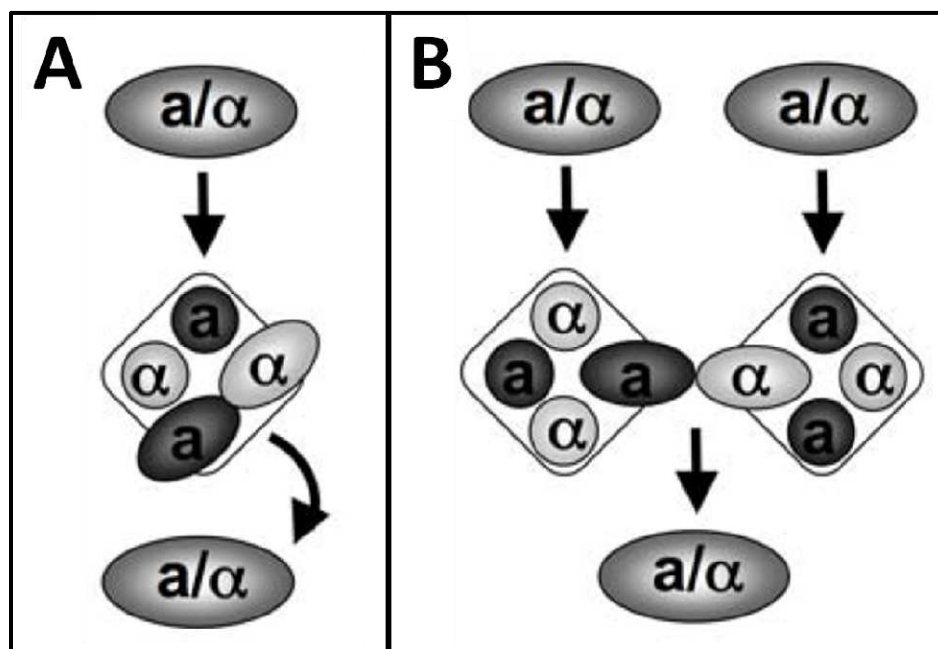


Figura 14: Duas possibilidades de cruzamento entre esporos. **A:** Cruzamento intra-tétrede. **B:** Cruzamento inter-tétrede. (Figura adaptada de Murphy et al. 2010).

As probabilidades obtidas representam a chance de um locus heterozigoto permanecer heterozigoto após meiose e cruzamento. No entanto, em cada um dos isolados, os 8 loci genotipados permaneciam heterozigotos. Sendo assim, no primeiro cenário, se para um locus a probabilidade é de $2/3$, para os 8 loci genotipados essa probabilidade é $(2/3)^8 \approx 4\%$. Já para o segundo cenário a probabilidade é $(1/2)^8 \approx 0,4\%$. Caso a linhagem JAY270 esporulasse no interior da dorna de fermentação, provavelmente seriam encontrados os dois tipos de cenário, com ocorrência de cruzamentos intra e inter-tétrades. Sendo assim, a probabilidade estimada de um

derivado de JAY270 heterozigoto nos 8 loci analisados ter sido gerado por meiose seguida de cruzamento entre os esporos é um valor entre 0,4 e 4%.

É necessário considerar, no entanto, que foram analisados 11 derivados de JAY270 (FDY1-FDY11) e que 10 deles continuam heterozigotos em todas as 8 regiões consideradas. Se assumíssemos que todos os 10 foram gerados independentemente, a probabilidade deles serem resultantes de esporulação seguida de cruzamento entre esporos na dorna seria algo entre $(0,4\%)^{10}$ e $(4\%)^{10}$, o que daria um valor muito próximo de 0 (entre 10^{-24} e 10^{-14}).

Além disso, ainda é importante considerar que caso as células de JAY270 tivessem esporulado no interior da dorna, provavelmente esse fenômeno não ocorreria apenas uma vez. A probabilidade de um locus heterozigoto permanecer heterozigoto após n gerações de meiose seguidas de cruzamento seria de $(2/3)^n$ para o primeiro cenário e $(1/2)^n$ para o segundo cenário. Levando-se esse dado em consideração, a probabilidade dos 10 derivados heterozigotos em 8 regiões distintas terem sido gerados após algumas gerações de meiose seguida de cruzamento seria praticamente desprezível.

Tendo em vista todas as considerações expostas acima, pode-se excluir a possibilidade dos derivados de JAY270 analisados terem sido gerados por eventos de meiose seguidos de cruzamento. Sendo assim, conclui-se que os isolados FDY1-FDY11 foram gerados durante o crescimento vegetativo e que, portanto, o mecanismo genético responsável pelo surgimento de seus rearranjos cromossômicos é a recombinação mitótica.

4. Análise de CNVs em FDY1-FDY11 através de CGH-array

Como foi discutido previamente na introdução, o genoma da linhagem JAY270 apresenta níveis elevados de variação estrutural nas regiões periféricas dos cromossomos (Argueso et al. 2009). Nessas regiões são encontrados genes em hemizigose, que se caracterizam pela presença de apenas uma cópia em um par de cromossomos homólogos. Essa característica do genoma de JAY270 auxilia na detecção de eventos de recombinação genética nessa linhagem, visto que rearranjos

cromossômicos envolvendo genes em hemizigose podem resultar em alterações em seu número de cópias. Essas alterações, por sua vez, podem ser detectadas através de metodologias que possibilitam a avaliação da dosagem gênica, como o CGH-array.

O CGH-array (Hibridização Genômica Comparativa) é uma metodologia baseada em micro-arranjos que permite a comparação da dosagem gênica de duas linhagens simultaneamente em todas as regiões do genoma. O princípio do procedimento é a marcação do DNA genômico de duas linhagens com fluoróforos de cores distintas seguida da hibridização em um micro-arranjo que contém sondas que cobrem todo o genoma da linhagem referência S288c. A razão entre as intensidades de fluorescência dos fluoróforos para cada região do micro-arranjo estará correlacionada com a diferença no número de cópias gênicas entre as linhagens.

Sendo assim, através dessa metodologia, seria possível comparar a dosagem gênica dos isolados FDY1-FDY11 com a da linhagem JAY270 – que lhes deu origem – para identificar regiões do genoma desses isolados que estão representadas em dose maior ou menor. Essas alterações no número de cópias gênicas podem estar relacionadas com eventos de recombinação em regiões em hemizigose no genoma de JAY270.

As figuras 15 a 18 correspondem aos CGH-arrays dos isolados que apresentaram alguma alteração em relação a JAY270 (FDY3, FDY4, FDY7 e FDY11). As linhagens FDY1, FDY2, FDY5, FDY6, FDY8, FDY9, FDY10 não apresentaram CNVs detectadas por CGH-array. As 16 linhas horizontais representam cada um dos 16 cromossomos de *S. cerevisiae*, sendo que cada uma das linhas apresenta a sequência gênica encontrada nos cromossomos da linhagem referência S288c. As regiões cromossômicas marcadas em cinza representam sítios onde não existe diferença significativa entre as dosagens gênicas dos isolados e de JAY270. Os picos vermelhos positivos representam amplificações gênicas dos isolados, ou seja, regiões onde sua dosagem gênica é maior do que a de JAY270. Os picos verdes negativos representam deleções nos isolados, isto é, regiões onde a dosagem gênica na linhagem JAY270 é maior. Essas alterações positivas e negativas na dosagem gênica também são chamadas de CNVs, sigla em inglês para variação no número de cópias.

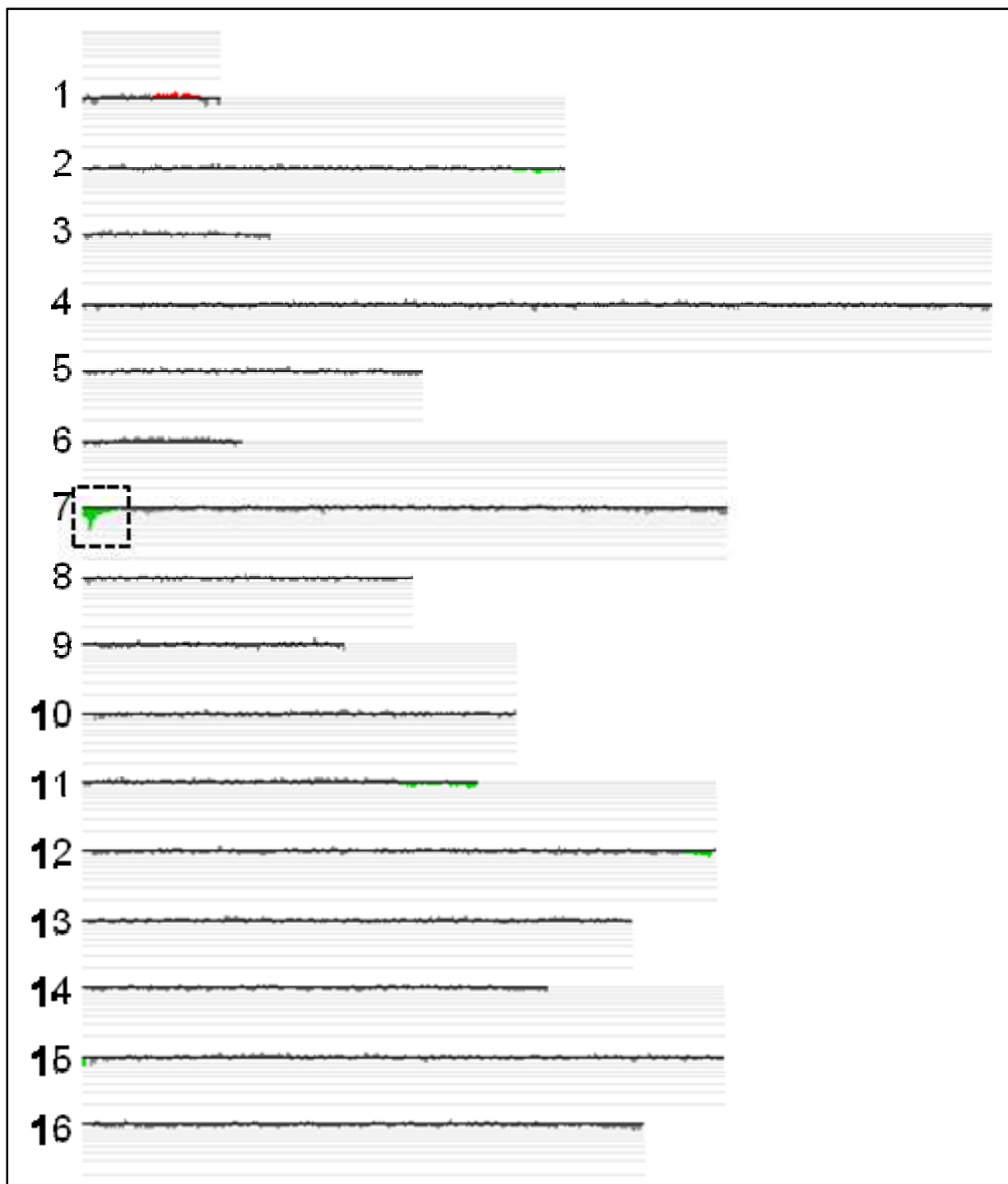


Figura 15: Resultado do CGH-array do isolado FDY3. A figura corresponde a uma representação gráfica da dosagem gênica relativa desse isolado em comparação com a da linhagem JAY270. Cada linha horizontal corresponde a um cromossomo específico de S288c. **Áreas em cinza:** regiões com dosagem gênica similar. **Pico verde negativo em destaque:** região do genoma de FDY3 sub-representada em relação a JAY270.

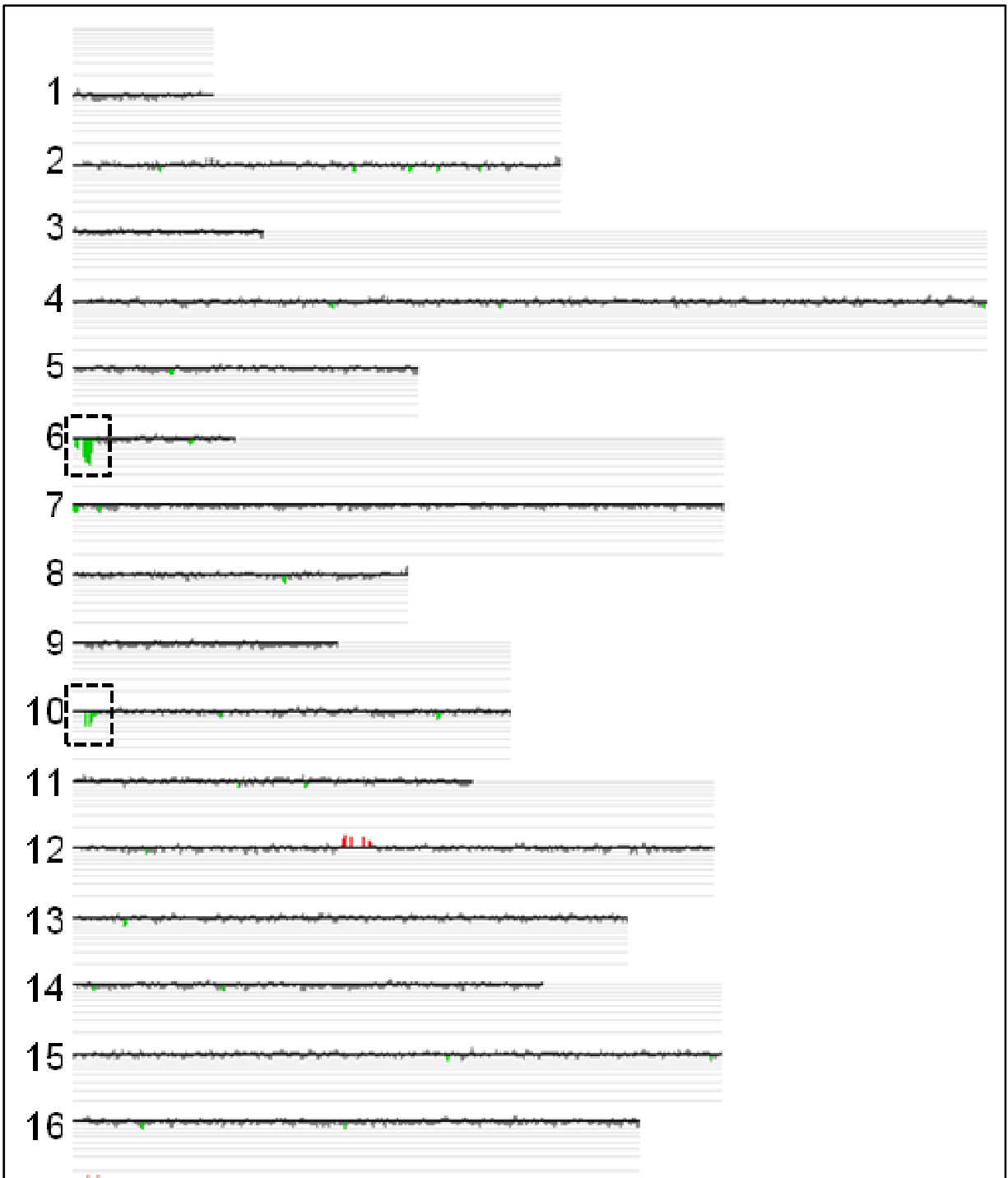


Figura 16: Resultado do CGH-array do isolado FDY4. A figura corresponde a uma representação gráfica da dosagem gênica relativa desse isolado em comparação com a da linhagem JAY270. Cada linha horizontal corresponde a um cromossomo específico de S288c. **Áreas em cinza:** regiões com dosagem gênica similar. **Picos verdes negativos em destaque:** regiões do genoma de FDY4 sub-representadas em relação a JAY270.

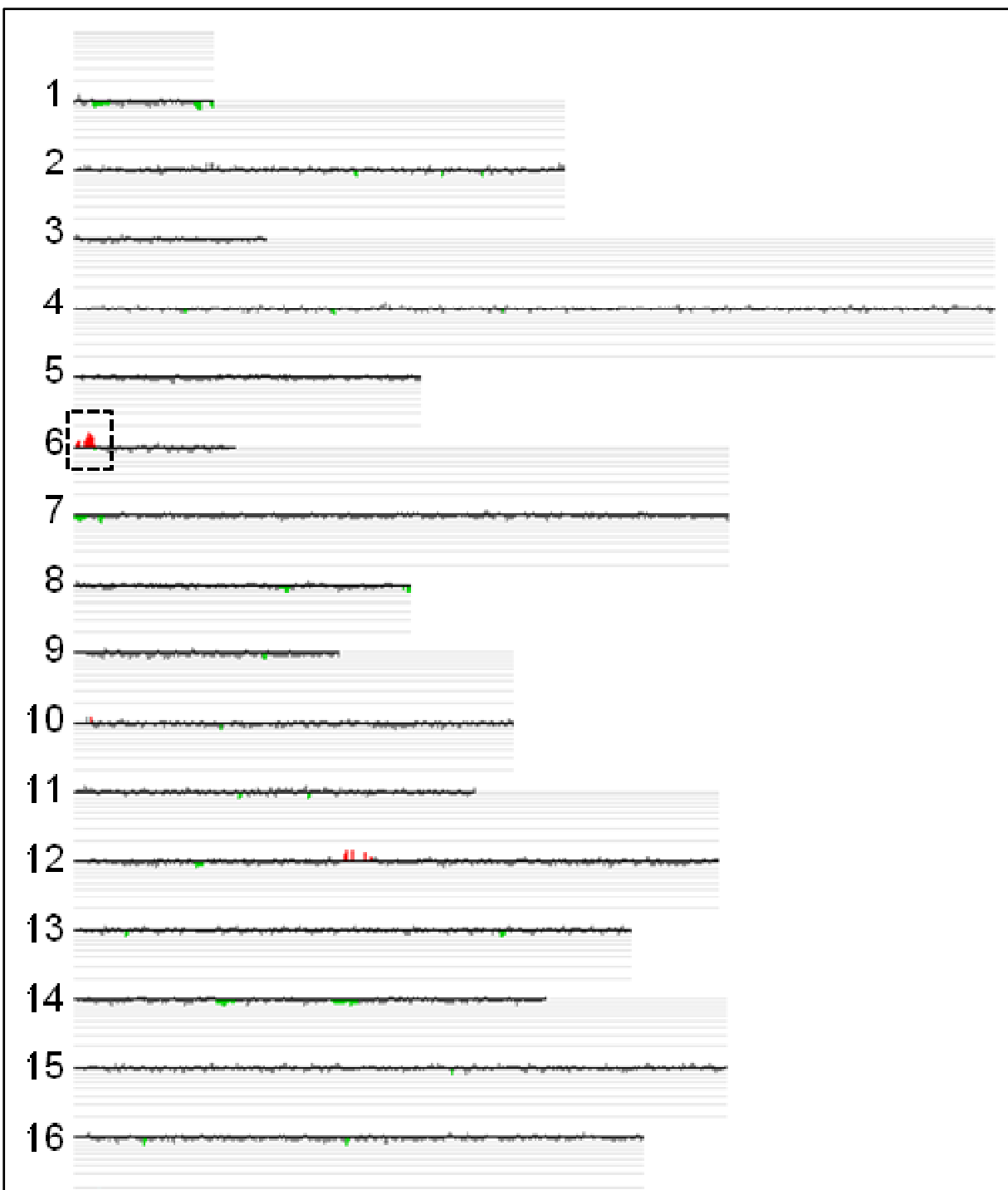


Figura 17: Resultado do CGH-array do isolado FDY7. A figura corresponde a uma representação gráfica da dosagem gênica relativa desse isolado em comparação com a da linhagem JAY270. Cada linha horizontal corresponde a um cromossomo específico de S288c. **Áreas em cinza:** regiões com dosagem gênica similar. **Pico vermelho positivo em destaque:** região do genoma de FDY7 super-representada em relação a JAY270.

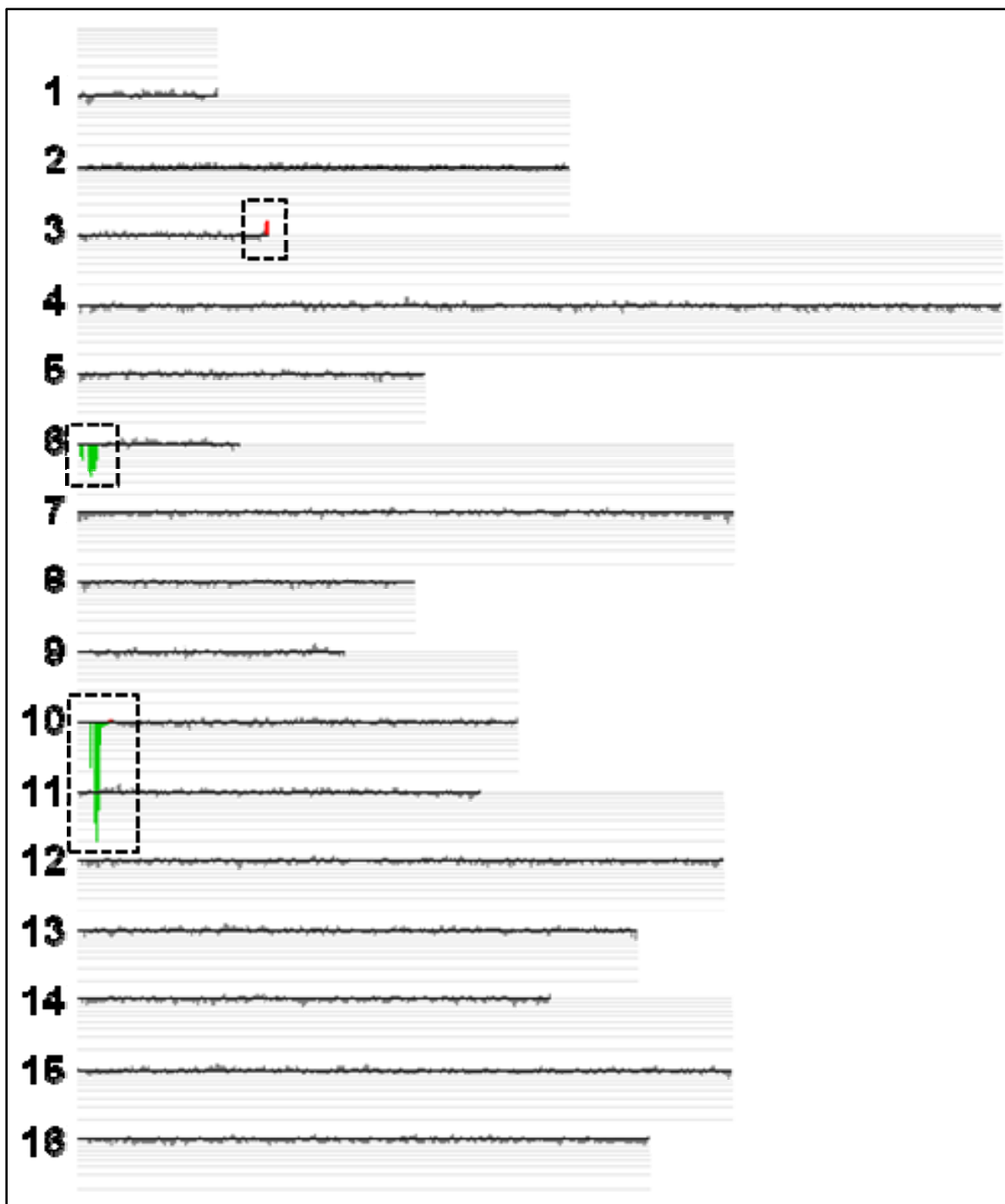


Figura 18: Resultado do CGH-array do isolado FDY11. A figura corresponde a uma representação gráfica da dosagem gênica relativa desse isolado em comparação com a da linhagem JAY270. Cada linha horizontal corresponde a um cromossomo específico de S288c. **Áreas em cinza:** regiões com dosagem gênica similar. **Pico vermelho positivo em destaque:** região do genoma de FDY11 super-representada em relação a JAY270. **Picos verdes negativos em destaque:** regiões do genoma de FDY11 sub-representadas em relação a JAY270.

Após uma análise inicial dos resultados dos CGH-arrays dos isolados FDY1-FDY11, foram encontradas poucas regiões com alteração na dosagem gênica em relação a JAY270. Dos 11 isolados, apenas 4 (FDY3, FDY4, FDY7 e FDY11) apresentam CNVs em relação a JAY270, todas elas envolvendo regiões localizadas nas extremidades dos cromossomos, o que já era esperado de acordo com a arquitetura genômica de JAY270 (Argueso et al. 2009).

No CGH-array do isolado FDY3 foi detectada uma alteração na extremidade esquerda do cromossomo 7 (Figura 15, pico verde em destaque). Esse pico negativo representa uma região do genoma de FDY3 que foi perdida em relação a JAY270.

No CGH-array do isolado FDY4 foram detectadas duas deleções em relação a JAY270, localizadas nos cromossomos 6 e 10 (Figura 16, picos verdes em destaque). O pico negativo no cromossomo 6 envolve uma região (que contém o gene *AGP3*) que está presente em hemizigose nas extremidades esquerdas dos cromossomos 6 longo e 10A de JAY270 (Argueso et al. 2009, Figura 19). Já o pico negativo no cromossomo 10 do CGH-array envolve uma região (entre os genes *YJL216C* e *HXT8*) que também está presente em hemizigose nos cromossomos 6 longo e 10A de JAY270, adjacente à região que contém o *AGP3* (Argueso et al. 2009, Figura 19). Essas duas regiões que estão presentes nos cromossomos 6 e 10 são resultado de eventos de translocação entre os dois cromossomos. No entanto, em S288c, a região que contém o gene *AGP3* está presente apenas no cromossomo 6, enquanto a região entre *YJL216C* e *HXT8* está presente apenas no cromossomo 10, o que justifica o fato dessas regiões terem sido marcadas apenas nos cromossomos 6 e 10, respectivamente, no gráfico do CGH-array, visto que as sondas desse micro-arranjo contém as sequências genômicas de S288c.

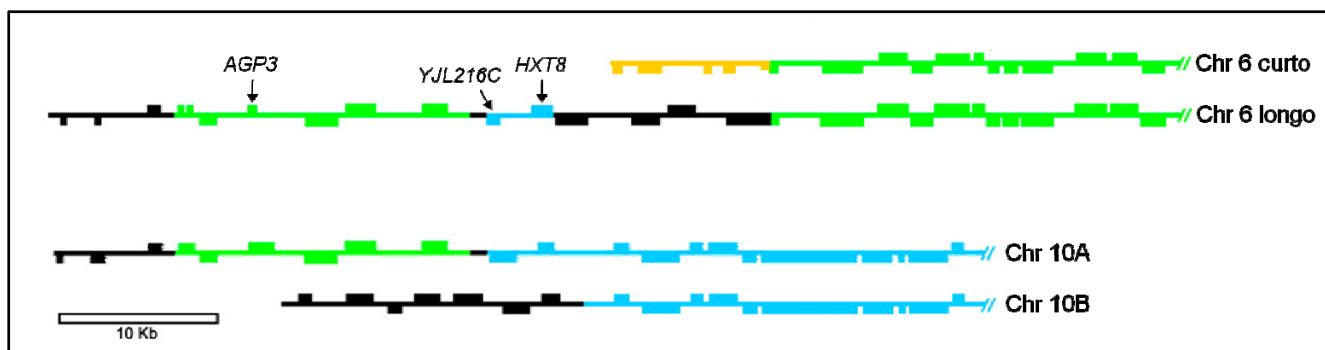


Figura 19: Adaptada de Argueso et al. 2009. Representação gráfica do alinhamento das extremidades esquerdas dos cromossomos 6 curto e longo e 10A e 10B de JAY270. As linhas horizontais representam as extremidades esquerdas dos cromossomos designados. Os retângulos representam ORFs e suas posições acima e abaixo da linha central designam as orientações Watson e Crick, respectivamente. As regiões cromossômicas foram coloridas de acordo com sua correspondência com os cromossomos da linhagem referência S288c: Cromossomo 1 (laranja), Cromossomo 6 (verde), Cromossomo 10 (azul). Regiões em preto correspondem a sequências não encontradas no genoma de S288c. A barra de escala de 10 Kb indica a escala de tamanho das regiões cromossômicas.

Como em JAY270 as duas regiões estão presentes nos dois cromossomos, os picos verdes no CGH-array de FDY4 podem representar alterações relacionadas com os cromossomos 6 ou 10. Ao se analisar o PFGE desse isolado, é possível observar que seu cromossomo 6 longo diminuiu de tamanho em relação ao de JAY270 (Figura 4, FDY4, terceira banda de baixo para cima). Como essa região em hemizigose na extremidade esquerda é uma das causas da diferença de tamanho entre os cromossomos 6 curto e longo, provavelmente a deleção nessa região detectada pelo CGH-array aconteceu no cromossomo 6 longo de FDY4. A causa dessa deleção foi possivelmente um evento de recombinação mitótica entre os cromossomos 6 curto e longo, que resultou em perda de heteroziguidade. Com isso as extremidades esquerdas dos dois cromossomos ficaram idênticas, o que resultou na diminuição de tamanho do cromossomo mais longo.

No CGH-array do isolado FDY7 foi detectada uma alteração no cromossomo 6 (Figura 17, pico vermelho em destaque) que representa uma região que foi amplificada em relação a JAY270. Esse pico positivo envolve a mesma região em hemizigose na extremidade esquerda do cromossomo 6 longo que foi perdida em FDY4. No PFGE de FDY7 é possível observar que seu cromossomo 6 curto é maior que o de JAY270

(Figura 4, FDY7, segunda banda de baixo para cima). Sendo assim, provavelmente a amplificação nessa região detectada pelo CGH-array aconteceu no cromossomo 6 curto de FDY7. A causa dessa amplificação foi possivelmente um evento de recombinação mitótica entre os cromossomos 6 curto e longo similar ao que aconteceu em FDY4, que também resultou em perda de heterozigosidade. Nesse caso, no entanto, a extremidade esquerda do cromossomo 6 curto ficou idêntica a do cromossomo 6 longo, o que resultou em seu aumento de tamanho.

No CGH-array do isolado FDY11 foi detectada uma amplificação na extremidade direita do cromossomo 3 (Figura 18, pico vermelho em destaque) e duas deleções nas extremidades esquerdas dos cromossomos 6 e 10 (Figura 18, picos verdes em destaque). O pico verde no cromossomo 6 envolve a mesma região em hemizigose que foi detectada no cromossomo 6 do CGH-array de FDY4. Já o pico verde no cromossomo 10 é maior e mais abrangente que o que foi detectado no cromossomo 10 do CGH-array de FDY4. Nesse caso a deleção envolve mais genes da região em hemizigose na extremidade esquerda do cromossomo 10A, e não apenas aqueles que também estão presentes na região em hemizigose na extremidade esquerda do cromossomo 6 longo (Figura 19). De acordo com o PFGE de FDY11, não existe nenhuma alteração nos cromossomos 6 e 10 (Figura 4, FDY11). No entanto, devido ao seu maior tamanho, o cromossomo 10 está localizado em uma região do gel onde a resolução é menor, o que dificulta a detecção de alterações nesse e em outros cromossomos de tamanho maior. Sendo assim, podem ter ocorrido alterações de tamanho nesse cromossomo que não foram detectadas no PFGE.

Como a deleção detectada no cromossomo 10 do CGH-array abrange uma região maior do que a que também está presente no cromossomo 6, provavelmente essa alteração aconteceu no cromossomo 10 de FDY11. Nesse caso a causa da deleção foi possivelmente um evento de recombinação mitótica entre os cromossomos 10A e 10B de JAY270, que resultou em perda de heterozigosidade. Como consequência, a extremidade esquerda do cromossomo 10A ficou idêntica a do cromossomo 10B, o que resultou na deleção detectada pelo CGH-array.

A amplificação na extremidade direita do cromossomo 3 também foi detectada em um CGH-array realizado previamente para comparar a dosagem gênica de JAY270

com a da linhagem referência S288c na forma diplóide para identificação de CNVs entre as duas (Argueso et al. 2009, Figura 20). De acordo com o tamanho do pico vermelho, essa amplificação representa uma região que está presente em uma cópia a mais em JAY270 em relação a S288c, o que significa que essa região provavelmente se encontra em hemizigose no genoma de JAY270. Como o isolado FDY11 contém uma cópia a mais em relação a JAY270, provavelmente essa amplificação foi resultado de um evento de recombinação mitótica que resultou em perda de heterozigossidade nessa região. Como consequência, a região que antes estava em hemizigose passou a estar presente nos dois cromossomos homólogos, o que resultou na amplificação detectada pelo CGH-array.

Apesar de terem sido detectadas CNVs em relação a JAY270 em apenas 4 dos 11 isolados analisados através de CGH-array, é importante ressaltar que esse tipo de metodologia não é capaz de detectar todos os eventos de recombinação que podem ter ocorrido nesses isolados. O CGH-array não é capaz de detectar eventos de recombinação recíprocos entre os cromossomos, visto que esse tipo de rearranjo não resulta em alteração na dosagem gênica. Além disso, essa metodologia não é capaz de detectar eventos de recombinação que resultem em perda de heterozigossidade de regiões que não estão em hemizigose no genoma de JAY270. Em regiões heterozigotas do genoma existem polimorfismos de nucleotídeos (SNPs) entre as duas versões alélicas nos dois cromossomos homólogos. Quando ocorre perda de heterozigossidade nessas regiões esses SNPs são perdidos, mas a dosagem gênica não é alterada, visto que o CGH-array não tem resolução suficiente para detectar alterações pontuais entre dois alelos de um mesmo gene. Sendo assim, é muito provável que uma parte considerável dos eventos de recombinação que ocorreram nos 11 isolados analisados não tenha resultado em alteração na dosagem gênica em relação a JAY270, o que explica o fato de terem sido detectadas CNVs no CGH-array de apenas 4 dos 11 isolados.

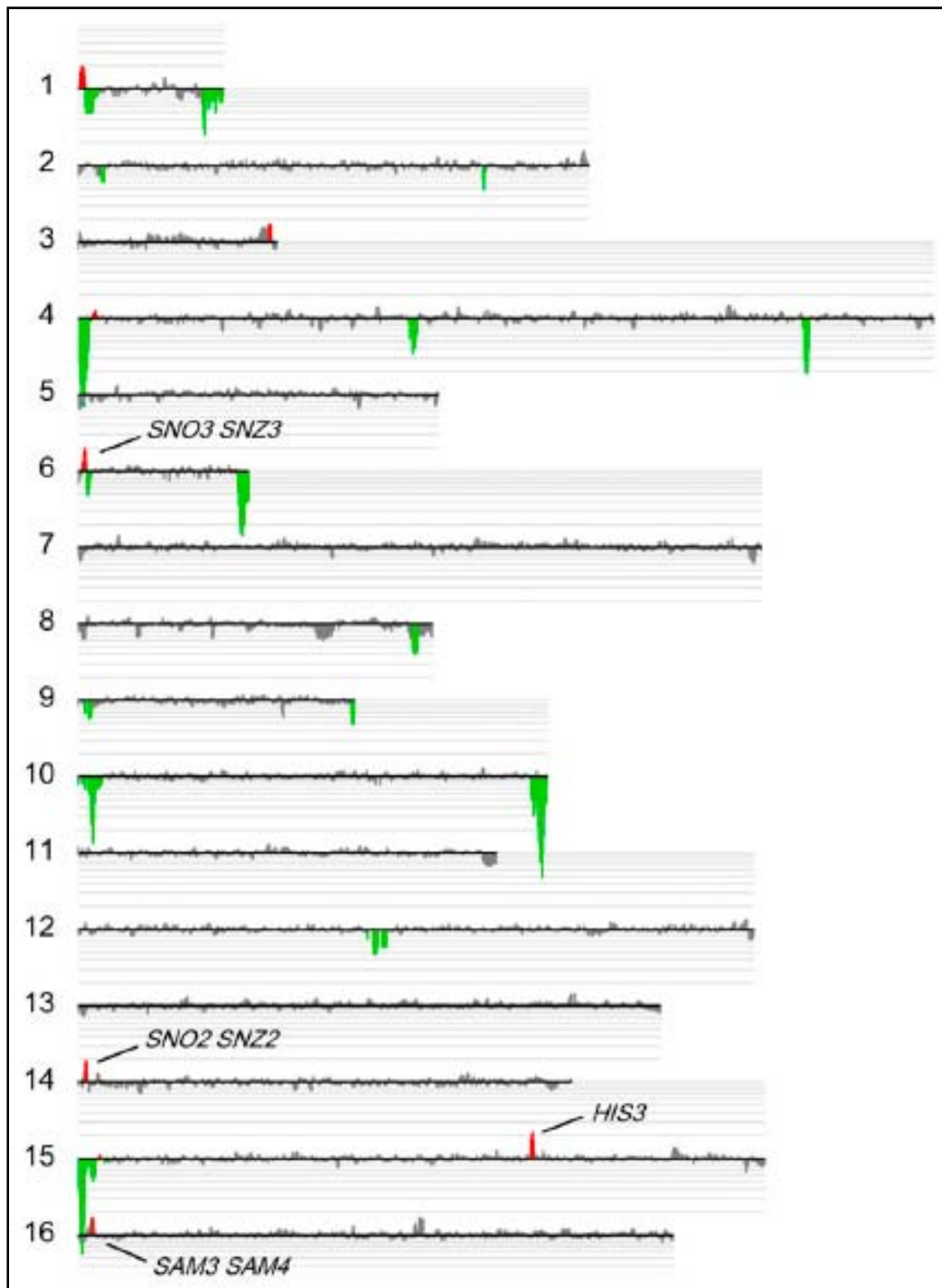


Figura 20: Extraída de Argueso et al. 2009. Resultado do CGH-array de JAY270. A figura corresponde a uma representação gráfica da dosagem gênica relativa de JAY270 em comparação com a da linhagem referência S288c na forma diplóide. Cada linha horizontal corresponde a um cromossomo específico de S288c. **Áreas em cinza:** regiões com dosagem gênica similar. **Picos vermelhos positivos:** regiões do genoma de JAY270 super-representadas em relação a S288c. **Picos verdes negativos:** regiões do genoma de JAY270 sub-representadas em relação a S288c.

DISCUSSÃO

1. Variação cariotípica em JAY270 durante a produção de etanol

Os resultados obtidos demonstraram que durante o processo industrial de produção de etanol os rearranjos cromossômicos se acumularam com alta frequência na linhagem JAY270, visto que aproximadamente 36% dos derivados analisados possuíam variação cariotípica em relação à linhagem inicial, valor semelhante ao obtido por Lopes 2000 em um experimento com essa mesma linhagem (39,5%).

Por outro lado, um experimento de sub-cultivo (~200 divisões celulares) realizado previamente para analisar a estabilidade genômica da linhagem JAY270 através de PFGE demonstrou que em condições de laboratório favoráveis (não-seletivas) essa linhagem não apresenta instabilidade cariotípica considerável, visto que não foram encontradas novas bandas cromossômicas.

Esses dados sugerem que, assim como já foi proposto em outros trabalhos (Adams et al. 1992; Dunham et al. 2002; Carro et al. 2003; Schuller et al. 2007; James et al. 2008), os altos índices de variação cariotípica observados para JAY270 durante o processo industrial de fermentação podem estar relacionados com mecanismos de adaptação ao ambiente altamente competitivo da dorna, visto que durante esse processo as leveduras enfrentam diversos tipos de estresses ambientais. Sendo assim, é possível que a instabilidade cariotípica seja capaz de gerar variantes mais adaptados, o que confere a essa linhagem uma capacidade de responder a condições ambientais mais extremas.

É importante ressaltar, no entanto, que assim como já foi relatado em outros trabalhos (Nadal et al. 1999; Lopes 2000), nenhum dos variantes cariotípicos foi capaz de substituir a linhagem parental e os outros variantes presentes na população da dorna. Dentre os 28 variantes cariotípicos, foram observados 17 perfis cariotípicos distintos entre si. Por outro lado, 64% dos 78 derivados de JAY270 analisados apresentavam o perfil cariotípico da linhagem parental.

Apesar dos resultados indicarem que nenhum dos rearranjos cromossômicos que ocorreram na população derivada de JAY270 durante o processo de fermentação conferiam características seletivamente vantajosas, eles podem fornecer uma fonte significativa de variabilidade genética que pode ser importante para a adaptação da

linhagem a alterações nas condições ambientais, assim como já foi proposto por outros autores (Nadal et al. 1999; Lopes 2000).

2. Mecanismos de recombinação genética responsáveis pela geração dos rearranjos cromossômicos

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, os rearranjos cromossômicos observados em derivados de JAY270 foram gerados durante o crescimento vegetativo através de recombinação mitótica.

Eventos de recombinação mitótica podem resultar em perda de heterozigosidade, fenômeno que foi observado em alguns dos derivados de JAY270 analisados nesse trabalho. A região heterozigota do cromossomo 13 de JAY270 genotipada pelo marcador M7 perdeu sua heterozigosidade no derivado FDY7, que se tornou homozigoto nessa região (Figura 13). Além disso, de acordo com os resultados do CGH-array (Figuras 16 a 18), também houve perda de heterozigosidade em regiões cromossômicas dos derivados FDY4 e FDY11 e em outra região do derivado FDY7 além daquela detectada pelo marcador M7. É importante ressaltar, no entanto, que os marcadores moleculares M1-M9 genotiparam apenas 9 posições isoladas no genoma de FDY1-FDY11 e que o CGH-array, como foi exposto previamente, não é capaz de detectar todos os eventos de recombinação que podem ter ocorrido nesses 11 derivados. Sendo assim, pode ter ocorrido perda de heterozigosidade em outras regiões que não foram detectadas por essas metodologias.

Existem dois mecanismos moleculares que podem ter sido responsáveis pela perda de heterozigosidade nos derivados de JAY270: crossing-over mitótico e break-induced replication (BIR). Ambos os mecanismos são desencadeados para reparar quebras na fita dupla do DNA (DSBs - double strand breaks), um tipo de lesão potencialmente letal que ocorre espontaneamente durante o metabolismo normal da célula (Llorente et al. 2008). Molecularmente, os dois mecanismos são iniciados pela degradação no sentido 5'-3' das extremidades quebradas do DNA para gerar caudas 3' de DNA de fita simples (Symington 2002).

Nos eventos de break-induced replication (BIR), a DSB é reparada através do pareamento e invasão da extremidade 3' livre na fita dupla de DNA do cromossomo homólogo, na região de homologia correspondente. Após a invasão é estabelecida uma

forquilha de replicação e a síntese de DNA ocorre a partir da extremidade 3' invasora até o final do cromossomo, utilizando-se o DNA do cromossomo homólogo como molde (Malkova et al. 1996; Morrow et al. 1997; Llorente et al. 2008). Sendo assim, a partir do local onde ocorreu a DSB os dois cromossomos homólogos ficarão idênticos, resultado que está representado na Figura 21. Quando ocorre segregação da cromátide 2 com as cromátides 3 ou 4, as células filhas geradas apresentarão perda de heterozigidade nessa região, que será idêntica nos dois cromossomos homólogos (Figura 21).

O crossing-over mitótico (Figura 21) consiste na recombinação recíproca entre dois cromossomos homólogos a partir do local onde ocorreu a DSB, o que resulta na situação representada na Figura 21. Quando ocorre segregação das cromátides 1 com 3 e 2 com 4 (Figura 21), as células filhas geradas apresentarão perda de heterozigidade (Figura 21).

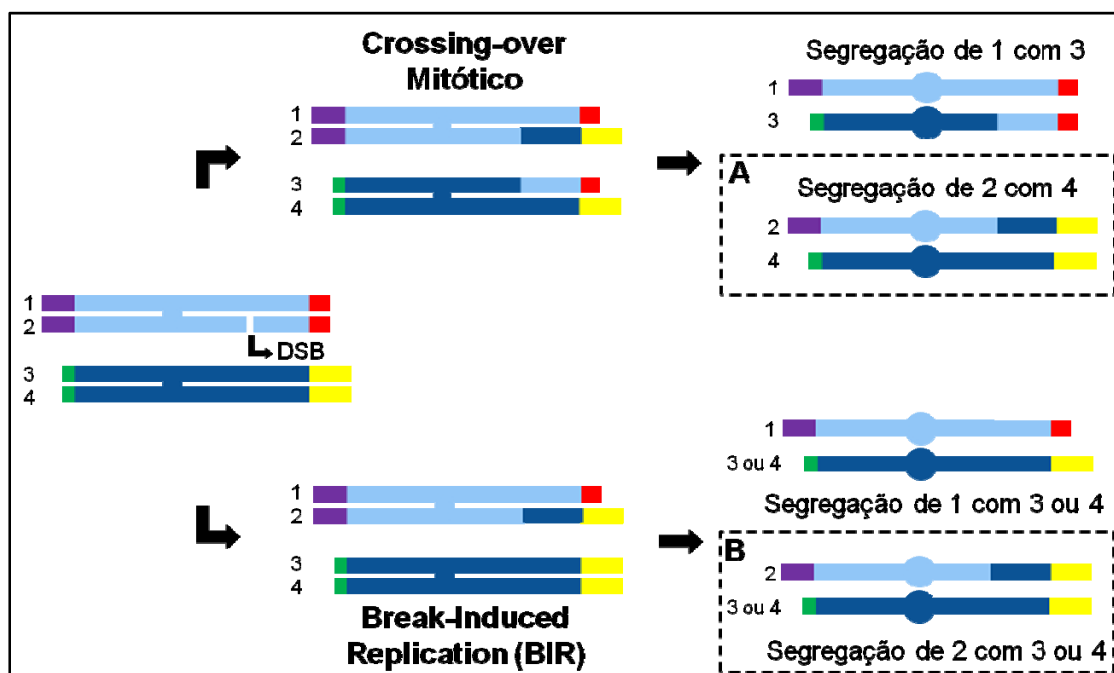


Figura 21: Representação gráfica esquemática dos mecanismos de recombinação genética que podem ter sido responsáveis pela perda de heterozigidade observada nos derivados de JAY270. As barras azuis representam os cromossomos, enquanto os círculos representam os centrômeros. Os cromossomos azul claro e azul escuro correspondem a um par de cromossomos homólogos. Os segmentos coloridos nas extremidades cromossômicas representam regiões em hemizigose.

É importante ressaltar que as configurações cromossômicas representadas nos painéis A e B da Figura 21 são idênticas, ou seja, dependendo da segregação das cromátides irmãs, eventos de BIR e crossing-over mitótico podem gerar o mesmo resultado. Sendo assim, não é possível determinar qual dos dois mecanismos de recombinação mitótica foi responsável pela geração dos eventos de perda de heterozigosidade desse tipo que foram detectados nos derivados de JAY270.

Como já foi discutido previamente, o genoma da linhagem JAY270 apresenta níveis elevados de variação estrutural nas regiões periféricas dos cromossomos, onde são encontradas regiões em hemizigose (Argueso et al. 2009). Sendo assim, nas extremidades cromossômicas de JAY270 existem regiões que estão presentes em apenas um cromossomo do par, o que resulta no polimorfismo de tamanho entre cromossomos homólogos detectado através do PFGE dessa linhagem (Argueso et al. 2009).

Os cromossomos homólogos representados graficamente na Figura 21 apresentam polimorfismo de tamanho, sendo que as regiões em hemizigose nas extremidades foram representadas através de segmentos coloridos. Nesses cromossomos polimórficos, eventos de crossing-over mitótico e BIR irão gerar cromossomos recombinantes com tamanho diferente do parental (Figura 21). Dessa forma, na linhagem JAY270 esses eventos de recombinação podem ser responsáveis pela geração de bandas com tamanho alterado detectadas através de PFGE.

Eventos de crossing-over mitótico associados com perda de heterozigosidade, ou seja, quando ocorre segregação das cromátides 1 com 3 e 2 com 4, resultam em células filhas com apenas 1 cromossomo com tamanho diferente do parental (Figura 21), o que pode explicar os rearranjos cromossômicos que ocorreram no cromossomo 6 dos derivados FDY1, FDY4, FDY5, FDY6 e FDY7 (Figura 4, segunda e terceira banda de baixo para cima). Quando as duas cromátides recombinantes (2 e 3) segregam-se para a mesma célula filha, não existe perda de heterozigosidade, mas os dois cromossomos apresentarão tamanho alterado em relação aos parentais (Figura 22). Esse tipo de evento pode ter sido o responsável pelos rearranjos cromossômicos no cromossomo 6 de FDY10, que apresenta o cromossomo 6 longo menor e o cromossomo 6 curto maior em comparação com JAY270 (Figura 4, FDY10, segunda e

terceira banda de baixo para cima).

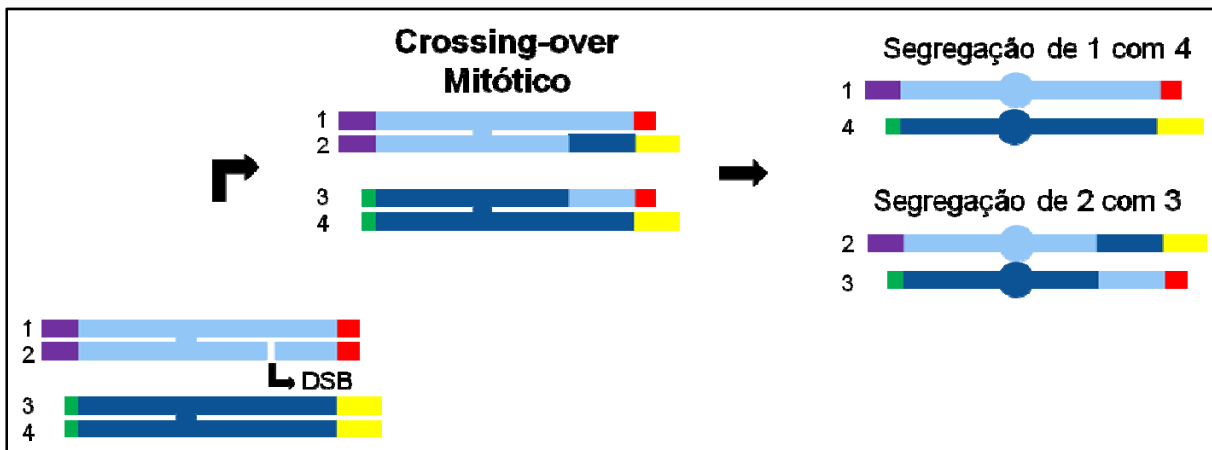


Figura 22: Representação gráfica esquemática da outra possibilidade de segregação das cromátides irmãs após um evento de crossing-over mitótico.

Tendo em vista que a instabilidade cariotípica de JAY270 durante o processo de produção de etanol está associada com eventos de recombinação que resultam em perda de heteroziguidade, poderia se esperar que essa linhagem apresentasse um nível elevado de regiões em homozigose em seu genoma. No entanto, como foi demonstrado previamente por Argueso et al. 2009, essa linhagem apresenta um genoma altamente heterozigoto.

Um mecanismo que poderia contribuir para a manutenção da heteroziguidade dessa linhagem é a seleção balanceadora, ou seja, a favor do heterozigoto. As constantes alterações nas condições ambientais no interior da dorna de fermentação durante o processo de produção de etanol associadas ao fato de que diferentes alelos ou combinações de alelos podem ser favorecidos sob as diferentes situações ambientais podem resultar em uma maior vantagem adaptativa dos indivíduos heterozigotos ao ambiente da dorna, ou seja, pode ser que eles apresentem uma maior capacidade de adaptação do que os indivíduos homozigotos. Nesse contexto, a seleção balanceadora pode atuar favorecendo os indivíduos heterozigotos da população, o que pode contribuir para a manutenção da heteroziguidade na população derivada da linhagem JAY270 (Levene 1953; Charlesworth 2006).

CONCLUSÕES

- Foram analisados 78 derivados de JAY270 obtidos a partir da amostra coletada na dorna de fermentação. Desses derivados, 36% apresentavam algum tipo de rearranjo cromossômico em relação à linhagem parental. Esse dado comprova que a linhagem industrial PE-2 apresenta variação cariotípica durante o processo de produção de etanol.
- Determinou-se que os rearranjos encontrados nesses derivados foram gerados durante o crescimento vegetativo por Recombinação Mitótica. Esse mecanismo de recombinação pode resultar em perda de heterozigosidade, que foi detectada em alguns dos derivados analisados. Dois mecanismos de recombinação mitótica podem ser responsáveis pela perda de heterozigosidade detectada nesses derivados: Crossing-over mitótico e Break-Induced Replication (BIR).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, J., Puskas-Rozsa, S., Simlar, J., and Wilke, C. M. (1992). Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 22, 13-19.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25, 3389-402.

Argueso, J. L. et al. (2009). Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome research* 19, 2258-70.

Argueso, J. L., Westmoreland, J., Mieczkowski, P. A., Gawel, M., Petes, T. D., and Resnick, M. A. (2008). Double-strand breaks associated with repetitive DNA can reshape the genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11845-50.

Argueso, J. L., and Pereira, G. A. (2010). Perspective: Indigenous sugarcane yeast strains as ideal biological platforms for the delivery of next generation biorefining technologies. *International sugar journal* 112, 86-89.

Bakalinsky, A. T., and Snow, R. (1990). The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6, 367-82.

Barbera, M. A., and Petes, T. D. (2006). Selection and analysis of spontaneous reciprocal mitotic cross-overs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 12819-24.

Basso, L. C., de Amorim, H. V., de Oliveira, A. J., and Lopes, M. L. (2008). Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS yeast research* 8, 1155-63.

Benítez, T., Martínez, P., and Codón, A. C. (1996). Genetic constitution of industrial yeast. *Microbiología* 12, 371-84.

Carro, D., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, J. E., and Piña, B. (2003). Structural characterization of chromosome I size variants from a natural yeast strain. *Yeast* 20, 171-83.

Carro, D., and Piña, B. (2001). Genetic analysis of the karyotype instability in natural wine yeast strains. *Yeast* 18, 1457-70.

Carvalho-Netto, O. V. et al. (2010). PCR-based analysis of hyper-variable intragenic regions for the molecular identification of *Saccharomyces cerevisiae* industrial bioethanol strains. *Applied And Environmental Microbiology*, in preparation.

Charlesworth, D. (2006). Balancing selection and its effects on sequences in nearby genome regions. *PLoS genetics* 2, e64.

Chindamporn, A., Iwaguchi, S., Nakagawa, Y., Homma, M., and Tanaka, K. (1993). Clonal size-variation of rDNA cluster region on chromosome XII of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of general microbiology* 139, 1409-15.

Codon, A. C., and Benitez, T. (1995). Variability of the physiological features and of the nuclear and mitochondrial genomes of bakers' yeasts. *Systematic and applied microbiology* 18, 343-352.

Codón, A. C., Benítez, T., and Korhola, M. (1997). Chromosomal reorganization during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Current genetics* 32, 247-59.

Coyle, S., and Kroll, E. (2008). Starvation induces genomic rearrangements and starvation-resilient phenotypes in yeast. *Molecular biology and evolution* 25, 310-8.

Dunham, M. J., Badrane, H., Ferea, T., Adams, J., Brown, P. O., Rosenzweig, F., and 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, 16144-9.

Gangloff, S., Zou, H., and Rothstein, R. (1996). Gene conversion plays the major role in controlling the stability of large tandem repeats in yeast. *The EMBO journal* 15, 1715-25.

Gasent-Ramírez, J. M., Castrejón, F., Querol, A., Ramón, D., and Benítez, T. (1999). Genomic stability of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Systematic and applied microbiology* 22, 329-40.

Gresham, D., Dunham, M. J., and Botstein, D. (2008). Comparing whole genomes using DNA microarrays. *Nature reviews. Genetics* 9, 291-302.

Griffiths, A. J., Wessler, S. R., Lewontin, R. C., and Carroll, S. B. (2008). *Introduction to Genetic Analysis* 9 ed. (New York, USA: W.H. Freeman and Company).

Guerra, J. B., Araújo, R. A., Pataro, C., Franco, G. R., Moreira, E. S., Mendonça-Hagler, L. C., and 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, 106-11.

Hiraoka, M., Watanabe, K., Umezu, K., and Maki, H. (2000). Spontaneous loss of heterozygosity in diploid *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Genetics* 156, 1531-48.

Hochholdinger, F., and Hoecker, N. (2007). Towards the molecular basis of heterosis. *Trends in plant science* 12, 427-32.

Hood, M. E., and Antonovics, J. (2004). Mating within the meiotic tetrad and the maintenance of genomic heterozygosity. *Genetics* 166, 1751-9.

James, T. C., Usher, J., Campbell, S., and Bond, U. (2008). Lager yeasts possess dynamic genomes that undergo rearrangements and gene amplification in response to stress. *Current genetics* 53, 139-52.

Knop, M. (2006). Evolution of the hemiascomycete yeasts: on life styles and the importance of inbreeding. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 28, 696-708.

Kubitschek, H. E. (1990). Cell Volume Increase in *Escherichia coli* after Shifts to Richer Media. *Journal of Bacteriology* 172, 94-101.

Lemoine, F. J., Degtyareva, N. P., Lobachev, K., and Petes, T. D. (2005). Chromosomal translocations in yeast induced by low levels of DNA polymerase α a model for chromosome fragile sites. *Cell* 120, 587-98.

Levene, H. (1953). Genetic equilibrium when more than one ecological niche is available. *The American Naturalist* 87, 331 - 333.

Llorente, B., Smith, C. E., and Symington, L. S. (2008). Break-induced replication: what is it and what is it for? *Cell cycle* 7, 859-64.

Longo, E., and Vezinhet, F. (1993). Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* 59, 322-6.

Lopes, M. L. (2000). Estudo do polimorfismo cromossômico em *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem PE2) utilizada no processo industrial de produção de etanol.

Lucena, B. T., Silva-Filho, E. A., Coimbra, M. R., Morais, J. O., Simões, D. A., and Morais, M. A. (2007). Chromosome instability in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivated under laboratory conditions. *Genetics and molecular research : GMR* 6, 1072-84.

Malkova, A., Ivanov, E. L., and Haber, J. E. (1996). Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7131-6.

Marris, E. (2006). Sugar cane and ethanol: drink the best and drive the rest. *Nature* 444, 670-2.

Mieczkowski, P. A., Lemoine, F. J., and Petes, T. D. (2006). Recombination between retrotransposons as a source of chromosome rearrangements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA repair* 5, 1010-20.

Miklos, I., Varga, T., Nagy, A., and Sipiczki, M. (1997). Genome instability and chromosomal rearrangements in a heterothallic wine yeast. *Journal of basic microbiology* 37, 345-54.

Morrow, D. M., Connelly, C., and Hieter, P. (1997). "Break copy" duplication: a model for chromosome fragment formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 147, 371-82.

Murphy, H. A., and Zeyl, C. W. (2010). Yeast Sex: Surprisingly High Rates of Outcrossing between Asci. *PLoS ONE* 5, e10461.

Nadal, D., Carro, D., Fernández-Larrea, J., and Piña, B. (1999). Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. *Applied and environmental microbiology* 65, 1688-95.

Neuvéglise, C., Solano-Serena, F., Brignon, P., Gendre, F., Gaillardin, C., and Casarégola, S. (2000). Homologous recombination and transposition generate chromosome I neopolymorphism during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & general genetics : MGG* 263, 722-32.

Oliveira, V. A. et al. (2008). Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaça production. *Applied and environmental microbiology* 74, 693-701.

Pasero, P., and Marilley, M. (1993). Size variation of rDNA clusters in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular & general genetics : MGG* 236, 448-52.

Pataro, C., Guerra, J. B., Petrillo-Peixoto, M. L., Mendonça-Hagler, L. C., Linardi, V. R., and Rosa, C. A. (2000). Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *Journal of applied microbiology* 89, 24-31.

Petes, T. D. (1979). Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 410-4.

Puig, S., Querol, A., Barrio, E., and Pérez-Ortín, J. E. (2000). Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and environmental microbiology* 66, 2057-61.

Pâques, F., and Haber, J. E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 63, 349-404.

Rachidi, N., Barre, P., and Blondin, B. (1999). Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & general genetics* : MGG 261, 841-50.

Robertson, G. P. et al. (2008). Agriculture. Sustainable biofuels redux. *Science* 322, 49-50.

Ruderfer, D. M., Pratt, S. C., Seidel, H. S., and Kruglyak, L. (2006). Population genomic analysis of outcrossing and recombination in yeast. *Nature genetics* 38, 1077-81.

Rustchenko, E. P., Curran, T. M., and Sherman, F. (1993). Variations in the number of ribosomal DNA units in morphological mutants and normal strains of *Candida albicans* and in normal strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 175, 7189-99.

Rustchenko, E. P., and Sherman, F. (1994). Physical constitution of ribosomal genes in common strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1157-71.

Schuller, D., Pereira, L., Alves, H., Cambon, B., Dequin, S., and Casal, M. (2007). Genetic characterization of commercial *Saccharomyces cerevisiae* isolates recovered from vineyard environments. *Yeast* 24, 625-36.

Symington, L. S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 66, 630-70.

Tavares, F. C., and Echeverrigaray, S. (1987). Yeast breeding for fuel ethanol production. In *Biochemistry and molecular biology of industrial yeasts* G. Stewart, I. Russell, R. D. Klein, and R. R. Hiebish (CRC, Boca Raton, Florida), pp. 59-80.

Umezū, K., Hiraoka, M., Mori, M., and Maki, H. (2002). Structural analysis of aberrant chromosomes that occur spontaneously in diploid *Saccharomyces cerevisiae*: retrotransposon Ty1 plays a crucial role in chromosomal rearrangements. *Genetics* 160, 97-110.

Vezinhet, F., Blondin, B., and Hallet, J. (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.

Vezinhet, F., Hallet, J., Valade, M., and Poulard, A. (1992). Ecological Survey of Wine Yeast Strains by Molecular Methods of Identification. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 83-86.

Wang, P., Kim, Y., Pollack, J., Narasimhan, B., and Tibshirani, R. (2005). A method for calling gains and losses in array CGH data. *Biostatistics* 6, 45-58.

Wheals, A. E., Basso, L. C., Alves, D. M., and Amorim, H. V. (1999). Fuel ethanol after 25 years. *Trends in biotechnology* 17, 482-7.

Yamamoto, N., Yamamoto, N., Amemiya, H., Yokomori, Y., Shimizu, K., and Totsuka, A. (1991). Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 358-363.

Yang, Y., Zhang, H., Zhu, J., Wang, G., Tzeng, T., and Xuan, X. (2010). Distinguishing the viability of a single yeast cell with an ultra-sensitive radio frequency sensor. *Lab on a Chip*, 553-555.

Zakharov, I. A. (2005). Intratetrad mating and its genetic and evolutionary consequences. *Genetika* 41, 508-19.