

Ana Teresa Burlamaqui Faraco Antonangelo

Genotipagem de leveduras presentes no
processo industrial de produção de álcool
combustível e estudo do polimorfismo de genes
envolvidos no processo fermentativo em
Saccharomyces cerevisiae

Orientadora: Dra. Débora Colombi

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas
(Genética)

Botucatu - 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Antonangelo, Ana Teresa Burlamaqui Faraco.

Genotipagem de leveduras presentes no processo industrial de produção de álcool combustível e estudo do polimorfismo de genes envolvidos no processo fermentativo em *Saccharomyces cerevisiae* / Ana Teresa Burlamaqui Faraco Antonangelo. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Débora Colombi

Capes: 20200005

1. Álcool – Combustível – Indústria. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Leveduras (Fungos) – Engenharia genética.

Palavras-chave: Biodiversidade de leveduras autóctones; Contaminação da fermentação em usinas de álcool combustível; Genotipagem; Leveduras nativas; Microsatélites; *Saccharomyces cerevisiae*; SNPs.

Dedicatória

***Dedico este trabalho àqueles que são o sol da minha vida:
meu marido Arthur, minhas filhas Ana Carolina e Ana Beatriz e ao
pequeno Arthur que veio pintar meu mundo de cores mais vibrantes.***

Agradecimentos

Agradeço aos meus queridos pais Julieta e Francisco que me ensinaram acima de tudo a amar a Deus e a respeitar ao próximo, assim eu tenho buscado viver.

Agradeço ao meu irmão Francisco pelo afeto, interesse e incentivo.

Agradeço aos meus sogros Aparecidinha e Tatinho pela atenção, incentivo e entusiasmo.

Agradeço aos queridos amigos de uma vida inteira pelo constante apoio e pela torcida: Lourdinha, Sonia, Neca, Tutu, Lula, Rosane e Silvia.

Agradeço à minha querida professora de inglês Mônica Tauffic Rosolem pelo grande incentivo, por ouvir frequentemente meus desabaços e ainda pelas correções e traduções.

Agradeço a todos aqueles sem os quais a realização deste trabalho seria impossível:

Meus orientadores Dra. Débora Colombi e Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla pelos ricos ensinamentos, oportunidades, crédito em mim depositado e principalmente pela acolhida no laboratório, na casa e família de vocês.

Prof^a Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini por toda ajuda, colaboração, dedicação e amizade.

Pessoal do LAMAM, principalmente Vanda e Ana Paula por toda ajuda e pela receptiva acolhida no laboratório todas as vezes que eu precisei.

Prof. Dr. Eduardo Bagagli do Departamento de Microbiologia e Imunologia IB-Unesp-Botucatu/SP, pela amizade, incentivo, torcida e ainda pela cepa de isolado clínico.

Prof. Marcos Antônio de Moraes Silva Jr. do Depto. Genética-Centro de Ciências Biológicas-Universidade Federal de Pernambuco, pelas cepas de levedura.

Prof.^a Tania Maria Bordin Bonfim- Lab. de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, Setor de Ciências da Saúde- Universidade Federal do Paraná por ter cedido a cepa de levedura de vinho.

Prof. Mário Henrique Barros do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, pela cepa laboratorial W303.

Dr. Marco Antonio de Castro e Souza (CTC) pelas amostras de levedura.

Prof^a. Dra. Maria da Graça Stupiello Andrietta pelas valiosas contribuições.

Prof^a. Dra. Cláudia Aparecida Rainho pelas sugestões e por disponibilizar aparelhos de seu Laboratório de Epigenética do Depto. de Genética IB-Unesp-Botucatu/SP, também agradeço as suas alunas: Daniela, Érika, Joana e Mariana por me receberem tão bem todas as vezes que eu precisei.

A Genotyping Biotecnologia por ter cedido reagentes, cepas de levedura e disponibilizado aparelhos.

Ao Rodrigo (Smurf) e Amanda por toda ajuda, incentivo e socorros de última hora.

Aos proprietários e microbiologistas das Usinas por cederem amostras de vinho e/ou permitirem a coleta em suas unidades, principalmente ao Sr. Carlos Dinucci proprietário da Usina São Manoel, à Miriam Roberta Henrique bióloga da Usina São Manoel e à Maria Angélica Garcia bióloga da Usina Santa Adélia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos a mim concedida.

Agradeço imensamente a todos os colegas de bancada do PANGENE pela gostosa convivência e pela infinita ajuda:

Aline Angella pela doçura e bondade, Aline Bronzato pela alegria, Carine pelas dicas e lições de informática, Giovana pela amizade, dicas de formatação, por me abastecer com as novidades do mundo lá fora e pela companhia mesmo que isso significasse ficar até tarde da noite no laboratório, Leticinha pelas “consultas e prescrições médicas” e pelas risadas, Letícia Oda pelo carinho e atenção, Lina pela simpatia, Melina pela atenção e “socorros” no Real –Time.

Um agradecimento especial ao casal Alonso (Letícia e Diego) por todo carinho, amizade, dedicação, contribuição, ajuda e principalmente pelos ensinamentos.

Todos vocês me fazem renovar as esperanças no ser humano, vou levar vocês para sempre no coração.

Enfim agradeço a todos os docentes, funcionários e alunos do Departamento de Parasitologia pela agradável convivência.

Por fim agradeço ao amor da minha vida, Arthur por todo amor e cumplicidade destes 34 anos.

Às minha queridas filhas Ana Carolina e Ana Beatriz agradeço por uma vida inteira de alegrias, à Carolina e ao meu genro George ainda agradeço por terem me dado o presente mais precioso da minha vida: o meu netinho Arthur.

Para todos vocês:

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa só: leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo.”

Antonie Saint Exupéry.

Epígrafe

**“Aprendi com as Primaveras a me deixar cortar para poder
voltar sempre inteira.”**

Cecília Meireles

Resumo

O Brasil é atualmente o maior produtor mundial de álcool de cana de açúcar, sendo responsável por uma produção anual de aproximadamente 27 bilhões de litros. O álcool é produzido através da fermentação do caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço por células de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Embora, atualmente, muitas indústrias utilizem cepas selecionadas de *S. cerevisiae* como iniciadoras, a condição não estéril dos substratos torna este processo sujeito a constantes contaminações por bactérias e linhagens de leveduras nativas de *Saccharomyces cerevisiae* e não-*Saccharomyces cerevisiae*. Estas leveduras nativas dominam rapidamente a população iniciadora do processo por serem cepas genética e fisiologicamente adaptadas às condições daquele ambiente. Tais leveduras podem prejudicar o processo fermentativo, porém, algumas entre elas, podem apresentar características positivas. Atualmente no Brasil várias indústrias acompanham a dinâmica populacional da fermentação por cariotipagem. No entanto este método é dispendioso, demorado e pouco acurado quando se compara a outros métodos moleculares mais sensíveis. Este trabalho se propõe a utilizar a técnica de PCR microssatélite para diferenciar linhagens de leveduras presentes no processo de fermentação em usinas de álcool, acompanhar a dinâmica populacional de uma usina durante uma safra e estudar a diversidade genética e a estrutura populacional das cepas nativas presentes no processo industrial de produção do álcool combustível. O trabalho também visa investigar a presença de *single nucleotide polymorphism* (SNP) ou mutações de base única nas cepas nativas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas deste processo e relacioná-los à capacidade de floculação e à tolerância ao ambiente industrial estressante. Durante o trabalho 24 *loci* microssatélites foram testados entre os quais 12 foram polimórficos e capazes de diferenciar as cepas selecionadas comerciais de etanol (BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1) entre si e estas das cepas nativas. Quatro *loci* foram selecionados para monitorar a safra da Usina São Manuel durante 2008, onde se observou a presença de 10 perfis diferentes de leveduras nativas durante a safra. Com o intuito de investigar a diversidade entre as cepas autóctones por marcadores microssatélites, 138 colônias isoladas de várias unidades industriais e identificadas como *S. cerevisiae* via amplificação da região ITS foram testadas por um painel de 12 oligonucleotídeos (H, P1, P2, P3, P4, P7, P8, P9, P10, C5, C11 e C12). Setenta e sete cepas que apresentaram um perfil único de amplificação para pelo menos um dos *loci* foram utilizadas para a construção de uma árvore fenética que mostrou uma grande diversidade genética entre as cepas nativas e seu arranjo na árvore parece estar de acordo com o local e época em que foram coletadas. Para o estudo dos SNPs foram sequenciados os genes *FLO1*, *MSS11* e *FLO8* relacionados à floculação nas cepas que apresentaram fenótipos floculantes e não floculantes. Assim como foram sequenciados *ASR1* e *FPS1* nas cepas de fenótipos extremos para alta e baixa tolerância ao pH baixo e ao etanol e *GPD1* e *GPD2* nas cepas de fenótipo extremo para alta e baixa tolerância à glicose. O alinhamento destes sequenciamentos revelou a presença de SNPs entre as cepas nativas isoladas. Embora a maioria deles não possa ser relacionada aos traços fenotípicos investigados, um dos SNPs encontrado dentro do gene *FPS1* parece ser promissor para característica de tolerância ao etanol.

Palavras chave: *Saccharomyces cerevisiae*, leveduras nativas, genotipagem, microssatélites, contaminação da fermentação em usinas de álcool combustível, biodiversidade de leveduras autóctones, SNPs.

Abstract

Brazil is the major world producer of ethanol from sugar cane, producing about 27 billion liters of ethanol a year. Alcohol is the result of sugar cane juice/ molasses fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. Although many sugar mills in Brazil currently start the fermentation process by inoculating selected *Saccharomyces cerevisiae* commercial strains, it often occurs the incoming of bacteria, native *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast strains because of its unsterile condition. In this process these indigenous strains outnumber the population inoculated and those which are genetically and physiologically better adapted tend to dominate. These strains may either show desirable fermentative qualities or not. The method currently used in Brazil to investigate sugar cane must population is electrophoresis karyotyping, however this method is expensive, time consuming and not very accurate when compared with other more sensitive molecular methods. This work aimed at using microsatellite PCR method for differentiating yeasts strains from alcohol plants fermentation process, monitoring population dynamic of a bioethanol fuel plant during a harvest season and studying the genetic diversity and population structure of native strains from bioethanol production industrial process. This work also aimed at investigating SNPs occurrence among *Saccharomyces cerevisiae* native strains that could be related with flocculation and stressful industrial environment tolerance. Twenty- four microsatellite *loci* were tested and 12 of them were polymorphic and capable of differentiating the commercial selected strains BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1 from each other and also capable of screening indigenous strains from the inoculated ones. Four *loci* were used for monitoring Usina São Manoel harvest season during 2008 where were observed 10 microsatellite profiles among native yeast strains. In order to investigate the diversity among the autochthone strains by using microsatellite markers, 138 colonies from various industrial plants were screened from *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* strains through rRNA ITS region amplification. All of them were tested by a panel of 12 primers (H, P1, P2, P3, P4, P7, P8, P9, P10, C5, C11 e C12). Seventy-seven strains showing unique amplification profile for at least one marker were used to build a phenetic tree, which showed that the genetic diversity among the strains is huge and its arrangement is correlated to place of origin and collection year. For SNPs study *FLO1*, *MSS11* and *FLO8* genes related to flocculation in strains with flocculent and non-flocculent phenotypes were sequenced. *ASR1* and *FPS1* genes were sequenced in strains with high and low ethanol and acid pH tolerance phenotypes. *GPD1* e *GPD2* genes were sequenced in strains with high and low glucose tolerance phenotypes. These sequencing alignments revealed the presence of SNPs among native strains. Although, most of them cannot be related to the phenotypic traits investigated, one of them, a polymorphism found within the *FPS1* gene seems to be promising feature for ethanol tolerance.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, native yeast strains, genotyping, microsatellite PCR method, contamination of fermentation at bioethanol plants, autochthone yeasts biodiversity, SNPs.

Lista de Figuras

Figura 1. Perfil eletroforético das cepas selecionadas comerciais amplificadas por 11 marcadores microssatélites.....	25
Figura 2 . Mapa da localização da Usina São Manoel.	26
Figura 3. Análise da amplificação dos <i>loci</i> A e C em cepas de leveduras isoladas do processo fermentativo numa unidade sucroalcooleira.	26
Figura 4. Distribuição da população de leveduras durante o processo fermentativo da Usina São Manoel em 2008 analisado por 4 marcadores microssatélites.	27
Figura 5. Mapa da localização das unidades industriais onde as cepas de leveduras foram isoladas.....	28
Figura 6. Análise da amplificação da região ITS do rDNA das colônias isoladas.....	29
Figura 7. Resultado do sequenciamento da região ITS do rDNA.....	30
Figura 8. Perfil eletroforético das amplificações das cepas selecionadas por 7 marcadores microssatélites.	31
Figura 9. Perfil eletroforético das amplificações das cepas selecionadas por 5 marcadores microssatélites.	31
Figura 10. Análise da amplificação dos 12 <i>loci</i> microssatélites nas cepas selecionadas comerciais BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1, em eletroforese de capilar	33
Figura 11. Análise em gel de agarose da amplificação dos <i>loci</i> P3 e H em algumas cepas de <i>S. cerevisiae</i> nativas isoladas da Usina São Manoel em 2009.	34
Figura 12. Análise da amplificação do <i>Loci</i> H em algumas cepas nativas e na cepa PE-2. Análise em sistema eletroforese de capilar.....	37
Figura 13. Árvore fenética construída com o algoritmo de agrupamento UPGMA com base nos resultados da análise de microssatélite.....	39
Figura 14. Matriz de diferenciação genética (<i>FST pairwise</i>) de 7 populações de <i>S. cerevisiae</i> calculado a partir do método da estatística F no <i>software</i> Arlequin v.3.1.1.	40
Figura 15. Gráfico das probabilidades logarítmicas LnP (D) como uma função de K.....	41
Figura 16. Resultado da análise Bayesiana em 65 indivíduos usando 11 <i>loci</i> microssatélites.....	42
Figura 17. Gráfico de barras originado pelo STRUCTURE considerando K=6.....	43
Figura 18. Análise dos fragmentos dos genes de interesse amplificados nas cepas selecionadas de etanol: BG-1 (B), CAT-1 (C), PE-2 (P) e SA-1 (S)..	57
Figura 19. Alinhamento de região da sequência codificante do gene ASR1 nas cepas BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1 comparadas com a cepa referência S288c.....	58
Figura 20. Gráfico da porcentagem de células viáveis em função da concentração de álcool no meio.	63
Figura 21. Representação gráfica do alinhamento de regiões do gene <i>ASR1</i> amplificado em linhagens nativas mais e menos tolerantes ao etanol.....	67
Figura 22. Representação gráfica do alinhamento de porção da proteína Fps1p e do gene <i>FPS1</i> amplificado nas linhagens mais e menos resistentes ao etanol.....	68
Figura 23. Representação gráfica do alinhamento de porção do gene <i>GPD2</i> amplificado nas cepas mais tolerantes e menos tolerantes as altas concentrações de glicose.	69
Figura 24. Representação gráfica do alinhamento de porção do gene <i>MSS11</i> amplificado em linhagens floculantes e não floculantes. de aminoácidos do polipeptídeo.....	70
Figura 25. Representação gráfica do alinhamento de porção do gene <i>FLO8</i> amplificado em linhagens floculantes e não floculantes.	71

Figura 26. Representação gráfica do alinhamento de trecho do gene <i>FL01</i> amplificado em linhagens floculantes e não floculantes.	71
Figura 27. Representação da discriminação alélica de ensaio TaqMan para o SNP do nucleotídeo 1552 do gene <i>FPS1</i>	73

Lista de Tabelas

Tabela 1- Cepas de <i>Saccharomyce cerevisiae</i> oriundas de vários processos fermentativos, local de isolamento, período e coleção.	20
Tabela 2- Populações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nativas estudadas.....	24
Tabela 3-Lista de cepas analisadas por marcadores microssatélites.....	35
Tabela 4- Média das probabilidades obtidas para cada uma das 5 corridas feitas por K.....	41
Tabela 5 - Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas e suas respectivas coleções.....	50
Tabela 6- Pannel de oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos gênicos das sequências codificantes selecionadas para estudo dos SNPs nas diversas cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
Tabela 7-Teste de tolerância das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio com várias concentrações de etanol.	59
Tabela 8- Teste de tolerância ao etanol em meio líquido	62
Tabela 9- Teste de tolerância das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio com vários valores de pH.....	64

Lista de Abreviaturas

A: base nitrogenada adenina.

ASR1: *alcohol sensitive RING/PHD finger*

BG-1: cepa de levedura isolada da Usina Barra Grande

C: base nitrogenada citosina.

CAT-1: cepa de levedura isolada da Usina Catanduva

DNA: ácido desoxirribonucleico.

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

FLO1 e *FLO8*: genes da família gênica FLO que codificam floculinas

G: base nitrogenada guanina.

GPD1 e *GPD2*: gene glicerol-3-fosfato desidrogenase.

ha: hectare

ITS: região espaçadora transcrita interna

m/v: massa/volume

N: Nitrogênio

Pb: pares de bases

PE-2: cepa de levedura isolada da Usina da Pedra

Pop: população

rDNA: DNA ribossômico

SA-1: cepa de levedura isolada da Usina Santa Adélia

SNP: mutação de base única

T: base nitrogenada timina.

TAE 1X: Tris acetato EDTA- Tris acetato 40 mM e EDTA 1 mM.

TE: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM.

Ton: tonelada

UDOP: União dos Produtores de Bioenergia

UFC: unidade formadora de colônia

UNICA: União da Indústria de Cana-de-açúcar

v/v: volume/volume.

WLN: (Wallerstein Laboratory Nutrient ágar): 4% (m/v) extrato de levedura, 5 % (m/v) triptona ou peptona, 50% (m/v) dextrose ou glicose, 0,55% (m/v) KH_2PO_4 , 0,425% (m/v) KCl , 0,125% $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,125% (m/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,0025% (m/v) $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,0025% (m/v) MnSO_4 , 0,022% (m/v) verde de bromocresol, 15% (m/v) ágar bacteriológico. pH 5,5 corrigido com HCl 1M.

YPD: 1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona, 2% (m/v) glicose.

YPD-ágar: 1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona, 2% (m/v) glicose, 2% ágar.

χ^2 : Qui-quadrado

Sumário

1. Introdução geral.....	14
2. Objetivos gerais.....	17
Capítulo I.....	18
3. Microssatélites.....	18
3.1 INTRODUÇÃO.....	18
3.2 OBJETIVOS.....	19
3.2.1 <i>Objetivos gerais</i>	19
3.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	19
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.3.1 <i>Material</i>	19
3.3.2 <i>Métodos</i>	21
3.3.2.1 <i>Obtenção de colônias isoladas</i>	21
3.3.2.2 <i>Preservação das amostras</i>	21
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.4.1 <i>Construção do perfil de bandas de 11 loci microssatélites</i>	25
3.4.2 <i>Monitoramento da população de leveduras na Usina Açucareira São Manoel SA durante a safra de 2008 utilizando marcadores microssatélites</i>	25
3.4.3 <i>Estudo da diversidade populacional de leveduras nativas em vinho fermentado de cana de açúcar em diversas unidades industriais</i>	28
3.4.4 <i>Análise das populações de leveduras por marcadores microssatélites</i>	30
3.4.5 <i>Construção do perfil de bandas de 13 marcadores microssatélites em gel de agarose</i> ..	30
3.4.6 <i>Construção do perfil de bandas dos marcadores microssatélites em sistema de eletroforese de capilar</i>	32
3.4.7 <i>Análise da biodiversidade</i>	38
3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
Capítulo II.....	45
4. SNPs	45
4.1 INTRODUÇÃO.....	45
4.2 OBJETIVOS.....	49
4.2.1 <i>Objetivos gerais:</i>	49
4.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	49
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.3.1 <i>Material</i>	49
4.3.2 <i>Métodos</i>	51
4.3.2.3 <i>ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR ELETROFORESE</i>	54
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.4.1 <i>Amplificação dos fragmentos gênicos de interesse</i>	56
4.4.2 <i>Sequenciamento e alinhamento dos fragmentos amplificados</i>	58
4.4.3 <i>Caracterização das cepas nativas quanto às condições estressantes do meio</i>	58
4.4.4 <i>Relação dos marcadores SNPs e fenótipo</i>	66
4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
5. Referências.....	74
APÊNDICE A-.....	82

1. Introdução geral

Nações de todo o mundo têm concentrado esforços para promover o uso de fontes renováveis de energia por motivos econômicos e ambientais (Robertson *et al.*, 2008). Entre todos os combustíveis alternativos, o mais viável atualmente, sob este ponto de vista é o etanol porque sua produção é baseada em uma plataforma tecnológica bem estabelecida (Goldemberg, 2007). Entre todos os substratos, o etanol de cana-de-açúcar é o que tem maiores chances de participar substancialmente da matriz energética planetária. A cana-de-açúcar é a segunda maior fonte de energia renovável do Brasil com 12,6% de participação na matriz energética atual, considerando-se o álcool combustível e a co-geração de eletricidade a partir do bagaço (www.biodieselbr.com).

O Brasil é o maior produtor de álcool de cana-de-açúcar do mundo contando atualmente com mais de 437 unidades produtoras (Amorim *et al.*, 2011) espalhadas principalmente na região Centro-Sul do país. Na safra 2007/08, o Brasil colheu quase 500 milhões de toneladas de cana-de-açúcar de uma área plantada de 5,8 milhões de hectares (UNICA, 2009) e produziu 31 milhões de toneladas de açúcar e 24,5 bilhões de litros de álcool, equivalente a 37,3% da produção mundial de etanol (UDOP, 2009; UNICA, 2010). No entanto, na safra de 2011 devido ao clima, com ocorrência de geadas e estiagem prolongada no inverno e a menor renovação do canavial, resultado da crise econômica, houve uma queda de 10,23% em relação ao volume de cana processado no mesmo período de 2010 (544,12 milhões de toneladas), assim, a moagem de cana-de-açúcar pelas unidades produtoras da região Centro-Sul do Brasil atingiu 493,264 milhões de toneladas até o final desta safra. Na safra de 2011/2012 até abril, foram produzidos 22,648 bilhões de litros de etanol, sendo 8,593 bilhões de litros de álcool anidro e 14,055 bilhões de litros de hidratado (UNICA, 2012). O Estado de São Paulo é o maior produtor de cana com uma área de 4,45 milhões ha disponíveis para colheita, representando mais que 60% de toda área de cana da região centro-sul (UNICA, 2012).

A expectativa do setor sucroalcooleiro é de até 2020 dobrar a produção, de 555 milhões de toneladas de cana para 1,2 bilhão de toneladas. Com a recente abertura do mercado americano para o biocombustível nacional, os números pressupõem o aumento das exportações de 1,5 bilhão para 13,5 bilhões de litros de etanol para os Estados Unidos (UNICA, 2011).

O álcool é o resultado da fermentação do açúcar presente no caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço através de células de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* que transformam a sacarose em etanol por meio de reações químicas mediadas por enzimas. Assim sendo, a melhora na eficiência da fermentação, etapa central desse processo, permite um grande aumento na produção de etanol. No entanto, poucos estudos têm sido direcionados para o desenvolvimento desta área. Na década de 70 o sucesso do Proálcool se deu, em grande parte, aos avanços dos estudos feitos em fermentação (Furtado & Scandiffio, 2007).

Atualmente, muitas indústrias alcooleiras utilizam como iniciadoras do processo fermentativo cepas de *S. cerevisiae* que foram previamente isoladas de unidades brasileiras, por apresentarem alta eficiência na fermentação e serem bem adaptadas ao ambiente industrial durante o período da safra. Estas leveduras recebem o nome de leveduras selecionadas e sua seleção foi feita através de cariotipagem de processos fermentativos industriais de produção de etanol das usinas Barra Grande (BG-1 Copersucar), Catanduva (CAT-1 -Fermentec/ESALQ), Usina da Pedra (PE-2 -Fermentec/ESALQ) e Santa Adélia (SA-1-Copersucar)(Reis, 2011; Basso *et al.*, 2008). Atualmente, estas leveduras são produzidas em grandes volumes e fornecidas por unidades produtoras de biomassa. Porém, a condição não estéril dos substratos que alimentam as dornas de fermentação (melaço e/ou caldo de

cana) torna a fermentação etanólica industrial um processo sujeito a constantes contaminações por bactérias e linhagens de leveduras nativas *Saccharomyces cerevisiae* e não-*Saccharomyces cerevisiae*. Estas leveduras nativas dominam rapidamente a população iniciadora do processo por serem cepas genética e fisiologicamente adaptadas às condições daquele ambiente (Howell *et al.*, 2004; Silva-Filho *et al.*, 2005b; Cunha *et al.*, 2006) e podem acarretar grandes prejuízos para o setor pois causam problemas como: aumento do açúcar residual do vinho; queda de viabilidade celular devido às toxinas excretadas no meio; formação de espuma (causa extravasamento do mosto da dorna); floculação do fermento que acarreta perda de células de levedura pelo fundo da dorna ou na centrífuga e queda no rendimento industrial, pois, ocorre a formação dos grumos ou células em cacho que diminuem a superfície de contato das células do interior do cacho com o substrato; formação de pseudohifas e outros problemas operacionais (Amorim *et al.*, 1982, Amorim *et al.*, 2004; Silva Filho *et al.*, 2005b; Andrietta *et al.*, 2007, Figueiredo, 2008).

Os prejuízos causados pela redução de 5% no rendimento da fermentação representam 25.000 L/ dia de etanol a menos em uma unidade que produz 100 milhões de litros/ safra e 0,5% de açúcares não fermentados no vinho representa 5 toneladas de açúcar perdido a cada 8 h para uma dorna de 1000 m³ (Lopes, 2010). Cada 1% de perda representa prejuízo financeiro de 1 milhão de reais para cada milhão de tonelada de cana moída. Para contornar estes problemas é necessário que a indústria aumente o uso de insumos como antibióticos e antiespumantes gerando prejuízos (Fermentec, 2007). Portanto, combater e controlar estes microrganismos contaminantes são uma das principais preocupações da indústria sucroalcooleira. Segundo Stroppa e colaboradores (2003) uma das melhores maneiras de resolver este problema é monitorar a fermentação alcoólica através do emprego de técnicas de identificação que permitam distinguir diferentes cepas de levedura.

Os sistemas clássicos de identificação de leveduras baseiam-se em características morfológicas e fisiológicas e são incapazes de distinguir facilmente algumas espécies e, sobretudo cepas de uma mesma espécie (Stroppa *et al.*, 2003), além de demandar um grande período de tempo para a obtenção dos resultados.

Entre os sistemas de seleção morfológica os meios de cultura seletivos e diferenciais têm sido utilizados com o objetivo de selecionar e diferenciar leveduras de processos fermentativos. Entre eles, o meio diferencial WLN o qual contém um indicador de pH, o verde de bromocresol, que colore diferencialmente colônias como resultado dos graus variáveis de afinidade entre os microrganismos e o corante (Stroppa *et al.*, 2003; Reis, 2011). Stroppa e colaboradores (2003) utilizaram com sucesso o WLN para avaliação da diversidade de leveduras em usinas de açúcar e álcool brasileiras e relataram que colônias de cepas *S. cerevisiae* de mesma morfologia analisadas por cariotipagem e por testes de eficiência de fermentação obtiveram o mesmo perfil cromossômico e mesmo desempenho fermentativo.

No mundo todo, diferentes métodos de análise já foram empregados para monitorar a população das cepas de levedura, principalmente durante o processo de fermentação do vinho. Entre eles estão a cariotipagem cromossômica (Vezinhet *et al.*, 1990 ; van Der Westhuizen & Pretorius, 1992 e Kishimoto *et al.*, 1994), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) do DNA genômico e mitocondrial (Querol *et al.*, 1992, Granchi *et al.*, 1999 e Santamaría *et al.*, 2005), *randomly amplified polymorphic DNA* (RAPD) (Lavallieé *et al.*, 1994 e de Barros Lopes *et al.*, 1998), *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) (de Barros Lopes *et al.*, 1999), *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) (Mills *et al.*, 2002, Nielsen *et al.*, 2005 e Manzano *et al.*, 2006), tipagem de ITS (Capello *et al.*, 2004), tipagem por microssatélites (Field & Wills, 1998, González Techera *et al.*, 2001;

Howell *et al.*, 2004 e Masneuf-Pomarède, 2007), *single nucleotide polymorphism* (SNP) e *fluorescence in situ hybridisation* (FISH) (Xufre *et al.*, 2006).

Para o monitoramento microbiológico de usinas produtoras de álcool combustível, o primeiro trabalho feito no Brasil utilizando marcadores moleculares para discriminar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foi realizado em indústrias do Nordeste por Silva-Filho e colaboradores (2005b) que utilizaram a técnica de *PCR-fingerprinting* baseado em oligonucleotídeo contendo um microssatélite (GTG)₅. O método utilizado foi capaz de discriminar cepas utilizadas para produção de vinho e cerveja, além de diferenciar cepas e espécies de leveduras daquelas inoculadas como iniciadoras. Estes autores consideram esta técnica bastante rápida e precisa para discriminar linhagens de leveduras, levando em torno de oito horas pra se concluir a análise (Silva-Filho, 2003). Mais recentemente, Basílio *et al.* (2008) também monitoraram a fermentação de algumas destilarias no Nordeste brasileiro através do mesmo método de *PCR-fingerprinting*.

No Brasil, atualmente diversas indústrias fazem acompanhamento da contaminação do mosto através de cariotipagem por eletroforese de campo pulsado (Fermentec, 2008). No entanto, este é um método caro e demorado, pois exige grande volume de DNA para o processamento da amostra. Além disso, o alto polimorfismo cromossômico observado em linhagens industriais devido a rearranjos mitóticos em resposta ao estresse causado pelo processo de fermentação pode originar produtos que migrem em diferentes posições em relação às bandas parentais, dificultando a interpretação dos resultados (Lucena, 2004; Silva-Filho, 2005a).

Não há relatos de que se tenha utilizado no Brasil em leveduras de produção de álcool carburante monitoramento da fermentação em destilarias por meio de PCR microssatélites, método amplamente utilizado na Europa para monitorar fermentação do mosto de uva para produção de vinhos. Nem tão pouco se tem conhecimento do estudo de biodiversidade populacional por meio de *single nucleotide polymorphism* (SNP).

2. Objetivos gerais

Utilização de microssatélites para a discriminação rápida e eficiente de cepas de leveduras presentes no caldo de cana de açúcar em fermentação durante o processo de produção de álcool combustível e a busca de marcadores genéticos (SNPs) para características de tolerância à altas concentrações de álcool, glicose, ao pH baixo e floculação.

Capítulo I

3. Microssatélites

3.1 Introdução

Os microssatélites, também conhecidos por *simple sequence repeats* (SSR) ou *short tandem repeats* (STR), são regiões do DNA compostas por motivos pequenos de nucleotídeos repetidos *em tandem* e que se encontram espalhados no genoma dos procariotos e eucariotos (Buschiazzi & Gemmel, 2006). Essas repetições são provavelmente consequência de “escorregadas” (*slippage*) durante a replicação do DNA (Field & Wills, 1998), recombinação desigual ou alinhamento incorreto das fitas de DNA (Salles *et al.*, 2003 Embrapa).

Os microssatélites são classificados de acordo com número de motivos repetidos como mono, di, tri, tetra (os mais comuns) penta e hexanucleotídeos e também de acordo com o tipo de sequência repetida, como perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos (Oliveira *et al.*, 2006).

Os microssatélites possuem taxas de mutação mais altas (10^{-2} a 10^{-6}) que o resto do genoma (Ellegren, 2004; Oliveira *et al.*, 2006) e são flanqueados por sequências únicas, conservadas e por isso podem ser amplificados através de PCR, o que faz deles ótimos marcadores moleculares.

O uso de marcadores microssatélites nas análises genéticas oferece inúmeras vantagens em relação a outros tipos de marcadores (RFLP, RAPD, AFLP): eles são altamente informativos (Salles *et al.*, 2003); são de herança co-dominante (Perez *et al.*, 2001) o que permite a discriminação entre homozigotos e heterozigotos; são multialélicos; ocorrem abundantemente no genoma dos eucariotos; são baseados em PCR, portanto, exigem uma pequena quantidade de DNA; são altamente reprodutíveis; estão bem dispersos nos genomas, em regiões codificadoras e não codificadoras (Salles *et al.*, 2003). São fáceis de tipar e acurados, além disso, seus altos níveis de polimorfismo e sua vasta distribuição no genoma fazem dos loci microssatélites uma atrativa fonte de informação sobre a história das populações e processos evolucionários (Wilson & Balding, 1998).

Os primeiros ensaios de genotipagem por microssatélites em leveduras foram feitos no final da década de 90 para identificar cepas laboratoriais de *Saccharomyces cerevisiae*. Mais recentemente eles têm sido usados para identificar cepas industriais e cepas patogênicas desta mesma espécie (Richard *et al.*, 2008).

O genoma da *Saccharomyces cerevisiae* possui microssatélites em abundância que estão distribuídos de maneira não uniforme ao longo dos seus 16 cromossomos (Richard & Dujon, 1996; Field & Wills, 1998; Gallego *et al.*, 1998; Richard *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2000; Richard *et al.*, 2008) e no DNA mitocondrial (Skelly & Clark-Walker, 1991). Os loci microssatélites de leveduras apresentam um alto grau de variabilidade (Field *et al.*, 1996; Kruglyak *et al.*, 2000) e podem ter uma importante aplicação nas análises genéticas destes eucariotos, como por exemplo na caracterização e discriminação entre linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (Baleiras Couto *et al.*, 1996; Field & Wills 1998; Gallego *et al.*, 1998; Hennequin *et al.*, 2001).

Estudos realizados em 2001 (Perez *et al.*, 2001) utilizaram 10 pares de oligonucleotídeos para a amplificação de microssatélites no genoma de *S. cerevisiae* e encontraram 44 genótipos diferentes. Diversos estudos foram feitos com o intuito de acessar a população de leveduras do processo de fermentação de vinhos, cervejas e pães utilizando microssatélites como marcador genético (Field &

Wills, 1998, González-Techera *et al.*, 2001; Howell *et al.*, 2004 e Masneuf-Pomarède, 2007, Legras *et al.*, 2007), embora nenhum tenha sido feito no Brasil.

Por ser um método simples, econômico, eficiente e principalmente rápido, a utilização dos marcadores microssatélites para análise da diversidade de cepas de leveduras presentes no processo fermentativo das usinas de álcool combustível pode ser de grande interesse para o setor, pois as intervenções se necessárias, podem ser feitas mais rapidamente.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivos gerais

- ✓ Isolar e selecionar cepas nativas de *S. cerevisiae* do processo fermentativo;
- ✓ Testar microssatélites que sejam capazes de discriminar leveduras nativas presentes na produção de álcool combustível.

3.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Monitorar a dinâmica da população de leveduras durante uma safra em uma unidade industrial utilizando microssatélites;
- ✓ Realizar estudo da diversidade genética e da estrutura populacional de leveduras autóctones de várias unidades industriais através de análise multi-*loci* utilizando marcadores microssatélites.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Material

Periodicamente amostras de vinho (mosto fermentado de cana de açúcar) e ocasionalmente amostras de mel e caldo foram coletadas na Usina Açucareira São Manoel SA (São Manuel, SP) durante a safra de 2008 e 2009. Na Usina Santa Adélia SA (Jaboticabal, SP) somente amostras de vinho foram coletadas durante a safra de 2009 e 2010.

Outras cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 1:

Tabela 1- Cepas de *Saccharomyce cerevisiae* oriundas de vários processos fermentativos, local de isolamento, período e coleção.

Cepa	Procedência/ Período	Coleção
RP10.1; RP10.2; RP10.3... RP10.14; RP11.4.1; RP.11.4.5; RP.11.4.11; RP11.4.14	Usina Rio Pardo (Avaré, SP)/ 2010 e 2011	Genotyping Biotecnologia Ltda.
M1.1; M9.1; M.14.1	Indústria de Bebidas Muller (Pirassununga, SP)/ 2010 e 2011	Genotyping Biotecnologia Ltda.
VF8	Usina São João (Araras, SP)	Prof. ^a Sandra Regina Ceccato Antonini – Depto. Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural (DTAiSER)- Centro de Ciências Agrárias (CCA), UFSCar, Araras.
CTC001; CTC002; CTC003; CTC005; CTC007; CTC008; CTC013 e CTC016	Várias unidades industriais	CTC (Centro de Tecnologia Canavieira)
P1; P1a; P6; P25 e JP1	Isolados de destilarias do estado de Pernambuco	Prof. Marcos Antônio de Moraes Silva Jr. – Depto. Genética- Centro de Ciências Biológicas- Universidade Federal de Pernambuco
BG-1; CAT-1; PE-2 e SA-1	Cepas selecionadas comerciais de etanol	Usina São Manoel
CK-1	Cepa comercial de vinho	Prof. ^a Tania Maria Bordin Bonfim- Lab. de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, Setor de Ciências da Saúde- Universidade Federal do Paraná.
SO4	Cepa comercial de cerveja	Adquirida no comércio local
W303 α/a	Cepa laboratorial	Prof. Mário Henrique Barros- Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP.
Itaiquara	Cepa comercial de panificação	Adquirida no comércio local
Isolado de exsudato de pele humana	Coletado no HC - Faculdade de Medicina de Botucatu	Prof. Eduardo Bagagli do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IB- UNESP- Botucatu

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Obtenção de colônias isoladas

3.3.2.1.1 Diluição do vinho

Um mililitro de cada amostra de vinho utilizada no estudo foi diluída seriadamente 10X em 9 mL de solução salina estéril 0,85% (m/v) (0,85 g de NaCl em 100 mL de água destilada).

3.3.2.1.2 Plaqueamento em meio WLN

Para o isolamento e identificação morfológica adequada das colônias, alíquotas de 100 µL das amostras de vinho sem diluição e das diluições de 10^{-5} até 10^{-8} foram semeadas com auxílio de alça de Drigalsky em placas contendo o meio diferencial WLN-ágar (Acumedia, USA) acrescido de cloranfenicol [50 µg/mL] e ácido nalidíxico [50 µg/mL] para inibir o crescimento de bactérias. Foram feitas triplicatas de cada diluição. As placas foram incubadas invertidas a 30°C por 48 h, quando foi feita a primeira contagem de colônias e suas características morfológicas anotadas. As placas foram incubadas novamente por mais 96 horas para observar o crescimento de leveduras que demoram mais a crescer. Das placas de diluição 10^{-6} e/ou 10^{-7} foram selecionadas 15 colônias isoladas de acordo com a morfologia apresentada (cor, formato de bordas e textura) para extração do DNA.

3.3.2.1.3 Plaqueamento em meio YPD

As colônias selecionadas foram semeadas em placas de petri contendo meio YPD-ágar [1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona, 2% (m/v) glicose e 2% (m/v) ágar bacteriológico] acrescido de cloranfenicol [50 µg/mL] e ácido nalidíxico [50 µg/mL]. As placas foram incubadas a 30° C de 24 a 72 h e mantidas a 4° C.

3.3.2.2 Preservação das amostras

3.3.2.2.1 Preservação de amostra do vinho

Alíquotas de 1 mL do vinho foram acrescidas de 9 mL de solução salina 0,85% (m/v) estéril centrifugadas e a 4000x g por 4 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e a operação foi repetida. Os pellets resultantes foram transferidos para microtubos, ressuspensos em 1 mL de caldo YPD contendo 15% glicerol estéril (v/v), ligeiramente agitados em vórtex, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80° C.

3.3.2.2.2 Preservação das colônias nativas isoladas como cultura permanente

As colônias selecionadas pela diferença de morfologia em WLN e mantidas em YPD sólido foram inoculadas em tubos estéreis contendo 3 mL de caldo YPD, incubadas a 30° C sob agitação de 185 r.p.m. por 12 ou 16 horas. Após este período os tubos foram centrifugados a 4000 x g por 4 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet resultante foi lavado com 9 mL de solução salina 0,85% estéril. Os tubos foram novamente centrifugados a 4000 x g por 4 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Uma nova lavagem seguindo os mesmos parâmetros foi feita e os pellets resultantes foram transferidos para microtubos, ressuspensos em 1 mL de caldo YPD contendo 15% glicerol estéril (v/v), agitados em vórtex, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80° C.

3.3.2.3 Obtenção do DNA das leveduras

Para a obtenção do DNA das leveduras isoladas e de todas as cepas testadas durante este trabalho foi utilizado o método proposto por Howell e colaboradores (2004) ou resina *Chelex*® *GradeMolecular Biology Resin* (Bio-Rad Laboratories).

3.3.2.3.1 Método do congelamento e fervura proposto por Howell e colaboradores (2004) com algumas adaptações.

Uma colônia de levedura isolada em meio sólido foi coletada com um palito estéril, transferida para micro tubo estéril contendo 50 µL de água ultra pura autoclavada, homogeneizada vigorosamente por 15s com o auxílio de um vórtex e centrifugada à velocidade máxima por 15 segundos. A seguir cada amostra foi mantida em freezer -80° C por 15 minutos ou em -20° C por 2 horas ou ainda em N líquido por 60 segundos. Após o período de congelamento as amostras foram incubadas a 80°C por 20 minutos em termobloco *Thermomixer Compact* (*Eppendorf*, Alemanha) então homogeneizadas no vórtex por 15 segundos e centrifugadas a velocidade máxima por 15 segundos. Os sobrenadantes foram transferidos para micro- tubos e armazenadas em freezer -20° C.

3.3.2.3.2 Extração do DNA com resina comercial *Chelex*® *Grade Molecular Biology Resin* (Bio-Rad Laboratories, USA).

A resina *Chelex* foi preparada a 5% conforme instruções do fabricante (0,5 g para 10 mL de TE), distribuída em micro tubos e armazenada em geladeira (4° C). Uma colônia de levedura mantida em meio sólido foi coletada com um palito estéril ou 200 µL de pellet de cultura líquida centrifugada e lavada com salina foi transferida para um micro tubo estéril contendo 300 µL da resina *Chelex*. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de um vórtex por 15s, centrifugadas à velocidade máxima por 15s e incubadas por 20 minutos a 65°C em termobloco *Thermomixer Compact* (*Eppendorf*, Alemanha). Após este período as amostras foram novamente homogeneizadas em vórtex por 15 s e centrifugadas à alta velocidade por 1 minuto. Os sobrenadantes foram transferidos para micro tubos estéreis e armazenados a -20° C.

3.3.2.4 Amplificações do DNA via PCR

3.3.2.4.1 Amplificação da região ITS do DNA ribossomal.

A região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA das cepas nativas isoladas em WLN foi amplificada para avaliação do tamanho desta sequência. As reações de PCR contendo 10 µL foram constituídas de 1 µL da preparação de DNA obtido das colônias selecionadas, 5 µL de *GoTaq Green Master Mix* 2X (Promega, USA), 0,5 µM de oligonucleotídeo *foward* ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3') ou 0,5 µM de oligonucleotídeo ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e 0,5 µM de oligonucleotídeo *reverse* ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.*,1990) e água ultra pura estéril suficiente para 10 uL. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador *Biometra TGradient Thermal Cycler* (USA) sob as seguintes condições: 5 min a 94°C; 34 ciclos de 45 s a 94°C, 30 s a 60° C e 1min a 72°C e uma etapa final de 5 min a 72°C. Os produtos gerados foram analisados em gel de agarose 1%.

3.3.2.4.2 Amplificação dos *loci* microsatélite

Os oligonucleotídeos para amplificação dos *loci* microsatélites são de propriedade da empresa Genotyping Biotecnologia Ltda, Botucatu-SP e por ela foram cedidos. As reações de PCR contendo 20 µL foram constituídas de 4 µL da preparação de DNA, 10 µL de *GoTaq Colorless Master Mix* 2X (Promega, USA) ou *GoTaq Green Master Mix* 2X (Promega, USA), 1 µM de cada oligonucleotídeo *forward* e 1 µM de cada oligonucleotídeo *reverse* específico para cada *locus* microsatélite e água ultra pura estéril suficiente para 20 µL. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador *Biometra TGradient Thermal Cycler* (USA) sob as seguintes condições: 5 min a 94°C; 14 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 60°C (decrecendo final de 5 min a 72°C. Os produtos de PCR foram conferidos em gel de agarose 3% e/ou em sistema de eletroforese de capilar.

3.3.2.5 Análise dos produtos de PCR por eletroforese.

3.3.2.5.1 Eletroforese em gel de agarose

3.3.2.5.1.1 Análise da amplificação da região ITS do rDNA e dos *loci* microsatélites

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook *et al.*, (1989). As reações de PCR da região ITS foram aplicados em gel de agarose 1% (GIBCO BRL®) e as reações de PCR dos *loci* microsatélites em gel de agarose 3% (GIBCO BRL®) contendo *Gel Red* [0,1 µL/mL] (Biotium, USA), em solução tampão de Tris acetato EDTA- TAE 1X (Tris acetato 40 mM e EDTA 1 mM). Após a corrida a 80 V por 1 hora as bandas foram visualizadas em um transluminador UV e o tamanho destas foi estimado através do marcador de peso molecular 100 bp DNA *Ladder* (Ludwig Biotec, Brasil).

3.3.2.5.2 Eletroforese capilar.

3.3.2.5.2.1 Análise da amplificação dos *loci* microsatélites

Os *loci* microsatélites que geraram produtos de amplificação polimórficos em gel de agarose, foram analisados em sistema de eletroforese capilar *QIAxcel* (Qiagen, Alemanha) e *QIAxcel Advanced* (Qiagen, Alemanha) usando o capilar *QIAxcel DNA Screening Kit* e *QX Alignment Marker* 15 bp/5000bp como padrão de alinhamento interno. A separação dos produtos de amplificação ocorreu na voltagem de 6 KV no tempo de separação de 320 segundos e tempo de injeção de 20 segundos. O tamanho das bandas foi determinado através do marcador FX 174 *Hae* III 72bp-3kb ou *QX DNA Size Marker* 100pb-3kb e os dados foram analisados usando-se os softwares *BioCalculator* (versão 3) ou *Qiaxcel Screengel*.

3.3.2.6 Análise da diversidade e estrutura populacional

3.3.2.6.1 Árvore fenética

O resultado da análise de 11 microsatélites em 86 cepas de *S. cerevisiae* (Tabela-3) foi usado para construir uma árvore fenética com o *software* Population 1.2.3 utilizando Nei (1987) para a construção da matriz de distâncias e o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

3.3.2.6.2 Análise da estrutura populacional

Para as análises da diferenciação genética e estrutura populacional foram consideradas 7 populações constituídas pelas cepas coletadas no mesmo local em um mesmo período. As populações foram designadas conforme consta na Tabela 2:

Tabela 2- Populações de *Saccharomyces cerevisiae* nativas estudadas.

População	Cepa	Local e período de coleta
Pop 1- RP10	5 a 13	Usina Rio Pardo em 2010
Pop 2- SM08	32 a 48	Usina São Manoel em 2008
Pop 3 -SM09	14 a 31	Usina São Manoel em 2009
Pop 4 -SA09	49 a 56	Usina Santa Adélia em 2009
Pop 5- SA10	57 a 60	Usina Santa Adélia em 2010
Pop 6- RP11	61 a 64	Usina Rio Pardo em 2011
Pop 7 -PER	65 a 69	Usinas de Pernambuco

3.3.2.6.3 Diferenciação genética entre as populações

O software Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) foi usado para calcular os F_{ST} s (Wright 1951; Weir & Cockerham, 1984) entre as populações e determinar a significância destes por testes de permutação de genótipos (100 permutações). O valor de P igual a 0,05 foi adotado como limiar de significância.

3.3.2.6.4 Estrutura populacional

Baseado nos resultados dos multi-locus microsatélite a estrutura das populações foi examinada pelo método Bayesiano de agrupamento individual do *software* STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000). Foi usado o modo misturado [*admixture model*] onde é considerado que os indivíduos analisados tenham herdado frações de seus genomas de ancestrais da população k (Pritchard *et al.*, 2000). O potencial número de *clusters* (K) foi testado variando de $K=1$ a $K=14$. Para cada valor de K cinco corridas foram feitas com 10.000 interações de MCMC (método de Markov chain Monte Carlo) para estimar a significância dos desvios observados. A média das probabilidades logarítmicas ($\ln P(D)$) para cada K foi calculada para determinação do K ideal.

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Construção do perfil de bandas de 11 *loci* microssatélites.

Para testar a eficiência do método de PCR microssatélites na discriminação de cepas de leveduras presentes no caldo de cana de açúcar, criou-se um padrão de bandas eletroforéticas que permitisse comparar cepas nativas das cepas inoculadas para iniciar o processo de fermentação. Para isso, utilizou-se o DNA das quatro cepas comerciais selecionadas de etanol: BG-1; CAT-1; PE-2 e SA-1 as quais são amplamente utilizadas como iniciadoras nas indústrias sucroalcooleiras brasileiras. Os pares de oligonucleotídeos: A, B, C, D, E, F, G, H, I1, I2 e J que flanqueiam 11 *loci* microssatélites foram utilizados para amplificar estas regiões no genoma destas linhagens.

Como observado na Figura 1 os *loci* A, C, F, H e I2 são polimórficos (Fig.1-I, II e III), G e I1 não geraram produtos de amplificação (Fig.1-II e III) e os *loci* B, D, E e J são monomórficos (Fig.1-I, II e III). Utilizou-se então o perfil eletroforético de amplificação dos *loci* A, C, F, H e I2 (Fig.1-I, II e III) que permitia diferenciar leveduras do processo (inoculadas) e nativas introduzidas com a matéria prima que alimenta a dorna devido à condição não estéril da indústria.

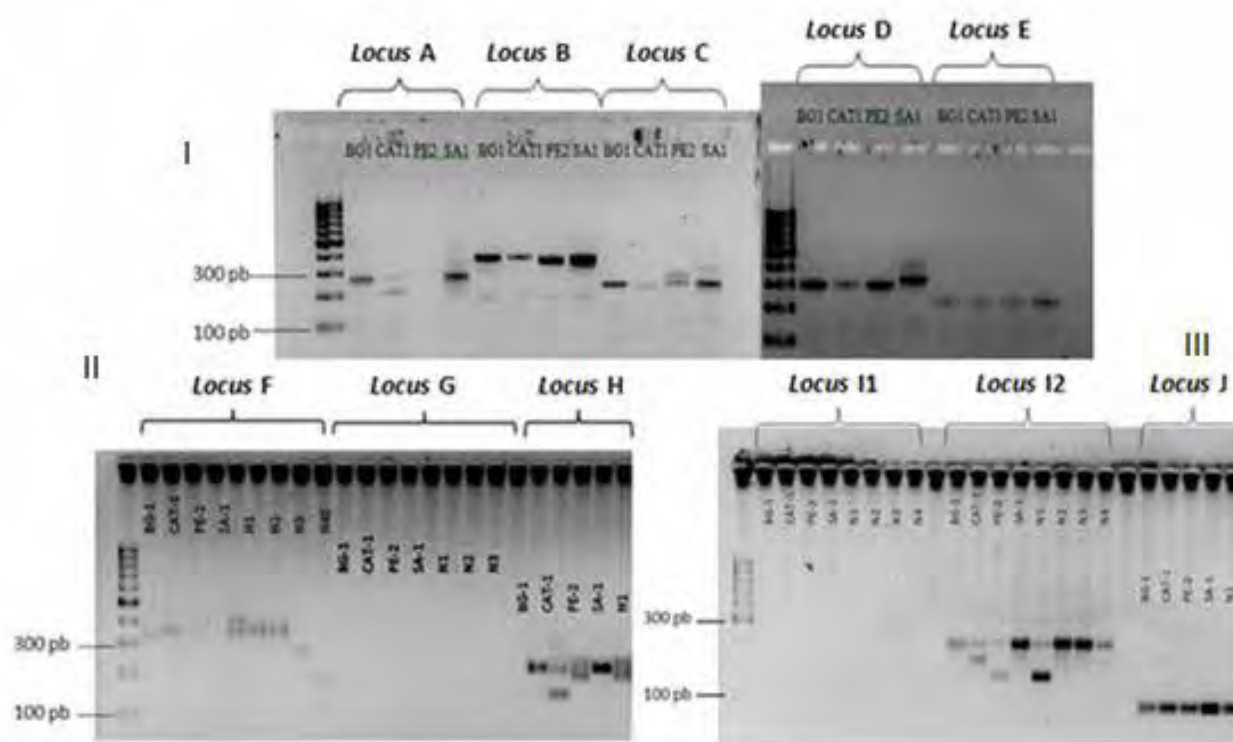


Figura 1. Perfil eletroforético das cepas selecionadas comerciais amplificadas por 11 marcadores microssatélites. Bandas resultantes da amplificação dos *loci* microssatélites nas cepas BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1 e em algumas cepas nativas N1, N2, N3 e N4 pelos pares de oligonucleotídeos: (I) A, B, C, D e E. (II) F, G e H. (III) I1, I2 e J analisadas em gel de agarose 3% corado com *Gel Red* 0,01% (v/v). Peso molecular 100 bp (Ludwig, BR).

3.4.2 Monitoramento da população de leveduras na Usina Açucareira São Manoel SA durante a safra de 2008 utilizando marcadores microssatélites.

Os *loci* polimórficos A, C, H, I2 foram escolhidos pra acompanhar a população de leveduras na Usina Açucareira São Manoel SA (São Manuel, SP) situada na região de Botucatu (Fig. 2). As coletas de vinho fermentado foram feitas mensalmente e as colônias isoladas foram selecionadas quanto à

cor, formato de bordas e superfície de colônia (Apêndice A) para extração do DNA e amplificação dos 4 *loci* microssatélites. Um exemplo do resultado destas amplificações pode ser vista na Figura 3.



Figura 2 . Mapa da localização da Usina São Manoel. (A) Localização da Usina São Manoel no centro do estado de São Paulo. (B) Vista parcial das instalações da Usina São Manoel.

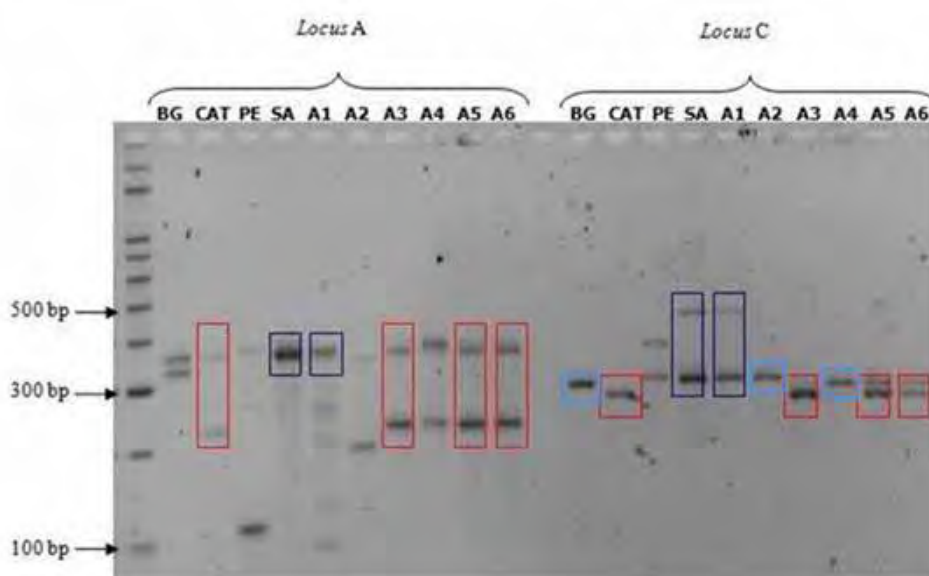


Figura 3. Análise da amplificação dos *loci* A e C em cepas de leveduras isoladas do processo fermentativo numa unidade sucroalcooleira. Perfil de bandas resultante da amplificação dos *loci* A e C para as cepas comerciais de etanol BG-1 (BG); CAT-1 (CAT); PE-2 (PE); SA-1 (SA) e cepas A1, A2, A3, A4, A5, e A6 isoladas do vinho fermentado da Usina São Manoel no final da safra de 2008 em gel de agarose 3% corado com *Gel Red* 0,01% (v/v). Peso molecular 100 bp (Ludwig, BR). Os retângulos em vermelho destacam as cepas que apresentam um perfil igual aos das cepas inoculadas CAT-1 e PE-2 e em azul claro e escuro as cepas que exibem um perfil diferente destas.

A Usina São Manoel em 2008 iniciou o processo fermentativo com 50% da levedura PE-2 e 50% de CAT-1. De acordo com os resultados deste estudo nos primeiros 30 dias de safra ocorreram o aparecimento de leveduras com perfil genético de leveduras nativas e as cepas com perfil igual à cepa PE-2 diminuíram sua contribuição na população em aproximadamente 35%, chegando a quase desaparecer no final da safra (0,8%). Cepas de perfil igual ao da CAT-1 tenderam a dominar o

processo por quatro meses consecutivos, chegando ao final da safra com aproximadamente 18% do total da população de leveduras do processo. No último mês de safra 80% das leveduras da população apresentaram perfil genético de leveduras nativas. Entre as leveduras nativas isoladas durante toda a safra foi possível observar aproximadamente 13 perfis microssatélites diferentes.

Essa dominância observada da cepa CAT-1 sobre PE-2, pode ser explicada pela possível vantagem desta cepa ao competir com leveduras da microbiota local. Acompanhamentos microbiológicos da mesma unidade em 2 safras posteriores feitos por cariotipagem confirmam o desaparecimento da cepa PE-2 no primeiro mês de safra, a permanência de CAT-1 até o quarto-quinto mês e a dominância de cepas nativas no final de safra (Miriam Roberta Henrique, bióloga da Usina São Manoel comunicação pessoal).

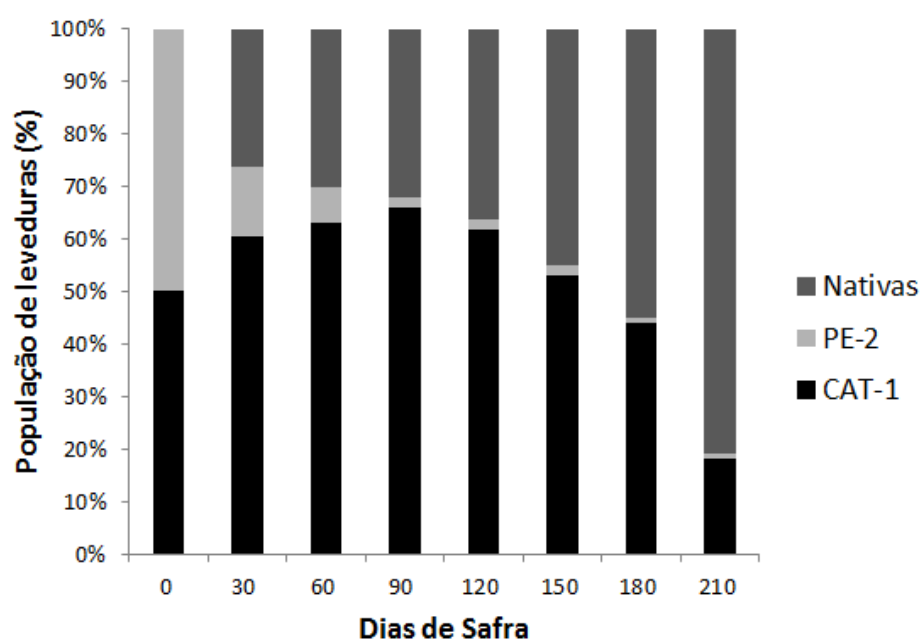


Figura 4. Distribuição da população de leveduras durante o processo fermentativo da Usina São Manoel em 2008 analisado por 4 marcadores microssatélites. Frequência das cepas de *S. cerevisiae* iniciadoras CAT-1 e PE-2 e de leveduras nativas na população da Usina São Manoel durante a safra de 2008.

Andrietta e colaboradores (2011) também observaram substituição da população de leveduras no processo fermentativo ao monitorarem a safra de uma usina sucroalcooleira através de cariotipagem. Quanto a Usina São Manoel é preciso ressaltar que não foram observados problemas referentes à produtividade de álcool devido à predominância de cepas de leveduras autóctones no processo, pelo menos no que se refere à safra de 2008. Silva-Filho e colaboradores (2005 b) e Basílio e colaboradores (2008) ao monitorarem algumas destilarias do nordeste do Brasil, relataram resultados muito parecidos com estes para final de safra, onde havia predominância de cepas nativas.

Steckelberg (2001) ao analisar 19 cepas nativas do processo de fermentação alcoólica de algumas destilarias brasileiras constatou que 75% eram excelentes produtoras de etanol, o que segundo o autor, já era esperado, pois se tratava de isolados capazes de dominar processos industriais onde há forte pressão seletiva do meio.

Portanto, as leveduras nativas nem sempre são prejudiciais ao processo e por serem bem adaptadas a condição de estresse da indústria, se possuírem boas qualidades fermentativas podem ser adequadas para iniciar a próxima safra.

3.4.3 Estudo da diversidade populacional de leveduras nativas em vinho fermentado de cana de açúcar em diversas unidades industriais

3.4.3.1 Isolamento das colônias e identificação taxonômica dos isolados

Diante da diversidade de linhagens encontrada na Usina São Manoel, foi decidido investigar a população de leveduras em outras unidades sucroalcooleiras e uma unidade produtora de aguardente de cana (Indústria de Bebidas Muller). Para tanto foram analisadas cepas oriundas: da Usina Santa Adélia em 2009 e 2010; da Usina São Manoel em 2009; da Indústria Muller e Usina Rio Pardo em 2010 e 2011; cepas isoladas da Usina São João de Araras; amostras oriundas de várias unidades cedidas pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) e algumas cepas isoladas de destilarias do estado de Pernambuco (Silva-Filho *et al.*, 2005 a; 2005 b). A Figura 5 mostra a localização aproximada das unidades industriais onde as leveduras foram coletadas, para uma informação mais detalhada visitar a URL: <http://g.co/maps/vqdrh>. As cepas BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1; a cepa comercial de vinho CK-1; a cepa comercial de cerveja SO4, a cepa laboratorial W303 α/a , a cepa comercial de panificação Itaiquara e uma cepa de *S. cerevisiae* isolada de exsudato de pele humana coletado no HC da Faculdade de Medicina de Botucatu foram também analisadas para que se pudesse evidenciar as semelhanças genéticas das cepas autóctones e estas cepas conhecidas. As tabelas 2 e 3 listam as cepas utilizadas neste estudo.



Figura 5. Mapa da localização das unidades industriais onde as cepas de leveduras foram isoladas. (A) Mapa do estado de São Paulo onde estão localizadas as unidades industriais de onde as leveduras nativas foram isoladas. AR= Usina São João de Araras, SM= Usina São Manoel, RP=Usina Rio Pardo, EQ= Usina Equipar (CTC), SA=Usina Santa Adélia, MA= Usina Maringá (CTC), SE= Usina Serra (CTC) e MU= Indústria Muller. (B) Mapa do Brasil onde se destaca: o estado de Pernambuco onde as cepas de número 65 a 69 foram isoladas, o estado de Alagoas de onde as cepas 72 e 73 foram isoladas pelo CTC e o estado de São Paulo onde todas as demais cepas foram isoladas.

As colônias isoladas do vinho fermentado foram selecionadas de acordo com aspecto morfológico apresentado em meio WLN (Apêndice A) e o DNA foi preparado conforme descrito em 3.3.2.1. Para a identificação taxonômica destas colônias a região ITS do DNA ribossômico foi amplificada através dos oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 ou ITS5 e ITS4 (White *et al.*, 1990) que amplificam a unidade repetitiva do rDNA que inclui o gene do rRNA 5.8s e as duas regiões não-codificantes designadas como ITS1 e ITS2 (*Internal Transcribed Spacers*) (White *et al.*, 1990). Resultados prévios demonstraram que as regiões ITS (não-codificantes e variáveis) e o gene do rRNA 5.8s (codificante e conservada) são úteis (Esteve-Zarzoso, 1999) para a classificação das espécies *Saccharomyces* (Valente *et al.*, 1996; Arlorio *et al.* 1999).

Cento e trinta e oito colônias apresentaram comprimento de banda de aproximadamente 800 pares de bases e foram identificadas como *S. cerevisiae*. Na Figura 6 pode-se observar a amplificação da região ITS de amostras oriundas do CTC onde somente as amostras 2 e 3 exibem tamanho de banda compatível com o tamanho esperado para *Saccharomyces cerevisiae* e as amostras 4, 5, e 7 que mostram bandas menores que o tamanho esperado (A). Nas amostras procedentes da Usina São Manoel (B) os indivíduos 1,2 e 3 exibem banda de 800 pb, porém 4, 5 e 7 mostram bandas menores e o 6, banda maior que o tamanho esperado para *S. cerevisiae* (B). As cepas que apresentaram comprimento de banda menor ou maior que 800 pares de bases foram descartadas do estudo. Algumas cepas tiveram essa região também sequenciada. Um exemplo deste sequenciamento pode ser visto na Figura 7.

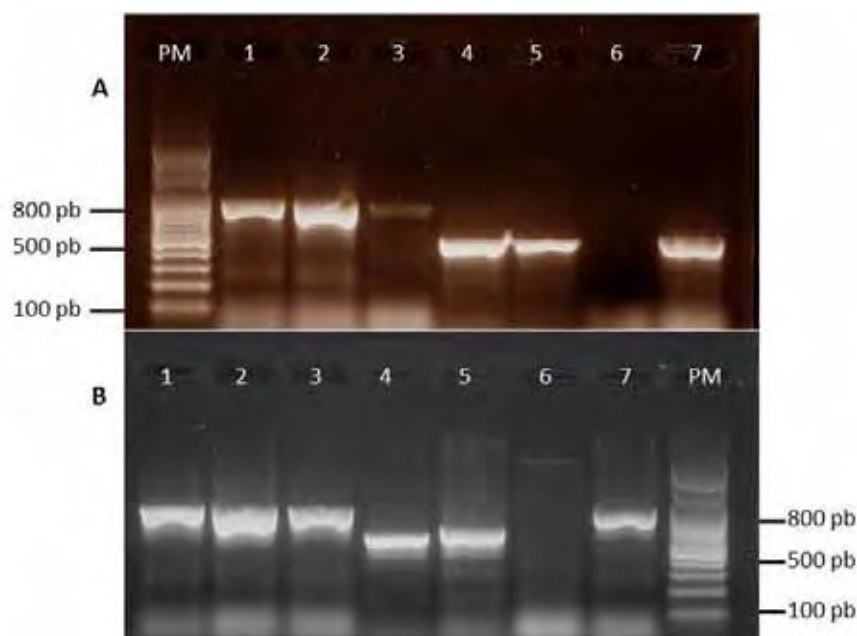


Figura 6. Análise da amplificação da região ITS do rDNA das colônias isoladas. (A) 1= cepa laboratorial de *S. cerevisiae* W303, 2 a 7 amostras oriundas do CTC. (B): 1 a 6 são amostras oriundas da Usina São Manoel, 7= cepa laboratorial de *S. cerevisiae* W303. PM= Peso molecular 100 bp DNA Ladder (Ludwig Biotec, Brazil). Gel de agarose 1% corado com *Gel Red* 0,01% (v/v).

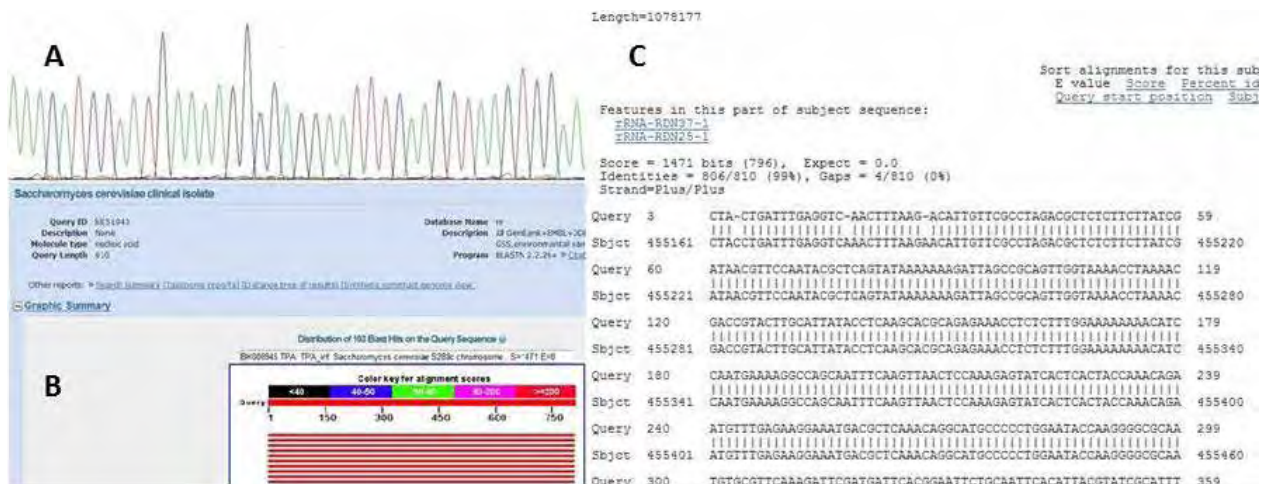


Figura 7. Resultado do sequenciamento da região ITS do rDNA. (A) Parte do cromatograma da sequência obtida pela amplificação da região ITS da cepa isolada da Usina São Manoel amplificada pelos oligonucleotídeos ITS4/ITS5. (B) Representação gráfica do BLAST da cepa isolada. (C) Imagem do resultado de parte do alinhamento da região ITS da mesma cepa amplificada pelos oligonucleotídeos ITS4/ITS5.

3.4.4 Análise das populações de leveduras por marcadores microssatélites

Para aumentar o poder de definição dos microssatélites 13 novos pares de oligonucleotídeos (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, C5, C11 e C12) foram adicionados ao painel dos 4 *loci* polimórficos (A, C, H e I2) em uso.

3.4.5 Construção do perfil de bandas de 13 marcadores microssatélites em gel de agarose

Para a construção do perfil de amplificação destes oligonucleotídeos foram utilizadas as cepas comerciais de etanol BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1 e o ensaio foi conduzido conforme relatado anteriormente em 3.4.1. O perfil destas amplificações em gel de agarose pode ser visualizado nas Figuras 8 e 9.

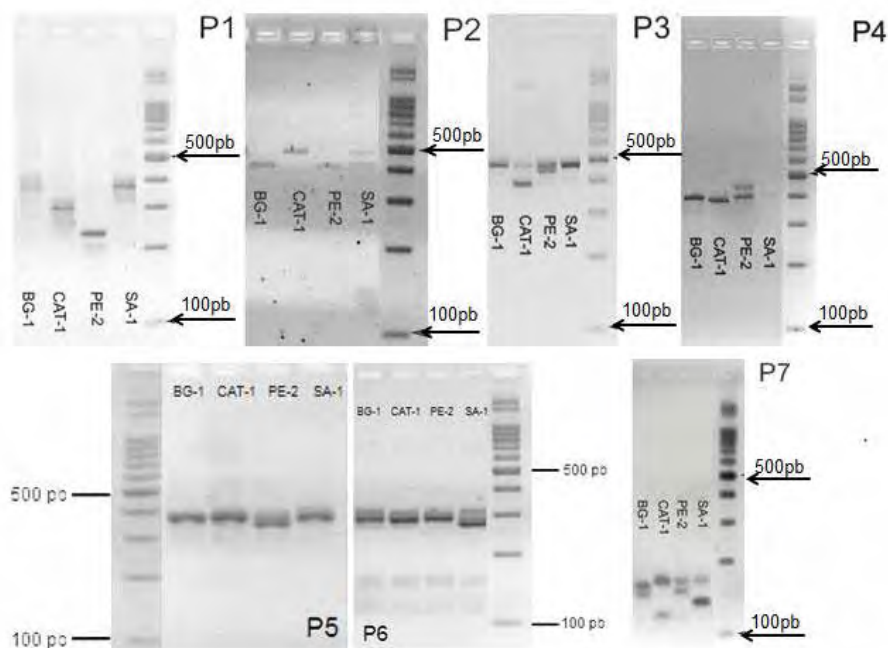


Figura 8. Perfil eletroforético das amplificações das cepas selecionadas por 7 marcadores microssatélites. Amplificações geradas pelos oligonucleotídeos P1, P2, P3, P4, P5, P6 e P7 nas cepas comerciais de etanol BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1. Análise em gel de agarose 3% corado com *GelRed* (Biotium, USA) 0,01% (v/v). Peso molecular 100 pb DNA *Ladder* (Ludwig, Biotec, BRI).

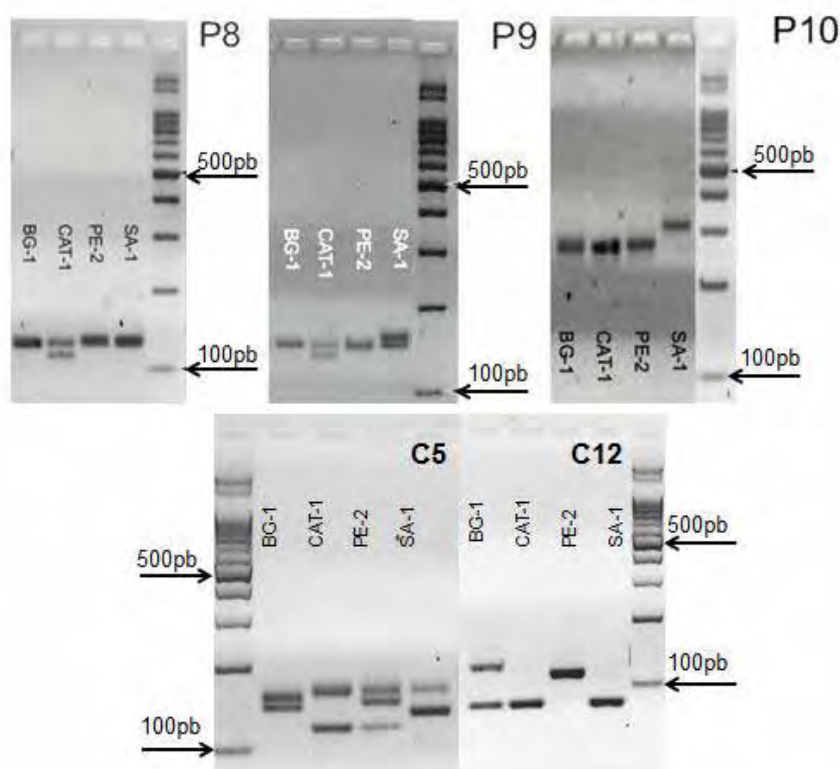
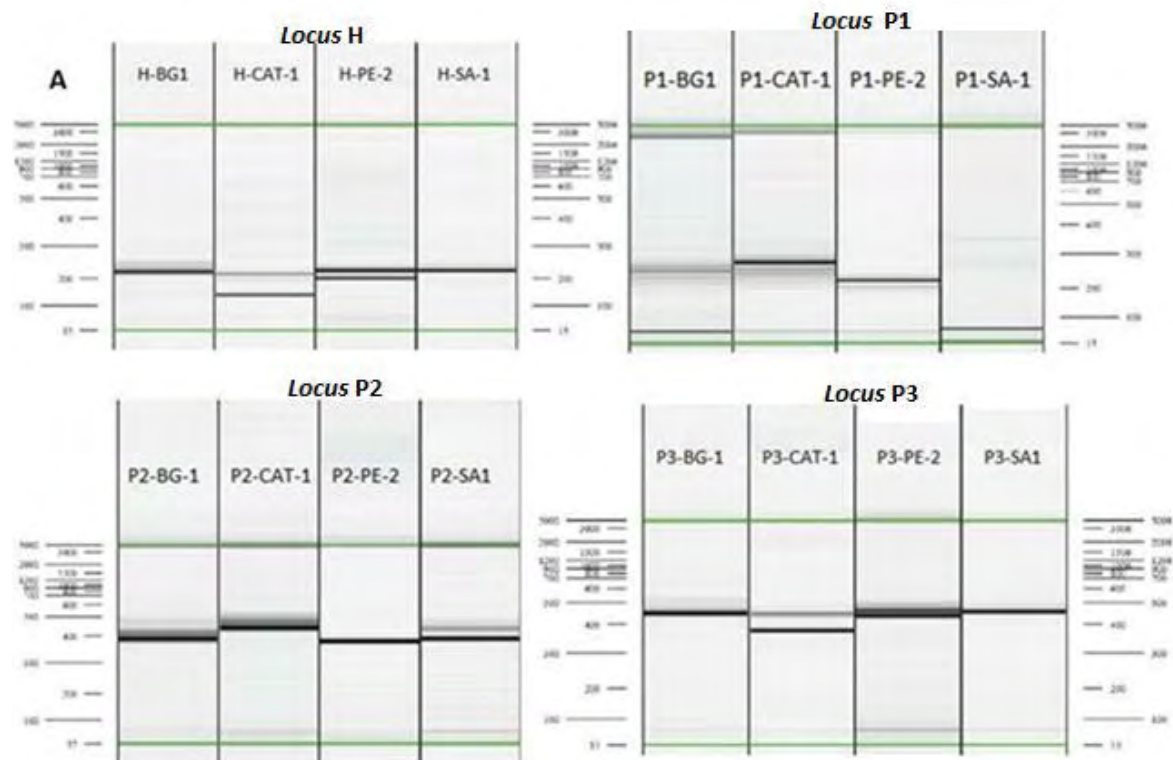


Figura 9. Perfil eletroforético das amplificações das cepas selecionadas por 5 marcadores microssatélites. Amplificações geradas pelos oligonucleotídeos P8, P9, P10, C5 e C12 nas cepas comerciais de etanol BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1. Análise em gel de agarose 3% corado com *GelRed* (Biotium, USA) 0,01% (v/v). Peso molecular 100 pb DNA *Ladder* (Ludwig, Biotec, BR).

Os *loci* H, P1, P2, P3, P4, P7, P8, P9, P10, C5, C11 e C12 foram os selecionados para analisar as populações de leveduras autóctones, por serem os mais reprodutíveis.

3.4.6 Construção do perfil de bandas dos marcadores microssatélites em sistema de eletroforese de capilar

O perfil de bandas gerado pelos 12 marcadores selecionados ao amplificar as cepas selecionadas comerciais de etanol foi analisado em sistema de eletroforese de capilar e visualizado por meio do software *Qiaxcel Screengal* (Fig. 10).



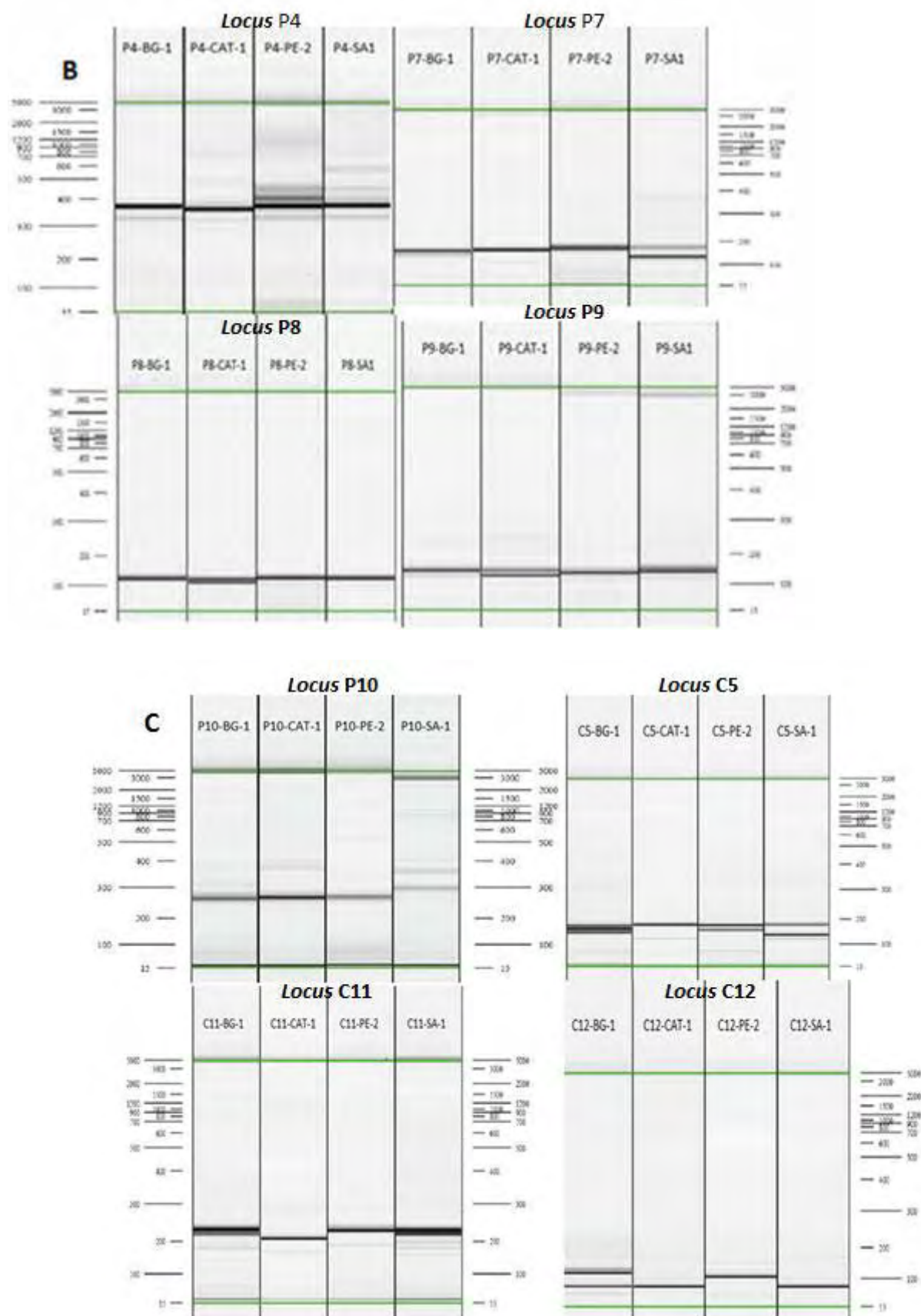


Figura 10. Análise da amplificação dos 12 *loci* microsatélites nas cepas selecionadas comerciais BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1, em eletroforese de capilar. Gel virtual gerado pelo software Qiaxcel Screengel. (A) Locus H, P1, P2 e P3. (B) Locus P4, P7, P8 e P9. (C) Locus P10, C5, C11 e C12.

Uma vez estabelecido o painel de marcadores, 138 cepas confirmadas como *Saccharomyces cerevisiae* foram primeiramente testadas com os *loci* H, P3 e C12, visando selecionar cepas com perfil diferente do apresentado pelas cepas selecionadas comerciais de etanol e evitar perfis redundantes (Fig. 11).

Um exemplo de como foi feita essa seleção se encontra na Figura 11 onde as amostras 1,2,3 e 4 correspondem às cepas selecionadas BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1 respectivamente e as demais (5 a 29) são cepas nativas de *S. cerevisiae* isoladas da Usina São Manoel em 2009. Como se pode observar para o *locus* P3 (A) as amostras 11, 15, 16, 21, 25, 26 e 28 apresentam um perfil diferente das selecionadas, portanto foram escolhidas para o estudo. Para o *locus* H (B) as amostras 11, 12, 16, 17, 18 e 19; 27 e 29 também mostram padrão diferente das cepas selecionadas, porém igual entre si, neste caso, estas cepas foram testadas por um ou mais *loci* para exclusão dos perfis redundantes.

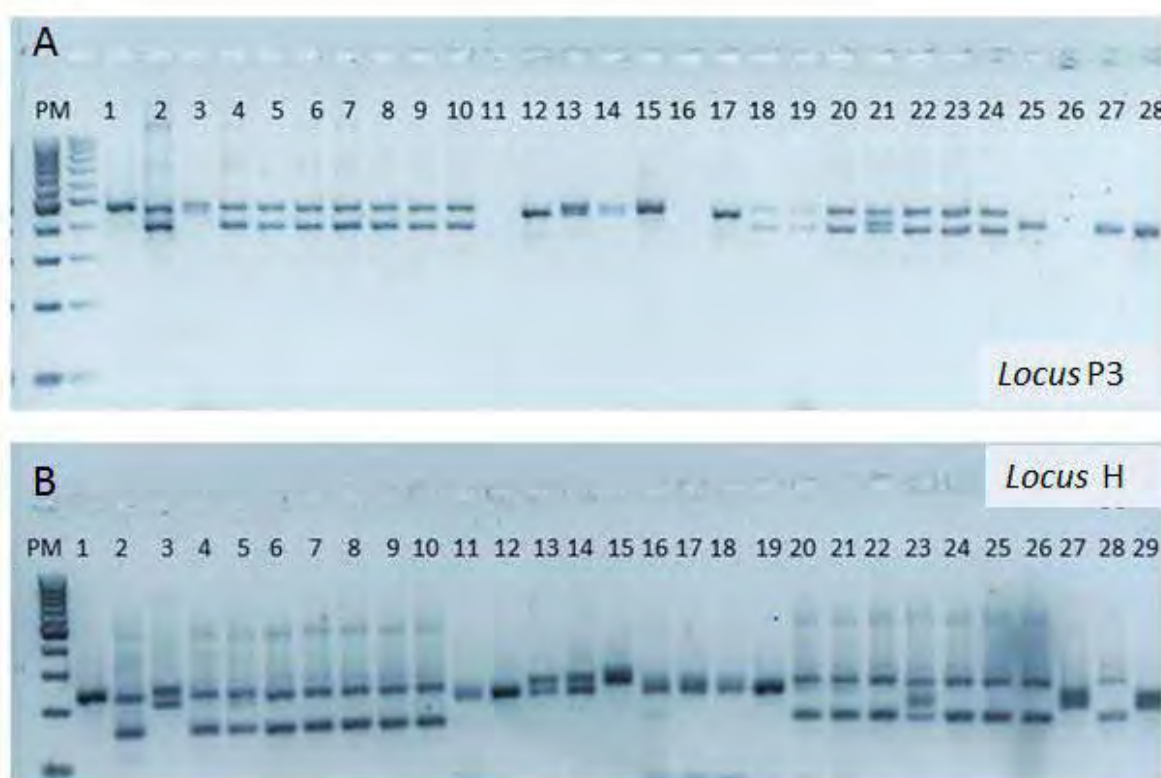


Figura 11. Análise em gel de agarose da amplificação dos *loci* P3 e H em algumas cepas de *S. cerevisiae* nativas isoladas da Usina São Manoel em 2009. (A) Análise da amplificação do *locus* P3 nas cepas: 1= BG-1; 2= CAT-1; 3= PE-2; 4= SA-1; 5 a 29 = cepas nativas de *S. cerevisiae*. (B) Análise da amplificação do *locus* H nas cepas: 1= BG-1; 2= CAT-1; 3= PE-2; 4= SA-1; 5 a 29 = cepas nativas de *S. cerevisiae*. Peso molecular (PM) 100 pb DNA Ladder Ludwig (Biotec, Brasil). Gel de agarose 3% corado com GelRed (Biotium, USA) 0,01% (v/v).

Desta maneira, setenta e sete cepas autóctones de *S. cerevisiae* (Tabela 3 número 1 a 77) apresentaram um padrão único de amplificação para pelo menos um dos três *loci* testados e foram analisadas pelos outros 9 marcadores microssatélites (C5, C11, P1, P2, P4, P7, P8, P9, P10). As cepas comerciais selecionadas de etanol, de vinho, cerveja e panificação, a cepa laboratorial e o isolado clínico, também foram testados pelos 12 marcadores, totalizando 86 cepas analisadas (Tabela 3).

Tabela 3-Lista de cepas analisadas por marcadores microsatélites. A tabela mostra o número e o nome de identificação, classe e local de origem das cepas. As cepas contendo sinal * foram isoladas pelo CTC.

Cepa	Classe	Origem
B) BG-1	Etanol	Cepa selecionada comercial
C) CAT-2		
S) SA-1		
P) PE-2		
1) VF8 (6)	Nativa	Usina São João, Araras, SP.
2) M1. 1	Nativa	Indústria Muller de Bebidas, Pirassununga, SP.
3) M.9.1		
4) M.14. 1		
5) RP. 10.1	Nativa	Usina Rio Pardo, Avaré, SP.
6) RP. 10.2		
7) RP. 10.3		
8) RP. 10.4		
9) RP. 10.6		
10) RP. 10.8		
11) RP. 10.12		
12) RP. 10.13		
13) RP. 10.14		
14) SM. 9.1.AL1	Nativa	Usina São Manoel, São Manuel, SP.
15) SM. 9.1.AL2		
16) SM. 9.1.AL3		
17) SM. 9.1.BL4		
18) SM.9.1.BL7		
19) SM. 9.2.BL4		
20) SM. 9.2.BR3(L)		
21) SM. 9.2.BR5		
22) SM.9.3.BL4		
23) SM.9.3.BL5		
24) SM.9.4.AL1		
25) SM.9.4.BL2		
26) SM.9.4.BL3		
27) SM.9.4.BL4		
28) SM.9.4.BL5		
29) SM.9.4.LBA1		
30) SM.9.4.BR1		
31) SM.9.4.BR2		
32) SM.8.2.C8		
33) SM.8.2.C11		
34) SM.8.2.C13		
35) SM.8.2.L12		
36) SM.8.3.mtBL1		
37) SM.8.3.M4		
38) SM.8.3.M5		
39) SM.8.3.M6		
40) SM.8.3.M9		
41) SM.8.7.L7		
42) SM.8.7.L8		

Cepa	Classe	Origem
43) SM.8.7.L9	Nativa	Usina São Manoel, São Manuel, SP.
44) SM.8.7.BR1		
45) SM.8.7.ctBL1		
46) SM.8.7.ctBR1		
47) SM.8.8.BL1		
48) SM.8.8.CVR1		
49) SA.1.5.	Nativa	Usina Santa Adélia, Jaboticabal, SP
50) SA.9.2.BL3		
51) SA.9.2.BR4		
52) SA.9.3.BR2		
53) SA.9.3.VL8		
54) SA.9.3.VR1		
55) SA.9.4.VL4		
56) SA.9.4.BR2		
57) SA.10.1.VL1		
58) SA.10.1.VL8		
59) SA.10.1.VR4		
60) SA.10.1.CVL1		
61) RP11.4.1	Nativa	Usina Rio Pardo, Avaré, SP
62) RP11.4.5		
63) RP11.4.11		
64) RP11.4.14		
65) P1	Nativa	Usinas de Pernambuco
66) P1a		
67) P6		
68) P25		
69) JP1		
70) CTC 001	Nativa	Usina N.S. Aparecida, Itapira, SP.*
71) CTC 002		
72) CTC 003	Nativa	Usina Coruripe, Coruripe, AL*
73) CTC 005		
74) CTC 007	Nativa	Usina Da Serra, Ibaté, SP.*
75) CTC 008		
76) CTC 013	Nativa	Usina Maringá, Araraquara, SP*
77) CTC 016	Nativa	Usina Equipav, Promissão, SP.*
79) W303	Laboratório	Relacionada à cepa S288c
83) Itaiquara	Panificação	Cepa comercial
84) SO4	Cerveja	Cepa comercial
85) CK	Vinho	Cepa comercial
86) Sc. Isolado de exsudato de pele humana	Nativa	Isolado clínico em Botucatu, SP

As ampliações dos 12 *loci* microssatélites, analisadas em sistema de eletroforese capilar, geraram diferentes números de alelos variando entre 8 e 16. Os *loci* P1 e P3 foram os mais polimórficos apresentando 16 e 15 alelos respectivamente. O P8 e o P9 foram os menos polimórficos gerando 8 alelos, seguidos pelo C5 e C11; P7; P2; C12, H e P4 os quais apresentaram respectivamente: 9, 10, 12 e 13 alelos.

Embora o *locus* P10 tenha apresentado 10 alelos ao amplificar as cepas comerciais de etanol, panificação e cerveja, não foi capaz de amplificar a cepa de isolado clínico, a cepa laboratorial, a cepa de vinho e a grande maioria das cepas nativas, gerando, um grande número de alelos nulos. Portanto seus resultados foram descartados do estudo.

As ampliações destes marcadores nas cepas nativas exibiram um fenótipo heterozigoto em sua maioria (Fig.12), como observado por Richard e colaboradores (2009) para cepas selvagens, naturais e comerciais de vinho. Argueso e colaboradores (2009) constataram que o genoma da cepa diplóide JAY270 (PE2), que é uma levedura nativa selecionada do processo de fermentação do álcool, é altamente heterozigoto.

Talvez este fenótipo heterozigoto seja uma característica comum destas cepas nativas e seja um dos fatores que confira a elas tanta versatilidade, pois este alto grau de heterozigose é frequentemente associado a crescimento vigoroso e produtividade em plantas e animais híbridos e é chamado de vigor do híbrido ou heterose (Argueso & Pereira, 2010).



Figura 12. Análise da amplificação do Loci H em algumas cepas nativas e na cepa PE-2. Análise em sistema eletroforese de capilar. Gel virtual gerado pelo software Qiaxcel Screengel (Qiagen, Alemanha).

Análise da biodiversidade

3.4.6.1 Árvore fenética

Os dados gerados pela amplificação dos 11 microssatélites em 86 cepas (Tabela 3) foram usados para construir uma árvore fenética com o *software* Population 1.2.3. (Fig. 13).

A árvore fenética calculada pelo método de agrupamento UPGMA pode ser separada em dois grandes grupos (Fig.13). O primeiro grupo está representado por 47 cepas diferentes enquanto o segundo grupo corresponde a 39 outras. Duas das cepas selecionadas de etanol SA-1 e BG-1 estão arranjadas bem próximas no primeiro grupo e as cepas CAT-1 e PE-2 estão distantes uma da outra, no segundo grupo. A cepa comercial de cerveja (85) está em um ramo isolado do resto. A amostra de isolado clínico (86) está próxima da cepa de vinho (84) e ambas estão distantes da cepa laboratorial (79). Borneman e colaboradores (2008) ao sequenciarem e alinharem os genomas de uma cepa laboratorial, uma de vinho e um isolado clínico observaram que, embora distantes, o isolado clínico era mais próximo da cepa de vinho do que esta da cepa laboratorial. É interessante notar que o arranjo das cepas nativas na árvore parece estar de acordo com o local e a época em que foram coletadas, como se pode observar nas amostras da Usina São Manoel coletadas em 2009 (14 a 31) e 2008 (32 a 48) as quais aparecem em sua maioria no primeiro e segundo grupo respectivamente. A grande diversidade genética encontrada entre as cepas nativas, principalmente entre aquelas oriundas de locais diferentes e a proximidade das cepas coletadas num mesmo local pode ser atribuída à existência de uma flora local própria. Estudos ecológicos da distribuição das leveduras mostram que algumas cepas de *S. cerevisiae* podem persistir por anos na mesma área (Sabate *et al.*, 1998) e mesma vinícola o que pode ser consequência de sua prevalência na microflora local e /ou de seu *fitness* (Blanco *et al.*, 2006).

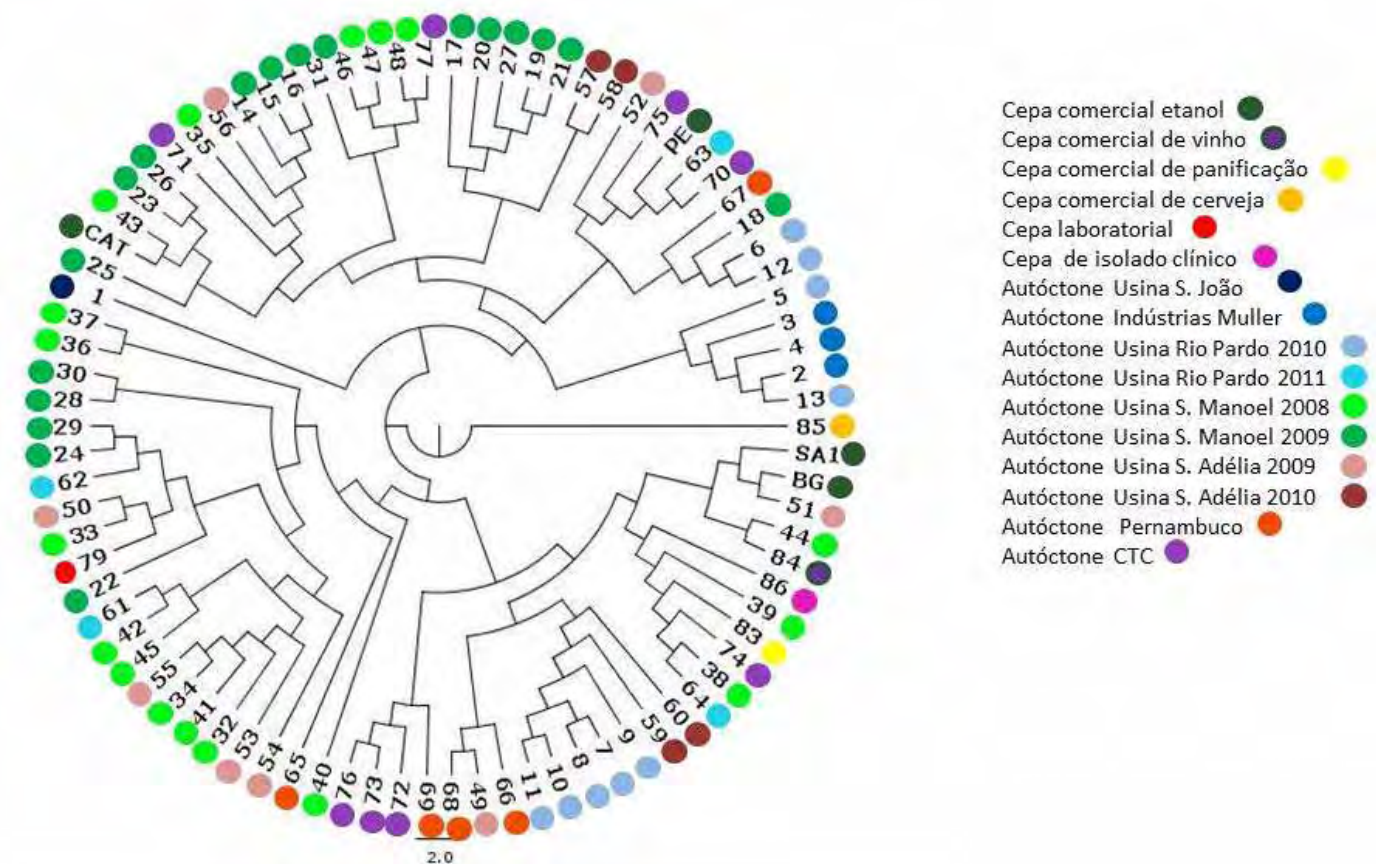


Figura 13. Árvore fenética construída com o algoritmo de agrupamento UPGMA com base nos resultados da análise de microssatélite. Resultado da análise por 11 *loci* microssatélites em 86 cepas *S. cerevisiae*: 4 cepas selecionadas de etanol (BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1), 77 cepas autóctones de *S. cerevisiae* isoladas de: Usina São João de Araras (1); Indústria Muller em 2010 (2, 3, e 4); Usina Rio Pardo em 2010 (5 a 13); Usina São Manuel em 2009 (14 a 31); Usina São Manoel em 2008 (32 a 48); Usina Santa Adélia em 2009 (49 a 56) e 2010 (57 a 60); Usina Rio Pardo em 2011 (61 a 64); Usinas de Pernambuco (65 a 69); cepas isoladas em diversas unidades pelo CTC (70 a 77); cepa laboratorial W303 (79); cepa de panificação (83); cepa comercial de vinho (84); cepa comercial de cerveja (85) e isolado clínico (86). A árvore foi construída com o software Populations 1.2.3.

3.4.6.2 Análise da estrutura populacional

Para as análises da estrutura populacional os isolados foram separados em 7 populações (Tabela 2). Os dados de 65 indivíduos gerados pela amplificação dos 11 microssatélites foram usados para o estudo da diferenciação genética (Fig.14) e da estrutura da população (Fig.15).

3.4.6.3 Análise da diferenciação genética

O *Fst pairwise*, ou seja, a diferenciação genética par a par entre as 7 populações foi calculada pelo programa Arlequin v 3.11 e revelou que a média dos valores de *Fst* entre populações variou entre + 0,15815 (Santa Adélia 2010 em relação à Rio Pardo 2011) e -0,11323 (Pernambuco em relação à Santa Adélia 2009) (Fig.14) revelando haver uma diversidade genética de aproximadamente 16% entre a população nativa isolada da usina Santa Adélia em 2010 e a população nativa da usina Rio Pardo em 2011 e o *Fst* baixo entre as cepas nativas isoladas em Pernambuco e as cepas nativas isoladas na Usina Santa Adélia em 2009 mostra proximidade genética entre estas duas populações apesar da distância geográfica. Nem todos os valores obtidos foram significativos (Fig. 14).

Population pairwise FSTs

Distance method: Pairwise differences

	RP2010	SM2009	SM2008	SA2009	SA2010	RP2011	PER
RP2010	0.00000						
SM2009	0.00422	0.00000					
SM2008	0.04048	-0.00500	0.00000				
SA2009	-0.03598	-0.02452	0.02648	0.00000			
SA2010	0.00760	0.06651	0.07403	0.08230	0.00000		
RP2011	0.09851	0.04561	0.07293	0.04586	0.15815	0.00000	
PER	0.05651	-0.03399	0.01950	-0.11323	0.03479	-0.00710	0.00000

Figura 14. Matriz de diferenciação genética (*FST pairwise*) de 7 populações de *S. cerevisiae* calculado a partir do método da estatística F no *software* Arlequin v.3.1.1. Os valores de FST realçados pela cor cinza compõem a matriz de significância dos FSTs par a par entre as populações, considerando significativo $P > 0,05$. Os círculos destacam o maior e menor valor de FST obtido.

3.4.6.4 Análise da estrutura das populações

Foi feita uma análise Bayesiana da estrutura das populações pelo *software* STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) que analisa a estrutura das populações usando dados genotípicos. Este programa é útil para inferir a presença de populações distintas, atribuir indivíduos as populações, estudar zonas híbridas, identificar indivíduos migrantes e híbridos e estimar a frequência alélica da população em situações onde muitos indivíduos são migrantes ou híbridos. O programa se aplica com sucesso para os marcadores genéticos mais usados incluindo SNPs e microssatélites.

Schacherer e colaboradores (2009) e Liti e colaboradores (2009) o utilizaram ao analisar SNPs em populações de leveduras *Saccharomyces* para inferir ancestralidade das populações e analisar estrutura de populações de leveduras domesticadas e selvagens respectivamente. O programa usa um modelo para populações (K) que são caracterizadas por um conjunto de frequências alélicas pra cada *locus*. Também agrupa indivíduos dentro das populações K de forma a maximizar o equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro destas. Após várias corridas com diferentes valores de K infere-se pelas probabilidades resultantes o provável valor de K que melhor mostra a variação presente nos dados. O escolhido deve ser o menor valor de K que capture eficientemente a maioria da estrutura presente nos dados. Uma maneira de estabelecer isto é comparando as probabilidades dadas para cada valor de K testado. A probabilidade será mais baixa nos valores de K menores e maiores que o apropriado (<http://bodegaphylo.wikispot.org/Structure>). Então se deve escolher o menor valor de K ou um valor que se situe dentro de um *plateau* (Evanno *et al.*, 2005).

Determinou-se previamente o número de 7 populações (*Locprior*) designadas de acordo com o local e período de coleta, conforme descrito na Tabela 2. Foram feitas 5 corridas para cada K (1 a 14) e calculou-se a média das probabilidades resultantes para cada K (Tabela 4). Também foi construído um gráfico que permitisse detectar o verdadeiro número de populações K (Fig.15).

Tabela 4- Média das probabilidades obtidas para cada uma das 5 corridas feitas por K (1 a 14). Análise baseada em 65 indivíduos distribuídos previamente em 7 populações e 11 *loci* microssatélites. No destaque o valor de K mais provável.

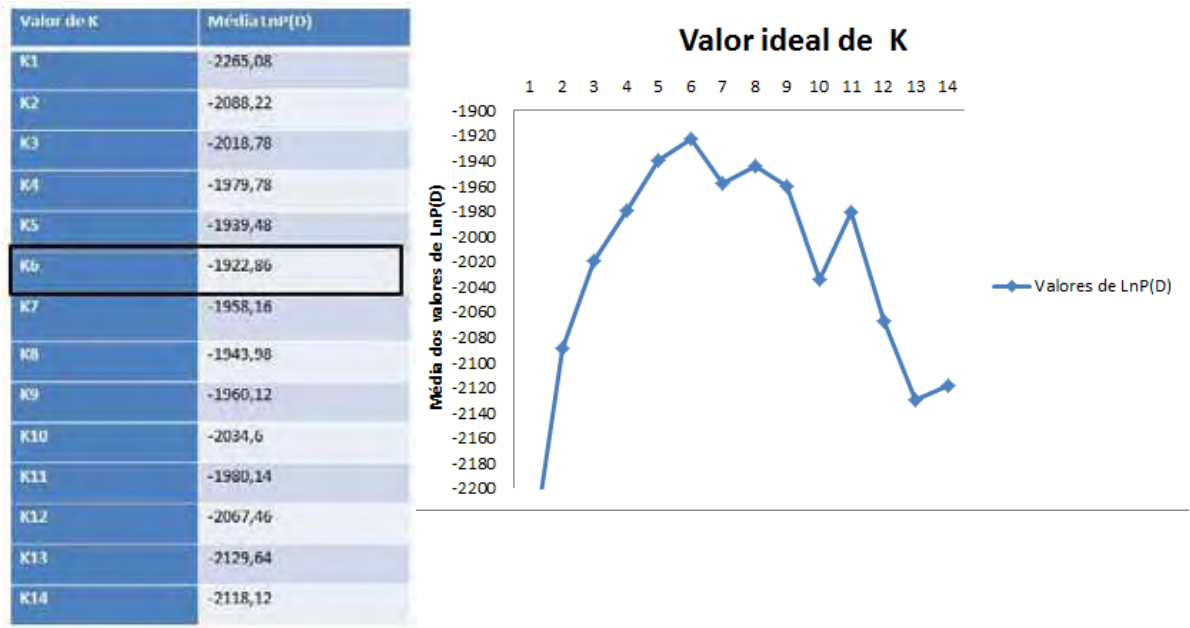


Figura 15. Gráfico das probabilidades logarítmicas LnP (D) como uma função de K. Os dados de probabilidade mostrados são correspondentes as médias dos 5 valores de LnP (D) obtidos para cada K de 1 a 14.

Após a construção do gráfico (Fig. 15) e de conferir os valores das probabilidades na tabela (Tabela - 4) foi decidido que o valor de K mais provável é o 6. Gráficos de barras foram construídos atribuindo aos indivíduos: 2 (K=2), 3 (K=3), 4 (K=4), 5 (K=5) e 6 (K=6) frações genéticas diferentes (Fig. 16).

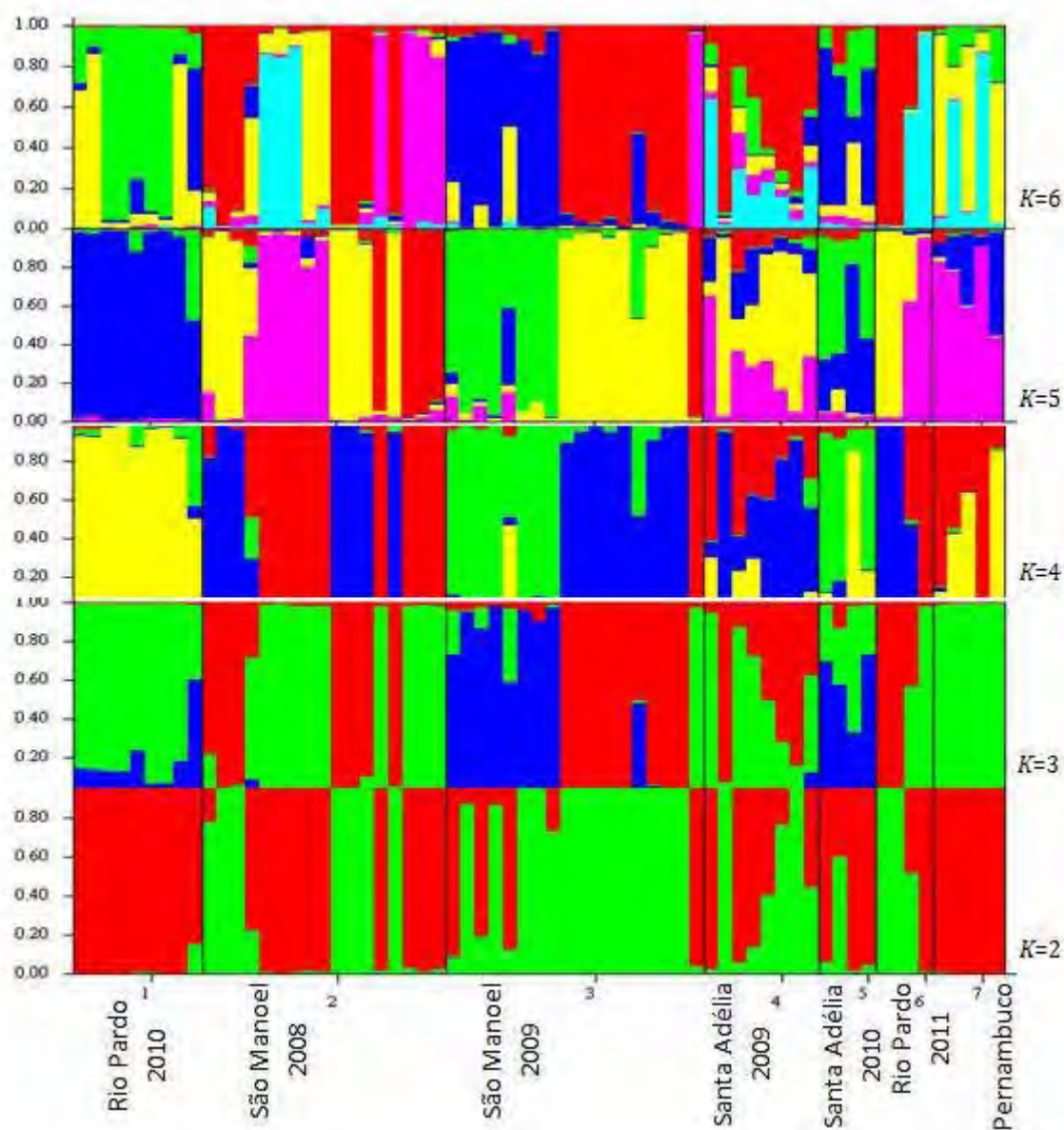


Figura 16. Resultado da análise Bayesiana em 65 indivíduos usando 11 *loci* microssatélites. Cada linha vertical representa um indivíduo analisado. Cada cor indica um cluster baseado em semelhanças genotípicas e representam a probabilidade do indivíduo pertencer a um dos *clusters*. Cada número de 1 a 7 corresponde a uma população pré-determinada: 1= Rio Pardo 2010, 2= S. Manoel 2008, 3= S. Manoel 2009, 4= S. Adélia 2009, 5= S. Adélia 2010, 6= Rio Pardo 2011 e 7= isolados em Pernambuco.

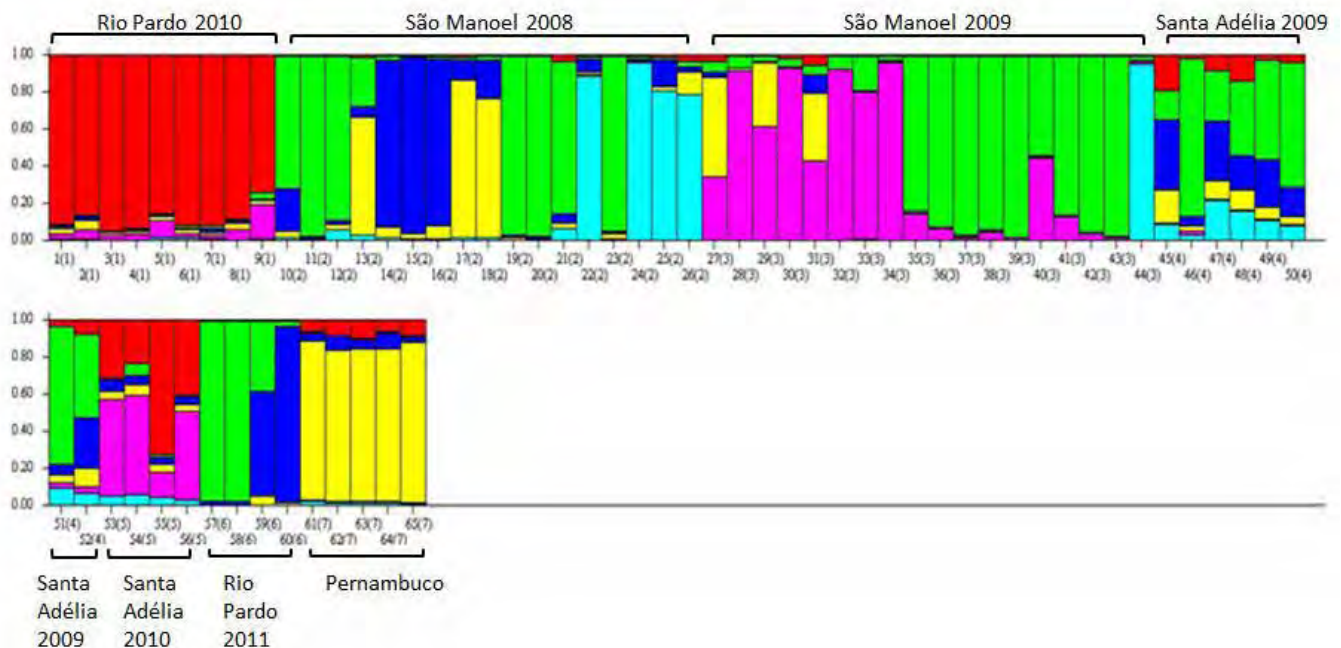


Figura 17. Gráfico de barras originado pelo STRUCTURE considerando K=6. Cada barra corresponde a uma cepa das 65 analisadas com 11 *loci* microssatélites. Cada cor indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas e representam a probabilidade do indivíduo pertencer a um dos *clusters*. Cada número de 1 a 7 corresponde a uma população pré-determinada: 1= Rio Pardo 2010, 2= S. Manoel 2008, 3= S. Manoel 2009, 4= S. Adélia 2009, 5= S. Adélia 2010, 6= Rio Pardo 2011 e 7= cepas isoladas em Pernambuco.

A Figura 16 mostra que as populações de leveduras nativas estudadas em geral são bem diversas umas das outras e que algumas delas são formadas por cepas mais diferentes entre si do que outras. A Figura 17 facilita a visualização do resultado da análise Bayesiana das 7 populações para cada isolado analisado através de um gráfico de barras onde cada barra representa uma cepa isolada e cada cor (K) representa uma fração genotípica atribuída a cada uma delas, considerando-se K=6.

A população isolada na Usina Rio Pardo em 2010 apresenta grande variação genotípica em relação a população isolada em 2011, porém a variação intrapopulacional destas parece ser pequena, mostrando indivíduos geneticamente semelhantes (Fig.17).

A diferença genotípica entre a população isolada na Usina São Manoel em 2008 e em 2009 é grande. A população de 2008 é constituída por 17 isolados sendo três provenientes do caldo de cana cru (10,11 e 12) quatro do mel (15, 16, 17 e 18) um indivíduo do mosto (14) e 8 do vinho fermentado (19 a 26) (Fig.17). Nota-se que 2 cepas isoladas do mel e o isolado do mosto apresentam genótipos semelhantes. Alguns isolados do vinho do final da safra (19, 20 e 21) têm o mesmo genótipo de indivíduos oriundos do caldo, evidenciando a possível permanência destas leveduras presentes na matéria prima, até o final da fermentação. Os demais indivíduos provenientes do vinho mostram padrão genotípico semelhante entre si, mas diferente do resto da população e esta semelhança de genótipos parece ocorrer com indivíduos de uma mesma coleta ou coletas próximas. Este mesmo padrão de semelhança genotípica intrapopulacional associada à época de coleta parece se repetir na população da Usina São Manoel de 2009 onde foram analisados 18 indivíduos provenientes dos quatro primeiros meses da safra: 27 a 31 (1ª coleta); 32, 33 e 34 (2ª coleta) e 35 a 43 (3ª e 4ª coletas).

Também é interessante notar que há certa correlação entre genótipo e morfologia de colônia nas leveduras rugosas 22, 24, 26 e 44 isoladas das populações de 2008 e 2009 da Usina São Manoel.

Em relação às populações da Usina Santa Adélia, o padrão genotípico encontrado em 2009 é bem diferente de 2010 e a diversidade intrapopulacional encontrada nesta população é menor do que a encontrada em 2009. A população de Pernambuco é formada por isolados de genótipos semelhantes.

3.5 Considerações finais

As análises por microssatélites são muito usadas para mapear os genomas e tem ajudado a localizar um grande número de questões biológicas desde o nível individual (identidade, sexo) familiar (grau de parentesco), populacional (estrutura genética, epidemiologia) até espécies (filogenia) (Buschiazzi & Gemmel, 2006), garantindo um rápido, simples e robusto método para discriminar genótipos dentro de espécies, incluindo cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Hennequin *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2001; Legras *et al.*, 2005; Valero *et al.*, 2005; Bradbury *et al.*, 2006; Ayoub *et al.*, 2006). Além disso, este método é um valioso sistema para estudar genética populacional de *S. cerevisiae* (Hennequin *et al.*, 2001; Richards, *et al.*, 2009).

O emprego do método de PCR microssatélite para a detecção de leveduras nativas nos processos fermentativos industriais de produção de álcool pode ser considerado confiável e rápido, principalmente quando conduzido com a preparação do DNA com resina *Chelex* e analisado em sistema de eletroforese de capilar conforme conduzido neste estudo. Uma vez tendo a colônia crescida a análise do polimorfismo para cada placa de PCR de 96 poços (12 colônias e 8 *loci*) pode ser feita em 5:30 h.

A diversidade encontrada entre as cepas nativas isoladas de diferentes unidades industriais mostra a possibilidade existente de exploração de cepas nativas de leveduras do grupo *Saccharomyces sensu stricto* com características *high fitness* visando seu uso como cultura iniciadora na produção de álcool combustível. Estas leveduras nativas, habitantes naturais da matéria prima local que alimenta a dorna, quando apresentam boa capacidade fermentativa, são benéficas ao processo e depois de adequada avaliação podem ser consideradas adequadas a iniciar a próxima safra (Steckelberg, 2001).

A possibilidade de isolamento de cepas capazes de sobreviver ao processo de reciclagem, ao tratamento ácido, às altas concentrações de álcool e a competição com as cepas de processo (inoculadas) seria de grande interesse para a comunidade sucroalcooleira, visto que há disponível para comercialização somente cinco linhagens de leveduras de álcool isoladas do meio industrial (Amorim *et al.*, 2011).

Capítulo II

4. SNPs

4.1 Introdução

Os (*SNPs*) *Single Nucleotide Polymorphism* são gerados por substituições de uma única base ou pequenos eventos de deleção/inserção constituindo a forma mais comum de variação genética entre indivíduos (Perkel, 2008) de qualquer população (Brookes, 1999) e ocorrem uma vez a cada 1.000 bases (Perkel, 2008). Podem ser caracterizados pela sua abundante ocorrência em vários genomas e pela eficiência com que podem ser genotipados (Ben-Ari *et al.*, 2005). Para que um polimorfismo seja considerado um SNP é preciso que ocorra em uma frequência igual ou maior a 1% dentro de uma população (Brookes, 1999; Perkel, 2008). A maioria dos *SNPs* ocorre em regiões intrônicas e intergênicas e são menos frequentes nas regiões codificadoras. Os *SNPs* podem ser classificados de acordo com sua localização no genoma, assim os *SNPs* que ocorrem em: regiões intrônicas são os *iSNPs*; regiões codificadoras (exons) são os *cSNPs*; regiões regulatórias são os *rSNPs* e regiões intergênicas são os *gSNPs*. Os *SNPs* que ocorrem em regiões codificadoras (*cSNPs*) podem ser sinônimos (*sSNPs*) ou não sinônimos (*nsSNPs*) dependendo de sua influência no fenótipo. Os *SNPs* sinônimos representam mudanças de um códon para outro que codifica o mesmo aminoácido antes e depois da ocorrência do polimorfismo, enquanto o *SNP* não sinônimo altera o aminoácido que consequentemente altera a sequência do polipeptídeo ou pode sinalizar término de tradução (<http://www.clcbio.com/>). Estes *SNPs* que afetam a sequência da proteína têm particular importância, pois é mais provável que as variações tenham um significado funcional, podendo, portanto representar marcadores alvo para a identificação de variações genéticas associadas a características fenotípicas complexas. Qualquer tipo de *SNP* pode ser utilizado como marcador na procura de genes associados a vias metabólicas de interesse (Perkel, 2008). Já os *SNPs* localizados em regiões não-codificadoras (maioria) ou em sítios sinônimos, sem impacto direto no genoma, fornecem ferramentas de grande utilidade para estudos de evolução e genética de populações.

Estudos comparativos entre genomas totalmente sequenciados de *Saccharomyces cerevisiae* (Borneman *et al.*, 2008): a linhagem laboratorial S288c; a linhagem patogênica YJM789 isolada de um paciente com AIDS e uma cepa australiana de vinho AWRI1631 mostraram que esta última é substancialmente diferente das outras duas especialmente em nível de *SNPs* os quais estão presentes em média a cada 150 pares de bases nas três cepas. Esta variação quando traduzida para diferenças fenotípicas muito provavelmente reforça a habilidade da levedura de se adaptar a variadas condições ambientais (Borneman *et al.*, 2008). Estes autores relataram que quando o genoma das três cepas foram alinhados, observou-se que embora a densidade de *SNPs* fosse igual entre as três, a linhagem de vinho AWRI1631 mostrou um nível de divergência nucleotídica levemente mais alto e que embora as três cepas representem linhagens igualmente distantes filogeneticamente, as cepas AWRI1631 e YJM789 são mais distantes das cepas de laboratório em nível de nucleotídeos (Borneman *et al.*, 2008).

Saccharomyces spp. é a primeira escolha para a produção industrial de etanol, por conta de sua boa capacidade fermentativa, alta tolerância ao etanol e outros agentes inibidores (produzidos durante a fermentação ou até mesmo durante o pré-tratamento da matéria prima a ser fermentada)

e sua capacidade de crescer rapidamente sob condições anaeróbicas que são as condições encontradas nos tanques de fermentação de larga escala (Mussato *et al.*, 2010).

A microflora dos processos fermentativos industriais pode constituir uma boa fonte de microorganismos com características relevantes do ponto de vista industrial, especialmente leveduras tolerantes ao stress (Basso *et al.*, 2008; Mussato *et al.*, 2010), pois é sabido que durante o processo de propagação da biomassa (Estruch, 2000; Hohmann, 2002) as células estão frequentemente sujeitas a inúmeros estímulos estressantes (Basso *et al.*, 2008; Mussato *et al.*, 2010) tais como: estresse osmótico, oxidativo e térmico; exposição a altas concentrações de etanol e/ou falta de nutrientes e ressecamento. Estas condições adversas podem afetar dramaticamente a dinâmica da população, a fermentação industrial e consequentemente a produção de etanol (Estruch, 2000; Hohmann, 2002).

Sabe-se que a *Saccharomyces cerevisiae* emprega uma série de vias responsivas ao estresse para se adaptar às mudanças drásticas do ambiente (Ding *et al.*, 2010). Na adaptação ao stress osmótico alguns dos genes que parecem estar envolvidos são o *FPS1/YLL043W* e o *GPD1/YOL022W*. O gene *FPS1* está localizado no cromossomo XII e codifica uma proteína transmembrana Fps1 facilitadora do transporte de glicerol para o meio extracelular (Kong *et al.*, 2006) e o *GPD1* análogo ao *GPD2* codifica a iso-enzima glicerol-3-fosfato-desidrogenase dependente de NAD e está localizado no cromossomo IV (Guo *et al.*, 2011).

O stress osmótico é uma condição recorrente na indústria e 20% de glicose são capazes de induzir esta condição na célula de levedura, que resulta em rápida perda de água intracelular seguida de colapso do citoesqueleto, danos intracelulares e parada de crescimento (Hohmann, 2002). A resposta adaptativa visa voltar ao estado anterior de turgor celular, reorganização e polarização do citoesqueleto, reparação do dano celular e reiniciação do crescimento (Wodja *et al.*, 2003).

Em *S. cerevisiae* a resposta ao aumento da osmolaridade do meio é mediada por uma via HOG (*High Osmolarity Glycerol*) MAP quinase e a proteína Fps1 tem um papel central na osmoregulação (Hohmann, 2002) controlando o nível de glicerol intracelular (Pettersen *et al.*, 2005) cujo rápido acúmulo, ocorre nesta situação de estresse (Nevoigt & Stahl, 1997). Mutantes da via HOG exibem fenótipos sensíveis à alta osmolaridade, mas esta sensibilidade é reduzida durante crescimento em altas temperaturas (37° C), exceto para um determinado mutante *ste11ssk2ssk22* sensível nesta condição (Wodja *et al.*, 2003). Wodja e colaboradores (2003) observaram que a super expressão dos genes *FPS1* e *GPD1* permitiu o crescimento de mutantes da via HOG mesmo em condições restritas. As evidências levam a crer que a proteína Fps1 seja um canal mediador do fluxo de glicerol através da membrana plasmática da levedura e que tenha função de adaptação osmótica (Luyten *et al.*, 1995), fechando-se sob stress osmótico para prevenir a saída de glicerol, contribuindo assim para a tolerância ao stress (Tamaz *et al.*, 1999).

Estudos já provaram que o gene *GPD1* desempenha um papel na osmo Adaptação (Guo *et al.*, 2011), uma vez que, sua expressão é induzida em condições de stress osmóticos e mutantes que não possuem este gene são sensíveis ao crescimento nestas condições. Já seu homólogo o gene *GPD2* é estimulado em condições de anaerobiose e mutantes dele apresentam um pobre crescimento quando em anaerobiose. Mutantes que não possuem os dois genes apresentam deficiência no crescimento em condições de anaerobiose e são osmosensíveis (Ansell *et al.*, 1997).

Recentemente um estudo feito por Teixeira e colaboradores (2009) observou que a expressão do gene *FPS1* contribui para a diminuição do acúmulo de álcool dentro da célula durante a fermentação, sugerindo que Fps1p pode também ter um papel na regulação do nível de etanol

intracelular e que o aumento da expressão do *FPS1* pode aumentar a capacidade da levedura de produzir altas concentrações de álcool mesmo em condições de concentrações elevadas de açúcar (meio contendo 30% de glicose) o que é uma vantagem para os processos industriais, pois é sabido que o acúmulo de etanol na célula pode inibir severamente o crescimento celular e a produtividade (Ding *et al.*, 2010). Estes dados confirmam a importância do papel deste gene na tolerância ao álcool em *S. cerevisiae* (Teixeira *et al.*, 2009).

Os principais fatores de retardo do crescimento da levedura, redução da viabilidade e habilidade fermentativa (Ferreira, 2002), incluem alterações na fluidez da membrana e desnaturação de proteínas (Betz *et al.*, 2004) causadas pelo aumento da concentração de álcool durante a fermentação (Ding *et al.*, 2010).

Para sobreviver às altas concentrações de etanol a célula de levedura desencadeia uma série de estratégias que inclui um programa de expressão gênica, mudanças na composição da membrana e aumento das proteínas chaperonas (Ding *et al.*, 2010). Segundo Ding e colaboradores (2010) a resposta à mudança de concentração alcoólica é uma das mais importantes reações ao stress em *Saccharomyces cerevisiae* e vale a pena ser investigada.

A proteína Asr1 (*alcohol sensitive RING/PHD finger 1 protein*) codificada pelo gene *ASR1/YPR093C* foi a primeira proteína de leveduras considerada envolvida numa via putativa de sinalização responsiva ao álcool. Sob stress alcoólico essa proteína muda sua distribuição intracelular do citoplasma e se acumula no núcleo, transmitindo um sinal de stress alcoólico da membrana plasmática para o núcleo, assim representando um elemento chave na tolerância ao etanol (Betz *et al.*, 2004). Embora Izawa e colaboradores (2006) afirmem o contrário, vários autores confirmaram que a proteína Asr1 é necessária para a tolerância ao álcool, representando um importante papel na resposta ao stress alcoólico (Ding *et al.*, 2010) sendo essencial para o crescimento normal da célula em meio contendo altas concentrações de álcool (Betz *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2010).

Os microrganismos em geral, possuem a capacidade de se adaptar eficientemente a diversas condições ambientais, o que no caso das leveduras, pode incluir um aspecto de diferenciação (transição dimórfica) cujo exemplo típico é a mudança da forma leveduriforme (redonda ou oval) de *S. cerevisiae* para a forma de pseudohifa (filamentosa) quando em ambientes com depleção de nitrogênio ou carbono (Palková & Váchová, 2006). O crescimento filamentoso é caracterizado pela formação de longas e ramificadas cadeias de células ou hifas (Ceccato-Antonini, 2008). Halme e colaboradores (2004) revelaram que genes encontrados próximos aos telômeros (que codificam adesinas e floculinas) estão envolvidos com esta mudança morfológica da célula.

A aderência célula-célula é requisito para o desenvolvimento de estruturas formadas por agregados de células tais como: flocos de células, filamentos e biofilmes (Verstrepen & Klis, 2006). Estes flocos de células sedimentam no meio ou flutam, resultando no fenômeno conhecido por floculação.

Apesar de a transição morfológica ser uma vantagem adaptativa que facilita às células de levedura obter nutriente ou escapar de ambientes nocivos (van Mulders *et al.*, 2009) a floculação é uma característica não desejável na indústria de álcool carburante. A eficiência do processo fermentativo é dada em função direta da manutenção das células ativas dispersas no mosto em contato com o substrato (Paschoalini & Alcarde, 2009). A formação de células em cacho diminui a superfície de contato destas com o substrato resultando em redução do rendimento e aumento do tempo de fermentação levando à queda na produção de álcool e consequente perda econômica significativa (Amorim & Oliveira, 1982; Figueiredo, 2008).

Vários estudos têm caracterizado genes envolvidos no processo de floculação em *S. cerevisiae*, incluindo os genes pertencentes à família *FLO* (Verstrepen *et al.*, 2005). Esta família gênica é constituída por diferentes genes com localização telomérica (~10- 40 kb do telômero), incluindo o *FLO1*, *FLO2*, *FLO4*, *FLO5*, *FLO8*, *FLO9*, *FLO10*, e o gene *FLO11* que é o único a situar-se na região subtelomérica do braço direito do cromossomo IX (Halme, *et al.*, 2004). O gene *FLO1/YAR050W* que está situado no braço direito do cromossomo I é o gene floculante mais conhecido. Sua fase de leitura é constituída por aproximadamente 4.6 kb, a qual inclui um grande número de sequências repetitivas em sua parte central que é variável de acordo com a linhagem. Este gene codifica uma glicoproteína (Flo1p) que possui a estrutura de uma típica floculina e tem sido reportado como um dos responsáveis pela adesão célula-célula (Verstrepen *et al.*, 2003; Verstrepen *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2006).

A adesão, que acontece a partir da interação da proteína Flo1p em presença de íons Ca^{2+} no meio é inibida pela presença de manose (Verstrepen *et al.*, 2003), pois esta poderá ocorrer entre a floculina e os resíduos de manose encontrados no meio, ao invés da ligação ocorrer com os açúcares ligados à parede celular e/ou a floculinas de outras células (Verstrepen *et al.*, 2005). Tão importante quanto a presença dos íons Ca^{2+} no meio extracelular e do gene *FLO1* para que este processo de floculação ocorra é necessário a presença do produto de dois outros genes: *FLO8* e *MSS11* que irão regular este processo (Bester *et al.*, 2006).

O gene *FLO8/YER109C* codifica o fator de transcrição Flo8p e *MSS11/YMR164C* que codifica o fator transcricional Mss11p forte indutor de floculação e que atua em conjunto com a Flo8p. O alvo dominante destas duas proteínas é o gene *FLO1* (Bester *et al.*, 2006). O *MSS11* está envolvido na regulação do crescimento invasivo e degradação do amido e controla a ativação de outros genes em resposta a sinais nutricionais (SGD, *Saccharomyces* Genome Database). A deleção deste gene leva ao fenótipo não floculante. Foram descritos domínios específicos da Mss11p que são críticos para a indução da floculação (Bester *et al.*, 2006).

A habilidade de flocular é muito variável e difere em cepas laboratoriais e industriais. A cepa laboratorial S288c não é capaz de flocular devido a uma mutação de ponto nonsense no gene *FLO8* (Liu *et al.*, 1996).

Estudos realizados em diferentes organismos têm encontrado marcadores moleculares para diversas características desejáveis, assim este estudo visou analisar genes envolvidos na floculação e no estresse causado à levedura.

Este trabalho poderá ser de interesse dos produtores de álcool combustível, os quais estão sempre atentos a melhorar as técnicas da fermentação alcoólica, se forem utilizadas cepas que possuam polimorfismos (SNP) que conferiram ganho de adaptação/eficiência às condições de indústria.

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivos gerais:

Detectar polimorfismos (SNPs) em genes relacionados à resistência ao estresse e floculação existentes entre linhagens nativas de leveduras da espécie *S. cerevisiae* visando maior produtividade e persistência das leveduras durante o processo fermentativo.

4.2.2 Objetivos específicos

- ✓ selecionar cepas que apresentem os limites extremos para alta e baixa tolerância ao álcool e acidez ;
- ✓ analisar os polimorfismos de genes nas linhagens selecionadas através de sequenciamento visando buscar marcadores moleculares para as características estudadas.
- ✓ genotipar linhagens nativas de *S. cerevisiae* utilizando marcadores SNPs através da metodologia TaqMan.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Material

As cepas utilizadas neste estudo receberam um código numérico de 1 a 104. Nome, tipo de linhagem e coleção a qual as cepas pertencem estão listadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas e suas respectivas coleções

Código	Cepa	Linhagem/Coleção	Código	Cepa	Coleção
B)	BG-1	Cepas selecionadas comerciais de etanol	40)	SM.8.3.M9	Cepas nativas isoladas de processos fermentativos durante este estudo
C)	CAT-1		41)	SM.8.7.L7	
P)	PE-2		42)	SM.8.7.L8	
S)	SA-1		43)	SM.8.7.L9	
1)	VF8 (6)	LAMAM, Araras, SP.	44)	SM.8.7.BR1	
2)	M1. 1	Nativas/Genotyping Biotecnologia Ltda., Botucatu, SP.	45)	SM.8.7.ctBL1	
3)	M.9.1		46)	SM.8.7.ctBL2	
4)	M.14. 1		47)	SM.8.8.BL1	
5)	RP. 10.1		48)	SM.8.8.CVR1	
6)	RP. 10.2		49)	SA.9.1.5.	
8)	RP. 10.4		50)	SA.9.2.BL3	
9)	RP. 10.6		51)	SA.9.2.BR4	
10)	RP. 10.8		52)	SA.9.3.BR2	
11)	RP. 10.12		53)	SA.9.3.VL8	
12)	RP. 10.13		54)	SA.9.3.VR1	
13)	RP. 10.14		55)	SA.9.3.VL4	
14)	SM. 9.1.AL1	Cepas nativas isoladas de processos fermentativos durante este estudo	56)	SA.9.4.BR2	Nativas/Genotyping Biotecnologia Ltda., Botucatu, SP.
15)	SM. 9.1.AL2		57)	SA.10.1.VL1	
16)	SM. 9.1.AL3		58)	SA.10.1.VL8	
17)	SM. 9.1.BL4		59)	SA.10.1.VR4	
18)	SM.9.1.BL7		60)	SA.10.1.CVL1	Nativas/Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Silva Jr.- UFP. (Silva-Filho <i>et al.</i> , 2005a; 2005b)
19)	SM. 9.2.BL4		61)	RP11.4.1	
20)	SM. 9.2.BR3		62)	RP11.4.5	
21)	SM. 9.2.BR5		63)	RP11.4.11	
22)	SM.9.3.BL4		64)	RP11.4.14	Nativas/Centro de Tecnologia Canaveira (CTC)
23)	SM.9.3.BL5		65)	P1	
24)	SM.9.4.AL1		66)	P1a	
25)	SM.9.4.BL2		67)	P6	
26)	SM.9.4.BL3		68)	P25	
27)	SM.9.4.BL4		69)	JP1	
28)	SM.9.4.BL5		70)	CTC 001	
29)	SM.9.4.LBA		71)	CTC 002	
30)	SM.9.4.BR1		72)	CTC 003	
31)	SM.9.4.BR2		73)	CTC 005	
32)	SM.8.2.C8		74)	CTC 007	Cepa panificação
33)	SM.8.2.C11		75)	CTC 008	
34)	SM.8.2.C13		76)	CTC 0013	
35)	SM.8.2.L12		77)	CTC 0016	
36)	SM.8.3.mtBL1		78)	F. pão Sumaré	Cepa laboratorial
37)	SM.8.3.M4		79)	S288c	
38)	SM.8.3.M5		80)	W303	Lab/Prof. Dr. Mario H. Barros-USP
39)	SM.8.3.M6		81)	Otker (1)	

Código	Cepa	Coleção
82)	D. Benta (2)	Cepa panificação
83)	Itaiquara	Cepa panificação
84)	Vinho (CK)	Prof. ^a Dr. ^a Tania Maria Bordin Bonfim-UFPR
85	Cerveja S04	Cepa comercial
86	Isolado clínico	Prof. Dr. Eduardo Bagagli-IBB-Unesp-Botucatu
87	2 (VF4)	Nativas/ Prof. ^a Dr. ^a Sandra Ceccato Antonini-LAMAM, UFSCar, Araras, SP. (Reis, 2011)
88	3 (VF5)	
89	4 (VF6)	
90	7 (VF9)	
91	8 (VF10)	
92	9 (45)	
93	10 (47)	
94	12 (51)	
95	15 (2)	
96	16 (385)	
97	18 (FM)	
98	19 (URC)	
99	45	
100	47 (VF1)	
101	VG7 RUG	Nativas/ Genotyping Biotecnologia Ltda, Botucatu, SP.
102	VG10 RUG	
103	DEL1 RUG	
104	DEL4 RUG	

4.3.2 Métodos

4.3.2.1 Preparo do DNA com resina comercial Chelex® Grade Molecular Biology Resin (Bio-Rad Laboratories, USA).

A resina *Chelex* foi preparada a 5% conforme instruções do fabricante (0,5 g para 10 mL de TE), distribuída em micro tubos e armazenada em geladeira (4° C). Uma colônia de levedura mantida em meio sólido foi coletada com um palito estéril ou 200 µL de pellet de cultura líquida centrifugada e lavada com salina foi transferida para um micro tubo estéril contendo 300 µL da resina *Chelex*. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de um vórtex por 15 s, centrifugadas à velocidade máxima por 15 s e incubadas por 20 minutos a 65° C em termobloco *Thermomixer Compact* (Eppendorf, Alemanha). Após este período, as amostras foram novamente homogeneizadas em vórtex por 15 s e centrifugadas à alta velocidade por 1 minuto. Os sobrenadantes foram transferidos para novos micro tubos estéreis e armazenados a -20° C.

4.3.2.2 Amplificações do DNA via PCR

4.3.2.2.1 Desenho dos oligonucleotídeos

Para a amplificação do DNA dos seguimentos gênicos selecionados foram desenhados oligonucleotídeos tomando-se por base as sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e no *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) para a cepa referência *S. cerevisiae* S288c.

Para os genes ASR1, FPS1, GPD1 e GPD2 os oligonucleotídeos foram desenhados de modo a flanquear os locais de maior densidade de SNPs de acordo com a base de dados de SNPs de *Saccharomyces cerevisiae* de Schacherer e colaboradores (2007, 2009) http://gbrowse.princeton.edu/cgi-bin/gbrowse/yeast_strains_snps/ onde é possível obter a localização de SNPs em cepas laboratoriais, naturais e de uso industrial.

Para o gene *FLO1* três pares de oligonucleotídeos foram desenhados: o primeiro para amplificar o gene inteiro, o segundo para a região N- terminal da proteína correspondente à porção do nucleotídeo 627 ao 720 reportada por Kobayashi e colaboradores (1998) como necessária para o reconhecimento da manose e o terceiro para cobrir a região repetitiva central do gene cujo número de repetições influencia diretamente o grau de floculação da cepa (Verstrepen *et al.*, 2005; Liti *et al.*, 2007) (Tab. 6).

Para o gene *FLO8* os oligonucleotídeos foram desenhados de modo a flanquear a mutação 608 A>G encontrada na cepa S288c que codifica uma mutação nonsense (Tab. 6).

Para o gene *MSS11* três pares de oligonucleotídeos foram desenhados para: o primeiro par visou amplificar a porção inicial do gene, pois segundo Bester e colaboradores (2006) a região do aminoácido 1 ao 148 tem ação inibitória da floculação (Tab. 6).

Os outros dois pares de oligonucleotídeos visaram cobrir duas porções do gene descritas como sendo necessárias para a de indução da floculação (Bester *et al.*, 2006): a porção que se estende do aminoácido 148 ao 340 e a porção final da sequência codificante relativa à porção do aminoácido 604 ao 641 da proteína (Tab. 6).

A Tabela 6 trás as sequências F (*forward*) e R (*reverse*) dos oligonucleotídeos, tamanho dos fragmentos por eles amplificados e a localização da porção amplificada nas sequências codificantes.

Tabela 6- Pannel de oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos gênicos das sequências codificantes selecionadas para estudo dos SNPs nas diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Oligonucleotídeo	Gene	Sentido	Sequência (5' – 3')	Fragmento amplificado (pb)	Local (pb)	Tamanho gene (pb)
ScASR1_F1	ASR1/ YPR093C	F	ATGGAAGAGTGCCTATTTGTTTG	867	1-867	867
ScASR1_R1		R	CTACTCATCATGACAGTAAATTAGGAG			
ScFPS1_F	FPS1/YLLO43W	F	TACAAGCAGGAACATTTGCG	701	1309 - 2000	2010
ScFPS1_R		R	CCTTCTTAGCATTACCATAATGCG			
ScFPS1_Fb		F	GCCACGTTGAAATTGTCCTGC	843	30 - 873	
ScFPS1_Rb		R	CTTTCTGTCCAGTGAATCTGTTC			
ScFPS1_Fc		F	GCAGGACAATTTCAACGTGGC	876	852 - 1727	
ScFPS1_Rc		R	GAGAAGTCACTCAGGTCCG			
ScGPD1_F		GPD1/YDL022W	F	CTACCCGACAATTTGGTTGC	489	
ScGPD1_R	R		CGTTGTTACCCAGCCTAGA			
ScGPD2_F	GPD2/ YOLO59W	F	ATGCTTGCTGTCAGAAGATT	799	1-799	1323
ScGPD2_R		R	AAATCTTATGATCTACATCCTTGCC			
ScFLO1_F1	FLO1/YARO50W	F	ATGACAATGCCTCATCGCTATA	4614	1-4614	4614
ScFLO1_R1		R	TTAAATAATTGCCAGCAATAAGGACG			
ScFLO1_F b		F	CCAGAGGAAAAGTGGGATGA	590	99 - 688	
ScFLO1_R b		R	TACCCCAAGAAACAGCGTTC			
ScFLO1_Fc		F	CAAAGGAATGGGTGCTTGTT	641	321 -961	
ScFLO1_R c		R	TGGTGCTAGCAGTTGTTGGA			
ScFLO8_F1	FLO8/YER109C	F	AAGTGAATAGTTCGTATCCAGATTC	782	10-792	2400
ScFLO8_R1		R	TGTGGGAGCAACAGCAGTT			
ScMSS11-F	MSS11/YMR164C	F	ATGGATAACACGACCAATATTAATAC	720	1-720	2277
ScMSS11-R		R	ATTAGCGCTATTCTGTTTGTCTG			
ScMSS11_F1		F	CTAGAATCTGGGTACCAACAGG	576	444- 1020	
ScMSS11_R1		R	AGTTTTCCCACCCGAAGCAG			
ScMSS11_F2		F	CCACAAAATGATTCTACCTCCGTC	501	1812-2277	
ScMSS11_R2		R	TTAGCTATCCATTAGATCAGGAGAAAG			

4.3.2.2.2 Amplificação dos fragmentos gênicos selecionados para a procura de SNPs.

Foram amplificados segmentos dos genes:

ASR1, *FPS1*: nas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de fenótipos extremos para alta tolerância: BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1, 21, 22, 23, 25, 26, 32, 34, 33, 35, 41, 42, 55 e 69 e baixa tolerância ao etanol e acidez: 67, 68, 69, 74, 76, 80, 83, 84 e 85.

GPD1 e *GPD2*: nas cepas de fenótipos extremos para alta: BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1, 1, 49, 90, 91, 92, 93, 97 e 98 e baixa tolerância à glicose: 87, 89 e 97.

FLO8, *FLO1*, *MSS11*: nas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de fenótipo floculante: 31, 49, 89, 91, 92, 93, 96, 99; não floculante: BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1,1, 55, 87, 88, 94 e 95 e nas cepas de colônias rugosas: 101, 102, 103 e 104.

As reações de PCR para estas amplificações contendo 20 µL foram constituídas de 4-5 µL da preparação de DNA, 10 µL de *GoTaq Colorless Master Mix 2X* (Promega, USA), 1 µM de cada oligonucleotídeo *forward* e *reverse* específico para cada gene (Tab. 6) e água ultra pura estéril suficiente para 20 µL. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador *Biometra TGradient Thermal Cycler* (USA) sob as seguintes condições: 5 min a 94° C; 34 ciclos de 1 min a 94° C, 45 s a 58° C para os genes *GPD1*, *GPD2*, *FPS1*, *FLO8* e *MSS11* e 56° C para os genes *ASR1* e *FLO1* e 1 min a 72° C e uma etapa final de 5 min a 72°C. Os produtos de PCR foram conferidos em gel de agarose 1%.

4.3.2.3 Análise dos produtos amplificados por eletroforese.

Os produtos de PCR resultantes da amplificação das sequências gênicas selecionadas para procura de SNPs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook *et al.*, (1989). Três microlitros de cada reação de PCR foram aplicados em gel de agarose 1% (GIBCO BRL®) contendo *Gel Red* [0,1 µL/mL] (Biotium, USA), em solução de tampão TAE 1X (Tris acetato EDTA- Tris acetato 40 mM e EDTA1 mM). Após a corrida a 80 V por 1 h ou 1h15 as bandas foram visualizadas em transluminador UV e o tamanho destas foi estimado através do marcador de peso molecular 100 bp DNA *Ladder* (Ludwig Biotec, Brasil).

4.3.2.4 Sequenciamento dos fragmentos de DNA

Os seguimentos dos genes *ASR1*, *FPS1*, *GPD1*, *GPD2*, *FLO1*, *FLO8* e *MSS11* amplificados nas cepas de interesse foram encaminhados para serem sequenciados pela empresa MacroGen- Coréia <http://dna.macrogen.com/eng/>.

4.3.2.4.1 Purificação dos produtos de PCR

Para a purificação de cada 10 µL de produto de PCR foram utilizados 4 µL de ExoSAP- IT (USB, USA) e os tubos foram incubados em termociclador *Biometra TGradient Thermal Cycler* (USA) a 37° C por 30 min e depois a 80° C por 15 min para inativação da enzima. A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* a uma absorbância de A_{260} nm.

4.3.2.4.2 Alinhamento das sequências gênicas

Os eletroferogramas obtidos pelo sequenciamento foram visualizados com auxílio do *software* Chromas LITE (v. 2.01) e as sequências gênicas resultantes, foram editadas e exportadas em formato FASTA para o *software* MEGA v. 4 (Tamura *et al.*, 2007) onde foram alinhadas por meio do programa Clustal X2 (Larkin *et al.*, 2007) para a visualização de SNPs.

4.3.2.5 Isolamento de cepas de fenótipos extremos para alta e baixa tolerância ao estresse

Esta parte do experimento foi feita no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) do Departamento de Tecnologia Agro-Industrial e Sócio-Economia Rural, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, Campus de Araras em colaboração com a Professora Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini.

As cepas de levedura de número 1 a 86 (Tab. 5) e as cepas BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1 foram avaliadas em condições estressantes para isolamento de cepas com fenótipos extremos de alta e baixa tolerância ao álcool e a acidez.

4.3.2.5.1 Teste de tolerância ao etanol

4.3.2.5.1.1 Teste de tolerância ao etanol em meio sólido

Uma alçada de cultura de levedura crescida em YPD sólido foi transferida para um tubo estéril contendo 9 mL de solução salina 0,85% estéril. Esta suspensão foi homogeneizada por agitação em vórtex por 15 segundos. Dez microlitros desta mistura foram cuidadosamente depositados na superfície de placas de petri previamente preparadas com YPD/ágar contendo etanol absoluto nas concentrações finais de: 0%; 9%; 12%; 13%; 14%; 15%; 15,5%; 16%; 16,5% e 17%, 17,5% e 18% (v/v). O etanol foi adicionado ao meio liquefeito à temperatura de 50-55°C. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas a 30° C por 3 dias ou até observar crescimento.

4.3.2.5.1.2 Teste de tolerância ao etanol em meio líquido

Algumas cepas que apresentaram crescimento em placas contendo as maiores concentrações de etanol foram testadas em meio líquido segundo Breisha (2010) com algumas modificações:

Uma alçada de cultura de levedura crescida em meio YPD sólido foi transferida para um tubo estéril contendo 3 mL de YPD, homogeneizado e encubado a 30° C sob agitação de 180 rpm por 24 h ou até a absorbância a 600 nm atingir $A_{600} = 1,0$. Cento e cinquenta microlitros desta cultura foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL contendo meio YPM com etanol absoluto nas concentrações finais de: 0%, 5%, 10%, 12% e 15% (v/v). Após um período de incubação de 48 h a 30° C sob agitação de 180 rpm, as culturas foram diluídas seriadamente 10X em solução salina 0,85% estéril. A contagem do número de células viáveis foi feita através da semeadura de 100 µL das diluições de 10^{-4} e 10^{-5} em placas com YPD/ágar após incubação de 48 h a 30° C.

4.3.2.5.2 Teste de tolerância ao pH baixo

Uma alçada de cultura de levedura crescida em YPD sólido foi transferida para um tubo estéril contendo 9 mL de solução salina 0,85% estéril. Esta suspensão foi homogeneizada por agitação em vórtex por 15 segundos. Dez microlitros desta mistura foram cuidadosamente depositados na superfície de placas de petri previamente preparadas com YPD/ágar com pH ajustado para os seguintes valores: 3,0; 2,0; 2,5; 1,5 e 1,0. Os meios acidificados por adição de ácido clorídrico 6N foram autoclavados separando-se a solução nutritiva da solução aquosa de ágar. Logo após a autoclavagem o recipiente dos dois frascos correspondentes foi unido em um único e os meios foram vertidos em placas de petri. As placas inoculadas foram incubadas em estufa a 30°C por 3 dias ou até observar crescimento.

4.3.2.6 Cepas tolerantes às altas concentrações de glicose

Para a procura de SNPs nos genes relacionados ao stress osmótico foram utilizadas as cepas de levedura de fenótipo extremo para alta tolerância (400 e 500 g/L): BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1, 49, 90, 91, 92, 93, 97 e 98 e baixa tolerância às altas concentrações de glicose (250 g/L): 87 e 89 (Tab.-5) testadas por Reis (2011) e cedidas pela Prof^a. Sandra Ceccato Antonini. A metodologia descrita em Reis (2011) segue abaixo:

Como nos ensaios previamente descritos dilui-se a colônia de levedura e 10 µL foram inoculados em placas de meio YPD-ágar contendo glicose nas concentrações finais de 100, 150, 200, 250, 300, 400 e 500 g/L. As placas foram incubadas a 30°C por 3 dias.

4.3.2.7 Cepas floculantes

Para a procura de SNPs nos genes relacionados a floculação foram utilizadas as cepas de levedura de fenótipo floculante: 31, 49, 89, 91, 92, 93, 96 e não floculantes: BG-1, CAT-1, PE-2, SA-1, 1, 55, 87, 88, 94, 95 testadas por Reis (2011) e cedidas pela Prof^a. Sandra Ceccato Antonini. Também foram utilizadas as cepas rugosas: 101 a 104 (Tab.5).

Metodologia do ensaio de floculação conforme descrito em Reis (2011):

“Após o crescimento em meio de multiplicação, as células foram coletadas por centrifugação (4000 rpm, 5 min), lavadas duas vezes com tampão citrato de sódio (50 mM; pH 3,0) contendo 5 mM EDTA, e mais duas vezes com água a 4°C. As células lavadas foram ressuspensas em água destilada a 4°C até atingir uma densidade óptica (a 600 nm) igual a 2,0. A floculação (sedimentação) das células foi determinada na ausência ou presença de solução de cloreto de cálcio a 10 mM. Após uma agitação vigorosa dos tubos, amostras foram retiradas da parte superior do tubo para determinação

da densidade óptica a 600 nm no tempo 0 e após 10 minutos da suspensão ter sido colocada em repouso. A porcentagem da floculação foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Floculação (\%)} = \frac{(A_0 - A_{10}) \times 100}{A_0}$$

Onde,

A₀: absorvância medida no tempo 0

A₁₀: absorvância medida após 10 min.”

4.3.2.8 Análise estatística

O teste do Qui-quadrado (*Chi squared test calculator for two-by-two tables*, disponível em : <http://www.iancampbell.co.uk/twobytwo/calculator.htm>) foi utilizado nas análises de dados em tabelas de contingência utilizadas para a comparações dos genótipos obtidos com todos os fenótipos observados : presença ou ausência de floculação e alta ou baixa tolerância aos estímulos estressantes.

4.3.2.9 Genotipagem utilizando metodologia TaqMan

Duas sondas marcadas com dois fluoróforos distintos - VIC™ e FAM™, específicos para cada alelo foram desenhadas para utilizar o SNP do nucleotídeo 1552 do gene *FPS1* como marcador molecular para tolerância ao álcool. Sessenta e oito cepas oriundas de final de processo fermentativo em indústrias de álcool combustível foram analisadas.

As reações de PCR foram preparadas com o robot - *CAS-1200 Liquid Handling Robot* (Corbett Life Science) utilizando-se o conjunto de reagentes *QuantiFast Probe PCR Kit* e foram constituídas de 5 µL de *2X QuantiFast Probe PCR Master Mix* (Qiagen, Alemanha), 0,25 µL de *Custom TaqMan SNP Genotyping Assays 40X* (Applied Biosystems, USA) (contendo conjunto de oligonucleotídeos e sondas marcadas com dois fluoróforos distintos - VIC™ e FAM™, específicos para cada alelo), 2 µL da preparação de DNA [60 ng] e água ultra pura estéril suficiente para 10 µL. As condições iniciais de amplificação foram 3 min a 95°C seguidos de 40 ciclos a 95°C por 3 s e 60°C por 30 s. Antes e após a realização deste protocolo de amplificação, no *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA), é necessária a leitura dos níveis de fluorescência nos tubos utilizados para a reação através de um ciclo de 30 s a 25°C.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Amplificação dos fragmentos gênicos de interesse

Para a detecção dos SNPs nas cepas nativas de interesse, primeiramente foram investigados a presença destes nas cepas selecionadas de etanol tomando-se como referência as cepas laboratoriais depositadas nos bancos de dados, pois o interesse era encontrar marcadores moleculares que diferenciasssem cepas bem adaptadas às condições de indústria, pois se sabe que uma vez oriundas do ambiente estressante de indústria elas devem ter e tem características especiais que as tornam mais competentes (Argueso *et al.*, 2008).

A grande maioria dos fragmentos de interesse foi amplificada com sucesso nas cepas selecionadas de etanol como mostra a Figura 18. No entanto os pares ScFLO1_F/ ScFLO1_R e ScFLO1_Fb/ ScFLO1_Rb desenhados para amplificar respectivamente 4614 pares de bases e 590 pares de bases do gene *FLO1*, os pares ScMSS11_F/ScMSS11_R e ScMSS11_F1/ScMSS11_R1 que

cobrem respectivamente 720 e 576 pares de bases do gene *MSS11* não foram capazes de gerar produtos de amplificação.

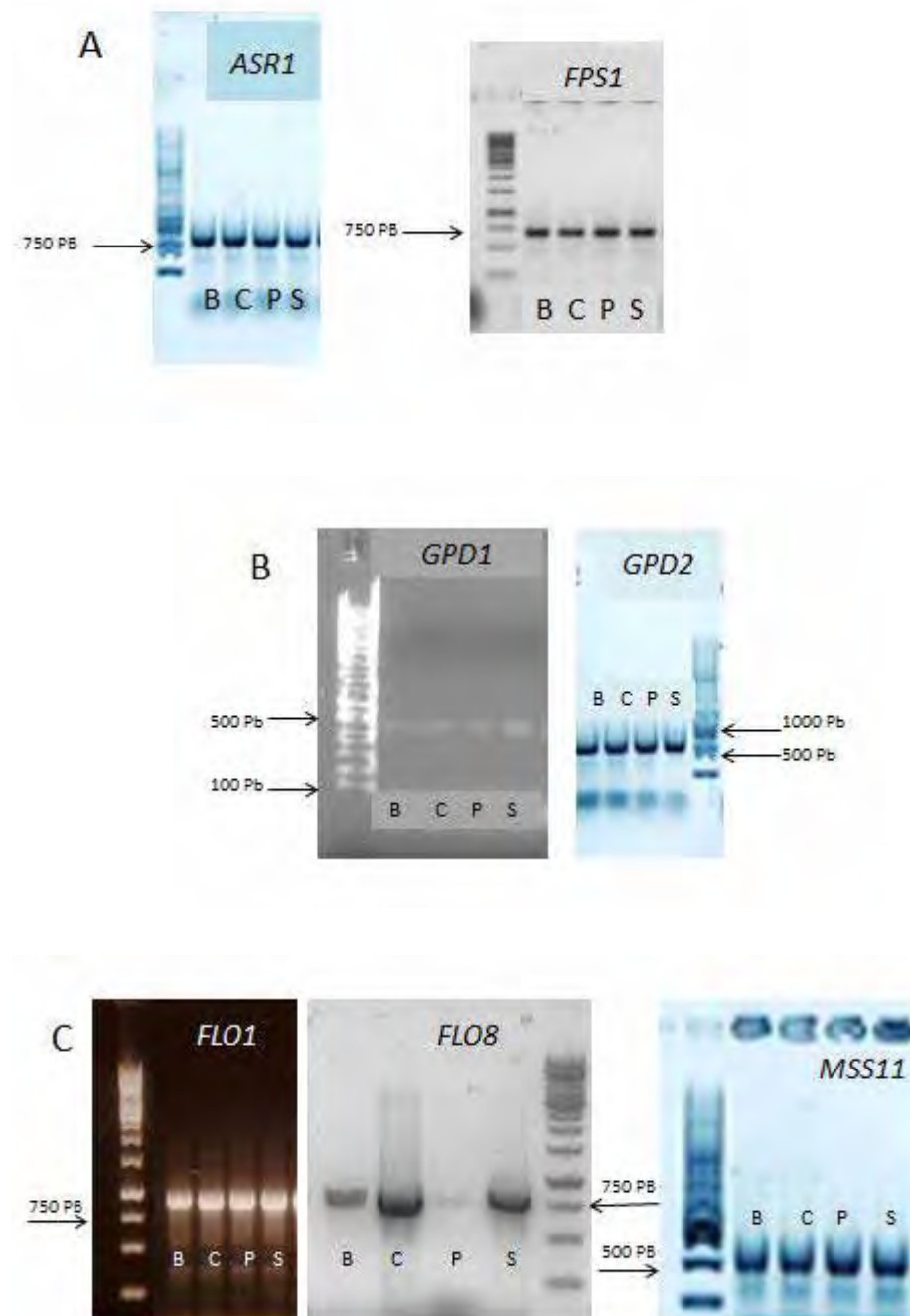


Figura 18. Análise dos fragmentos dos genes de interesse amplificados nas cepas selecionadas de etanol: BG-1 (B), CAT-1 (C), PE-2 (P) e SA-1 (S). A: Amplificação do gene *ASR1* de 867 pb e do fragmento de 701 pb do gene *FPS1*. B: Amplificação dos fragmentos de 489 pb do gene *GPD1* e de 799 pb do gene *GPD2*. C: Amplificação dos fragmentos de 641 pb do gene *FLO1*, de 782 pb do gene *FLO8* e 501 do gene *MSS11*. Peso molecular 1Kb Biolabs. Gel de agarose 1% corado com *GelRed* (Biotium, USA) 0,01% (v/v).

4.4.2 Sequenciamento e alinhamento dos fragmentos amplificados

O alinhamento das sequências obtidas detectou a presença de SNPs em algumas cepas comerciais de etanol. O alinhamento da Figura 19 exemplifica estes resultados.



	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ASR1__BG1_1	T	T	A	T	G	A	T	T	A	A	G	A	A	T	G	C		
ASR1_CAT1	T	C	A	T	G	A	T	T	A	A	G	A	A	T	G	C		
ASR1_PE2	T	C	A	T	G	A	T	T	A	A	G	A	A	T	G	C		
ASR1_SA1	T	T	A	T	G	A	T	T	A	A	G	A	A	T	G	C		
YPR093C Chr 16	T	T	A	T	G	A	T	T	A	A	G	A	A	T	G	C		

Figura 19. Alinhamento de região da sequência codificante do gene ASR1 nas cepas BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1 comparadas com a cepa referência S288c. SNP T>C no nucleotídeo 213. Alinhamento dos fragmentos de DNA feito pelo programa Clustal X2 e visualizado no programa MEGA v.4

A Figura 19 mostra um SNP detectado no nucleotídeo 213 da sequência de 867 pares de bases do gene ASR1 onde as cepas BG-1 e SA-1 apresentam o mesmo alelo T (adenina) que a cepa laboratorial S288c e as cepas CAT-1 e PE-2 apresentam o alelo mutado C (citossina).

Na grande maioria dos genes investigados os resultados foram semelhantes a este. Nos locais de ocorrência de SNPs as cepas BG-1 e SA-1 frequentemente apresentaram o alelo selvagem e as cepas CAT-1 e PE-2 a base mutada.

Sabendo-se que as cepas PE-2 e CAT-1 são mais vigorosas que as laboratoriais e permanecem por mais tempo nas dornas (Amorim *et al.*, 2011), visando relacionar os genótipos encontrados com maior adaptação, foram conduzidos ensaios que permitissem observar o crescimento das linhagens de levedura sob estímulos estressantes.

4.4.3 Caracterização das cepas nativas quanto às condições estressantes do meio

As linhagens de leveduras 1 a 86 e BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1 listadas na Tabela 5 foram caracterizadas quanto à capacidade de crescimento em elevadas concentrações de etanol e em pH baixo.

4.4.3.1 Teste de resistência ao etanol em meio sólido

As cepas estudadas tiveram seu crescimento avaliado em placas com meio sólido contendo etanol em concentrações de 0%, 9%, 12%, 13%, 14%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5% e 18%. O crescimento observado após três dias de incubação são dados na Tabela 7.

Tabela 7-Teste de tolerância das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em meio com várias concentrações de etanol.

Código	Cepas	Porcentagem de Etanol no meio YPD/agar											
		0%	9%	12%	13%	14%	15%	15,5%	16%	16,5%	17%	17,5%	18%
B)	BG-1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–
C)	CAT-1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–
P)	PE-2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–
S)	SA-1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–
1)	VF8 (6)	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2)	M1. 1	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3)	M.9.1	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4)	M.14. 1	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5)	RP. 10.1	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6)	RP. 10.2	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8)	RP. 10.4	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9)	RP. 10.6	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10)	RP. 10.8	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
11)	RP. 10.12	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
12)	RP. 10.13	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13)	RP. 10.14	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14)	SM. 9.1.AL1	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
15)	SM. 9.1.AL2	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
16)	SM. 9.1.AL3	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
17)	SM. 9.1.BL4	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
18)	SM.9.1.BL7	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
19)	SM. 9.2.BL4	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
20)	SM. 9.2.BR3	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
21)	SM. 9.2.BR5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–
22)	SM.9.3.BL4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–
23)	SM.9.3.BL5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–
24)	SM.9.4.AL1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–
25)	SM.9.4.BL2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–
26)	SM.9.4.BL3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–
27)	SM.9.4.BL4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–	–
28)	SM.9.4.BL5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–	–
29)	SM.9.4.LBA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–	–
30)	SM.9.4.BR1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–	–
31)	SM.9.4.BR2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–
32)	SM.8.2.C8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–
33)	SM.8.2.C11	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–
34)	SM.8.2.C13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–
35)	SM.8.2.L12	X	X	X	X	X	X	X	–	–	–	–	–
36)	SM.8.3.mtBL	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–
37)	SM.8.3.M4	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–
38)	SM.8.3.M5	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–
39)	SM.8.3.M6	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Código	Cepas	Porcentagem de etanol no meio YPD/ágar											
		0%	9%	12%	13%	14%	15%	15,5%	16%	16,5%	17%	17,5%	18%
40)	SM.8.3.M9	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
41)	SM.8.7.L7	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–
42)	SM.8.7.L8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–
43)	SM.8.7.L9	X	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
44)	SM.8.7.BR1	X	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
45)	SM.8.7.ctBI1	X	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
46)	SM.8.7.ctBI2	X	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
47)	SM.8.8.BL1	X	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
48)	SM.8.8.CVr1	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–
49)	SA.9.1.5.	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
50)	SA.9.2.BL3	X	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
51)	SA.9.2.BR4	X	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
52)	SA.9.3.BR2	X	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
53)	SA.9.3.VL8	X	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
54)	SA.9.3.VR1	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
55)	SA.9.4.VL4	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–	–	–
56)	SA.9.4.BR2	X	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
57)	SA.10.1.VL1	X	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
58)	SA.10.1.VL8	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–
59)	SA.10.1.VR4	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–
60)	SA.10.1.CVI1	X	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
61)	RP11.4.1	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
62)	RP11.4.5	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
63)	RP11.4.11	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
64)	RP11.4.14	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
65)	P1	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–
66)	P1a	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–
67)	P6	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
68)	P25	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
69)	JP1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	–	–
70)	CTC 001	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–
71)	CTC 002	X	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
72)	CTC 003	X	X	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
73)	CTC 005	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
74)	CTC 007	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
75)	CTC 008	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
76)	CTC 0013	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
77)	CTC 0016	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
78)	F. pão	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
79)	S288c	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
80)	W303	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
81)	Otker (1)	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–
82)	D. Benta (2)	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Código	Cepas	Porcentagem de etanol no meio YPD/ágar											
		0%	9%	12%	13%	14%	15%	15,5%	16%	16,5%	17%	17,5%	18%
83)	Itaiquara	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
84)	Vinho (CK)	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
85)	Cerveja S04	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
86)	Isol. clínico	X	X	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

O resultado das análises revelou que das oitenta e seis cepas testadas, vinte e duas cepas: B, C, P e S, 21,22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 42, 66 e 69 foram capazes de crescer em meio contendo entre 17 e 17,5% de etanol (Tabela-7) e por isto foram consideradas tolerantes ao etanol. As cepas: 67, 68, 74, 76, 78, 83, 84, 85 e 86 foram capazes de crescer somente até a concentração de 9% de etanol e foram consideradas menos tolerantes ao etanol.

Segundo Betz e colaboradores (2004) e Ding e colaboradores (2010) concentrações de álcool acima de 4–6% são estressantes para as células de leveduras podendo levar à inibição do crescimento e morte.

Para um estudo mais apurado da resistência destas leveduras ao álcool as cepas que apresentaram fenótipo extremo para alta e baixa concentração de etanol foram submetidas a teste de tolerância ao etanol em meio líquido.

4.4.3.2 Teste de tolerância ao etanol em meio líquido

Cinco cepas que exibiram crescimento em placas nas duas maiores concentrações de etanol 17% e 17,5%, as 4 cepas selecionadas de etanol BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1 e 5 cepas que cresceram em placas até 9% de etanol foram testadas em líquido contendo 0%, 5%, 10%, 12% e 15% de etanol. Para garantir a inoculação de uma quantidade de células aproximadamente igual a absorbância do pré- inóculo foi corrigida para $A_{600} = 1,0$. O resultado da contagem das células viáveis é mostrado na Tabela 8.

Tabela 8- Teste de tolerância ao etanol em meio líquido

Cepa	Tolerância observada em YPD/ágar + álcool (%)	UFC 10^6 .mL ⁻¹				
		Porcentagem de etanol no meio (v/v)				
		0%	5%	10%	12%	15%
BG-1	17,5	100	75	6	>10 ⁶	>10 ⁶
CAT-1	17,5	91	87	22	> 10 ⁶	>10 ⁶
PE-2	17,5	176	165	33	10	>10 ⁶
SA-1	17,5	442	139	90	21	>10 ⁶
22	17	118	113	36	9	1
24	17	104	104	7	>10 ⁶	>10 ⁶
31	17,5	420	117	35	2	>10 ⁶
34	17	95	83	64	56	>10 ⁶
42	17	150	130	95	3	>10 ⁶
67	9	39	25	12	>10 ⁶	>10 ⁶
68	9	53	41	1	>10 ⁶	>10 ⁶
74	9	159	76	6	>10 ⁶	>10 ⁶
76	9	66	31	12	1	>10 ⁶
84	9	150	100	14	1	>10 ⁶

A Tabela- 8 mostra que a maioria das cepas que foram tolerantes em placas contendo altas concentrações de álcool quando testadas em líquido conseguiram crescer até 12%, enquanto três das cinco cepas menos tolerantes cresceram até 10%.

O fato de não apresentar crescimento nas mesmas concentrações observadas nas placas já era esperado, pois soltas em solução as células estão mais expostas aos agentes do meio. Ding e colaboradores (2010) ao comparar o crescimento de cepas de *S. cerevisiae* em placas e em meio líquido contendo diversas concentrações de etanol observou efeito inibitório do álcool maior em meio líquido.

Para facilitar a visualização um gráfico foi construído com os resultados do teste líquido (Fig. 20).

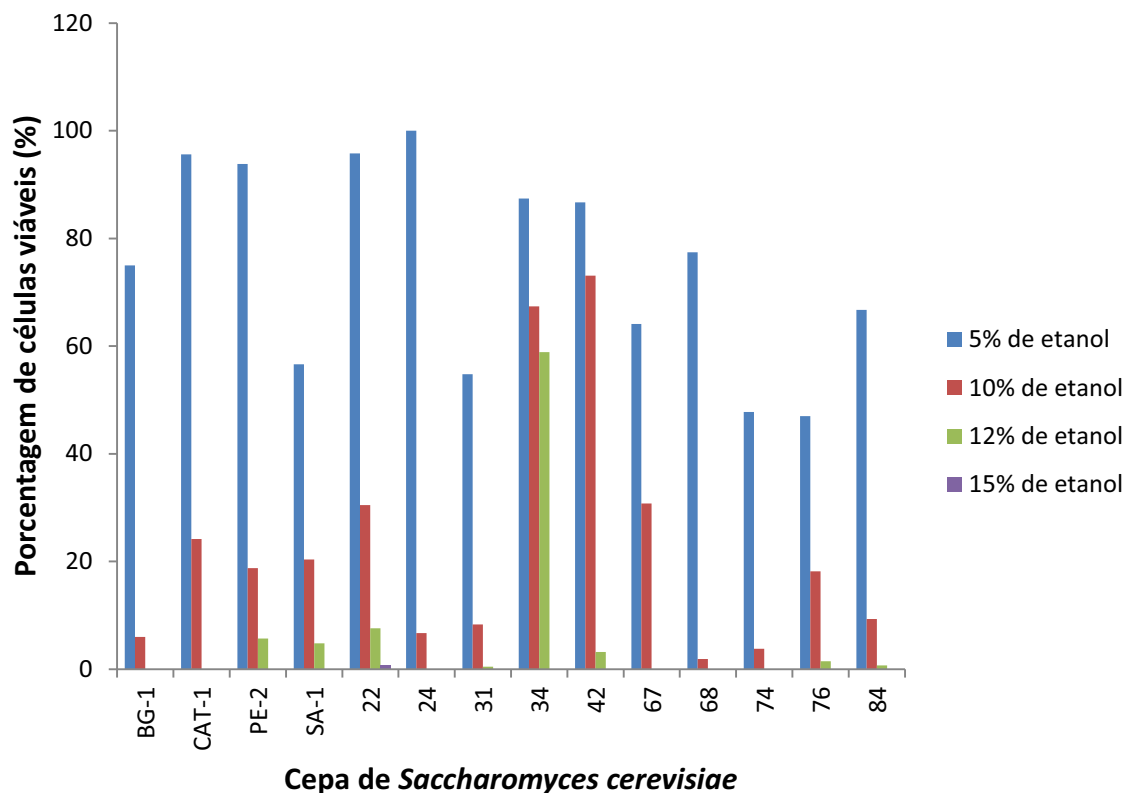


Figura 20. Gráfico da porcentagem de células viáveis em função da concentração de álcool no meio. Frequência de colônias existentes nas concentrações de 5%, 10% e 12% de álcool.

Entre as cepas consideradas tolerantes nos testes em placa a grande maioria apresentou maior quantidade de células vivas em até 5% de álcool, com exceção da cepa SA-1 e 31, enquanto as outras (menos tolerantes) já apresentam uma queda do número de células viáveis nesta concentração. Das nove cepas tolerantes testadas cinco conseguiram crescer até 12% sendo que a cepa 34 apresentou nesta concentração número de células maior do que algumas cepas em 5% de etanol. Somente a cepa 22 teve crescimento até 15% de etanol. E entre as menos tolerantes somente 76 e 84 conseguiram crescer ainda que pouco em 12%.

Os resultados mostram que a maioria das cepas consideradas mais tolerantes ao álcool no teste em placas também foram mais tolerantes no teste em meio líquido.

4.4.3.3 Teste de tolerância ao pH baixo

Com o intuito de conferir se as cepas tolerantes ao álcool eram capazes de crescer em meio com pH baixo, situação frequente na indústria, as cepas estudadas tiveram seu crescimento avaliado em placas com meio sólido contendo vários valores de pH: 6,5 (sem correção); 3,0; 2,5; 2,0; 1,5 e 1,0. O crescimento observado após três dias de incubação são dados na Tabela 10.

Tabela 9- Teste de tolerância das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em meio com vários valores de pH.

Código	Cepas	s/correção	pH do meio YPD/ágar				
			3	2,5	2	1,5	1
B)	BG-1	X	X	X	X	—	—
C)	CAT-2	X	X	X	X	—	—
S)	SA-1	X	X	X	X	—	—
P)	PE-2	X	X	X	X	—	—
1)	VF8 (6)	X	X	X	X	—	—
2)	M1. 1	X	X	X	X	—	—
3)	M.9.1	X	X	X	X	—	—
4)	M.14. 1	X	X	X	X	—	—
5)	RP. 10.1	X	X	X	X	—	—
6)	RP. 10.2	X	X	X	X	—	—
8)	RP. 10.4	X	X	X	X	—	—
9)	RP. 10.6	X	X	X	X	—	—
10)	RP. 10.8	X	X	X	X	—	—
11)	RP. 10.12	X	X	X	X	—	—
12)	RP. 10.13	X	X	X	X	—	—
13)	RP. 10.14	X	X	X	X	—	—
14)	SM. 9.1.AL1	X	X	X	X	—	—
15)	SM. 9.1.AL2	X	X	X	X	—	—
16)	SM. 9.1.AL3	X	X	X	X	—	—
17)	SM. 9.1.BL4	X	X	X	X	—	—
18)	SM.9.1.BL7	X	X	X	X	—	—
19)	SM. 9.2.BL4	X	X	X	X	—	—
20)	SM. 9.2.BR3	X	X	X	X	—	—
21)	SM. 9.2.BR5	X	X	X	X	—	—
22)	SM.9.3.BL4	X	X	X	X	—	—
23)	SM.9.3.BL5	X	X	X	X	—	—
24)	SM.9.4.AL1	X	X	X	X	—	—
25)	SM.9.4.BL2	X	X	X	X	—	—
26)	SM.9.4.BL3	X	X	X	X	—	—
27)	SM.9.4.BL4	X	X	X	X	—	—
28)	SM.9.4.BL5	X	X	X	X	—	—
29)	SM.9.4.LBA	X	X	X	X	—	—
30)	SM.9.4.BR1	X	X	X	X	—	—
31)	SM.9.4.BR2	X	X	X	X	—	—
32)	SM.8.2.C8	X	X	X	X	—	—
33)	SM.8.2.C11	X	X	X	—	—	—
34)	SM.8.2.C13	X	X	X	X	—	—
35)	SM.8.2.L12	X	X	X	X	—	—
36)	SM.8.3.mtBL1	X	X	X	X	—	—
37)	SM.8.3.M4	X	X	X	X	—	—
38)	SM.8.3.M5	X	X	X	X	—	—

		pH do meio YPD/ágar					
	Cepas	s/correção	3	2,5	2	1,5	1
39)	SM.8.3.M6	X	X	X	X	–	–
40)	SM.8.3.M9	X	X	X	X	–	–
41)	SM.8.7.L7	X	X	X	X	–	–
42)	SM.8.7.L8	X	X	X	X	–	–
43)	SM.8.7.L9	X	X	X	X	–	–
44)	SM.8.7.BR1	X	X	X	X	–	–
45)	SM.8.7.ctBL1	X	X	X	X	–	–
46)	SM.8.7.ctBL2	X	X	X	X	–	–
47)	SM.8.8.BL1	X	X	X	X	–	–
48)	SM.8.8.CVR1	X	X	X	X	–	–
49)	SA.9.1.5.	X	X	X	X	X	–
50)	SA.9.2.BL3	X	X	X	X	X	–
51)	SA.9.2.BR4	X	X	X	X	–	–
52)	SA.9.3.BR2	X	X	X	X	–	–
53)	SA.9.3.VL8	X	X	X	X	–	–
54)	SA.9.3.VR1	X	X	X	X	–	–
55)	SA.9.4.VL4	X	X	X	X	X	–
56)	SA.9.4.BR2	X	X	X	X	–	–
57)	SA.10.1.VL1	X	X	X	X	–	–
58)	SA.10.1.VL8	X	X	X	X	–	–
59)	SA.10.1.VR4	X	X	X	X	–	–
60)	SA.10.1.CVL1	X	X	X	X	–	–
61)	RP11.4.1	X	X	X	X	–	–
62)	RP11.4.5	X	X	X	X	–	–
63)	RP11.4.11	X	X	X	X	–	–
64)	RP11.4.14	X	X	X	X	–	–
65)	P1	X	X	X	X	–	–
66)	P1a	X	X	X	X	–	–
67)	P6	X	X	X	–	–	–
68)	P25	X	X	X	X	–	–
69)	JP1	X	X	X	X	–	–
70)	CTC 001	X	X	X	X	–	–
71)	CTC 002	X	X	X	X	–	–
72)	CTC 003	X	X	X	X	–	–
73)	CTC 005	X	X	X	X	–	–
74)	CTC 007	X	X	X	X	–	–
75)	CTC 008	X	X	X	X	–	–
76)	CTC 0013	X	X	X	X	–	–
77)	CTC 0016	X	X	X	X	–	–
78)	Fermento pão	X	X	X	–	–	–
79)	S288c	X	X	X	–	–	–
80)	W303	X	X	X	–	–	–
81)	Otker (1)	X	X	X	–	–	–

		pH do meio YPD/ágar					
	Cepas	s/correção	3	2,5	2	1,5	1
82)	D. Benta (2)	X	X	X	–	–	–
83)	Itaiquara	X	X	X	–	–	–
84)	Vinho (CK)	X	X	X	–	–	–
85)	Cerveja S04	X	X	X	–	–	–
86)	Isol. clínico	X	X	X	–	–	–

A grande maioria das cepas isoladas de processo fermentativo de produção de álcool combustível foram capazes de crescer até pH 2,0. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que embora os valores de pH dos mostos industriais se encontram na faixa de 4,5 a 5,5, para diminuir os efeitos da ação de bactérias, as destilarias brasileiras utilizam o tratamento ácido em pH entre 2,0 – 2,5 suportado pelas leveduras devido a manutenção da homeostase de forma quase independente dos valores do pH do meio (Reis, 2011). Este meio acidificado se torna então um fator de seleção para a população de leveduras (Andrietta *et al.*, 2011), pois tolerância ao pH baixo é um dos fatores que levam à seleção de linhagens de leveduras capazes de dominar o processo (Reis, 2011).

Nenhuma das cepas foi capaz de crescer em pH 1,0 e três cepas isoladas da Usina Santa Adélia (49, 50 e 55) cresceram em pH 1,5 (Tab. 10), sendo que a cepa 55 foi capaz de crescer também até 16% de álcool no meio.

Portanto a cepa 55 parece reunir atributos necessários para sua permanência no processo, pelo menos, através dos parâmetros testados.

De posse dos resultados obtidos nos testes de tolerância, partiu-se para a detecção de SNPs nos genes relacionados ao estresse por álcool.

4.4.4 Relação dos marcadores SNPs e fenótipo

4.4.4.1 Amplificação dos genes selecionados para a procura de SNPs

A maioria dos oligonucleotídeos (Tab. 6) previamente testados nas cepas selecionadas de etanol (Fig. 18) foi capaz de amplificar o DNA das cepas nativas, com exceção do ScFPS1_F/ScFPS1_R desenhado para amplificar 701 pares de bases da sequência final do gene FPS1.

4.4.4.1.1 Genes relacionados à tolerância ao álcool

As sequências obtidas pelo sequenciamento dos genes *ASR1* e *FPS1* nas cepas nativas capazes de crescer em meio sólido contendo 17 e 17,5% de etanol e em pH menor ou igual a 2,0 foram alinhadas e comparadas com sequências das cepas menos tolerantes aos dois estímulos testados e com aquelas disponíveis nas bases de dados.

As Figuras 21 e 22 mostram porções deste alinhamento.

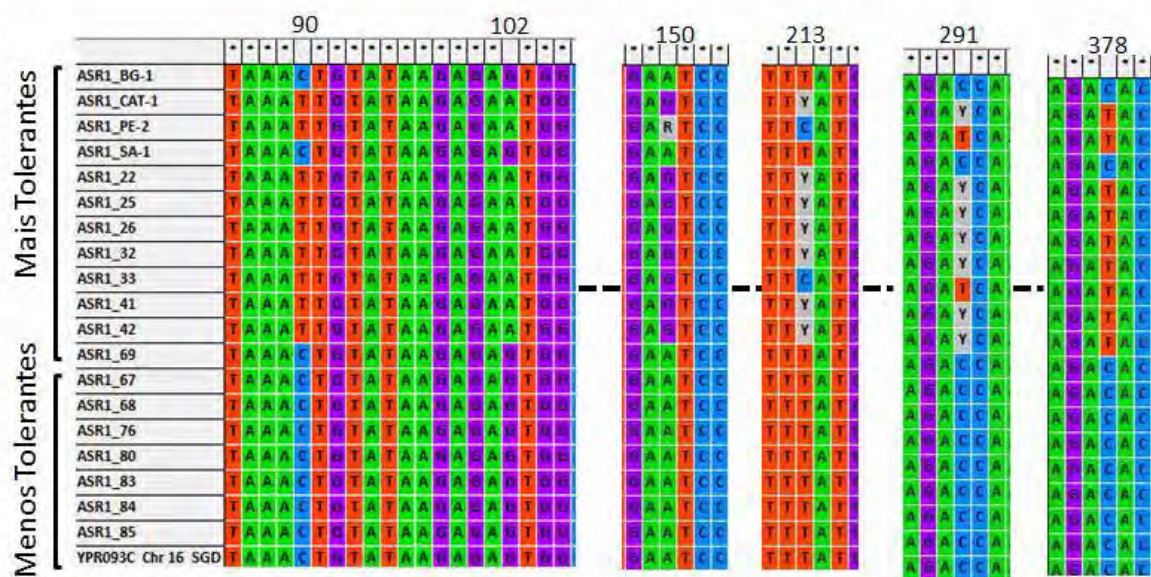


Figura 21. Representação gráfica do alinhamento de regiões do gene *ASR1* amplificado em linhagens tolerantes às concentrações de 17 e 17,5% (mais tolerantes) e 9% (menos tolerantes) de etanol no meio. Alinhamento feito pelo programa Clustal X2 e visualizado no MEGA v. 4.

No trecho de 867 pares de bases sequenciado do gene *ASR1* foram encontrados ao todo 19 SNPs, sendo que 2 são transversões e 17 transições. Nos locais dos SNPs as cepas BG-1 e SA-1 exibem o mesmo alelo que a cepa referência S288c menos tolerantes ao álcool e ao ácido enquanto as cepas PE-2 e CAT-1 e as outras cepas mais tolerantes ao álcool e ao ácido exibem a base mutada (Fig. 21). Todos os SNPs encontrados para este gene codificam mutações sinônimas e não causam mudança de aminoácido na cadeia da proteína.

O seguimento de 701 pares de bases do gene *FPS1* amplificado pelos oligonucleotídeos ScFPS1_F e ScFPS1_R nas cepas selecionadas de etanol, não foi amplificado na maioria das cepas nativas isoladas durante este trabalho, portanto foi necessário desenhar novos oligonucleotídeos (Tab. 6). A Figura 22 mostra o alinhamento de porções deste gene amplificados pelo par de oligonucleotídeos ScFPS1_Fc/ScFPS1_Rc (Tab. 6).

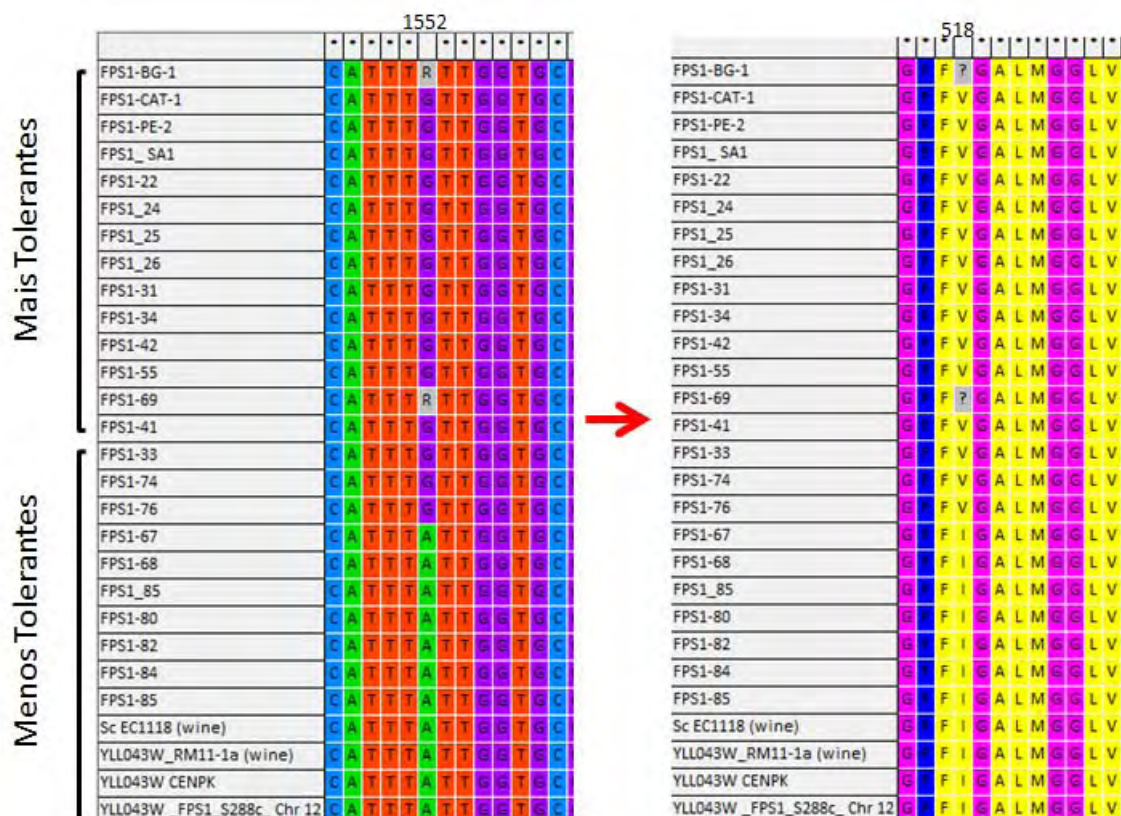


Figura 22. Representação gráfica do alinhamento de porção da proteína Fps1p e do gene *FPS1* amplificado nas linhagens tolerantes às concentrações de 17 e 17,5% (mais tolerantes) e 9% (menos tolerantes) de etanol no meio. Alinhamento feito pelo programa Clustal X2 e visualizado no MEGA v. 4.

Através dos novos pares de oligonucleotídeos utilizados (ScFPS1_Fb/ ScFPS1_Rb e ScFPS1_Fc/ ScFPS1_Rc) foi possível cobrir uma região de 1697 dos 2010 pares de bases da sequência total, onde foram detectados 24 SNPs: 14 transições e 10 transversões. A transição localizada no nucleotídeo 1552 A>G aparece em todas as cepas mais tolerantes ao etanol, neste mesmo local as cepas BG-1 e 69 exibem genótipo heterozigoto (A/G). As cepas menos tolerantes ao etanol possuem o mesmo alelo selvagem (A) que as cepas dos bancos de dados. Aqui é interessante notar que as cepas 74 e 76 apresentaram o alelo mutado G, apesar de serem pouco tolerantes ao crescimento em meio com altas concentrações de álcool.

O SNP encontrado no nucleotídeo 1552 A>G que causa a mudança de aminoácido (I>V) isoleucina para valina na posição 518 do polipeptídeo parece ser um marcador promissor de tolerância à alta concentração de etanol.

4.4.4.1.2 Genes relacionados ao estresse osmótico

Para os genes relacionados ao estresse osmótico foi investigada a presença de SNPs nas cepas consideradas por Reis (2011) tolerantes ao crescimento em placas com altas concentrações de glicose (400 e 500 g/L) e em cepas isoladas do mel e comparou-se estas sequências com outras obtidas nos bancos de dados e pelo sequenciamento de cepas que cresceram até 250 g/L.

Assim o alinhamento dos fragmentos gênicos de 703 pares de bases (do nucleotídeo 63 ao 766) obtidos para o gene *GPD2* revelou a existência de 6 SNPs, dos quais 5 são transversões e 1 transição. A Figura 25 mostra parte deste alinhamento onde se observa o SNP encontrado no nucleotídeo 396 G>A que codifica uma mutação sinônima.

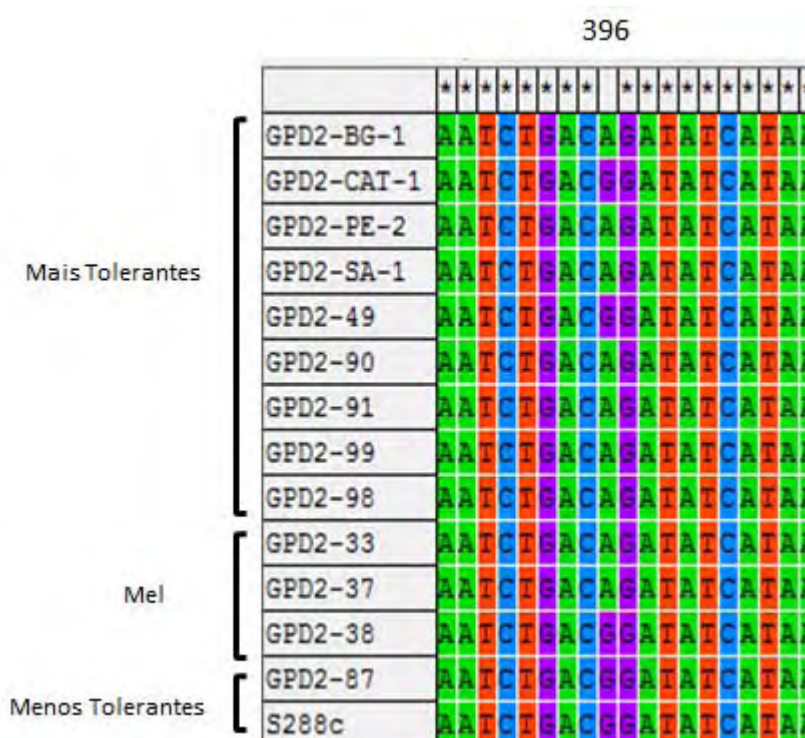


Figura 23. Representação gráfica do alinhamento de porção do gene *GPD2* amplificado nas cepas mais tolerantes e menos tolerantes às altas concentrações de glicose. Alinhamento feito pelo programa Clustal X2 e visualizado no MEGA v. 4.

Para o gene *GPD1* nenhum SNP foi encontrado na região de 489 pares de bases nas cepas sequenciadas.

4.4.4.1.3 Genes relacionados à floculação

Seguimentos dos genes *FLO1*, *FLO8* e *MSS11* relacionados à floculação foram obtidas através do sequenciamento de cepas floculantes (Reis, 2011), cepas rugosas e foram comparadas com sequências de cepas não floculantes (Reis, 2011) e aquelas disponíveis nas bases de dados.

Os oligonucleotídeos desenhados para este gene, conforme mencionado foram desenhados de modo a cobrir domínios específicos da proteína Mss11p: região N-terminal, central e C-terminal, levando em conta os estudos de Bester e colaboradores (2006) os quais relatam que os primeiros 148 aminoácidos da proteína têm ação inibitória da floculação e os domínios que se estendem a partir do aminoácido 148 em direção ao C-terminal parece serem necessários para induzir a floculação, porém os pares de oligonucleotídeos desenhados para amplificar as porções N-terminal ScMSS11-F/ScMSS11_R e central ScMSS11-F1/ScMSS11_R1 do gene não foram capaz de fazê-lo nas cepas nativas isoladas durante este trabalho (Tab. 6).

O alinhamento da sequência de 501 pares de bases (nucleotídeo 1812 ao 2277) do gene *MSS11* revelou ao todo 13 SNPs, sendo 9 transversões e 4 transições, todos codificam mutações

sinônimas e por ocorrerem em somente algumas cepas não podem ser relacionados à característica estudada (Fig. 24).

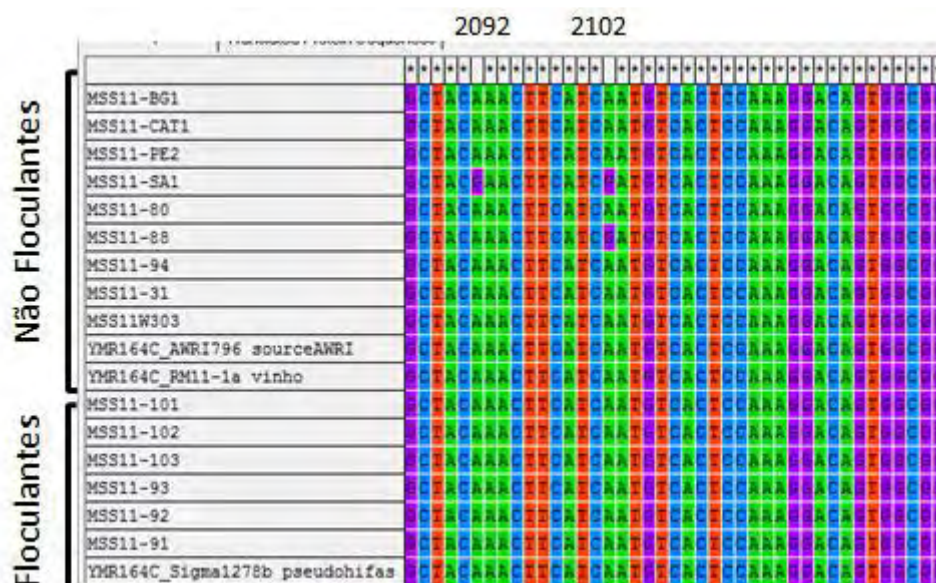


Figura 24. Representação gráfica do alinhamento de porção do gene MSS11 amplificado em linhagens floculantes e não floculantes. Seguimento entre o nucleotídeo 2089 e 2150 correspondentes a porção C-terminal da sequência de aminoácidos do polipeptídeo. Alinhamento feito pelo programa Clustal X2 e visualizado no MEGA v. 4.

O alinhamento das sequências obtidas para o gene *FLO8* revelou a ocorrência de 6 SNPs sendo 4 transições A>G e duas transversões C>T. Na transição detectada no nucleotídeo 608 (Fig. 25), todas as cepas amplificadas exibiram o alelo selvagem (G) tal qual a linhagem Sigma. Esta mutação G>A, exibida pela linhagem laboratorial S288c, codifica um códon de parada de tradução do polipeptídeo que resulta numa proteína não funcional, levando ao fenótipo não floculante (Liu *et al.*, 1996).

Jubany e colaboradores (2008) sequenciaram a mesma porção do *FLO8* e apesar de encontrarem SNPs, também não conseguiram relacioná-los ao aumento ou ausência floculação.

Entre os outros SNPs encontrados as transições: A>G no nucleotídeo 370 e T>C no nucleotídeo 548 levam a mutações não sinônimas que codificam isoleucina para valina (I>V) e valina para alanina (V>A) respectivamente.

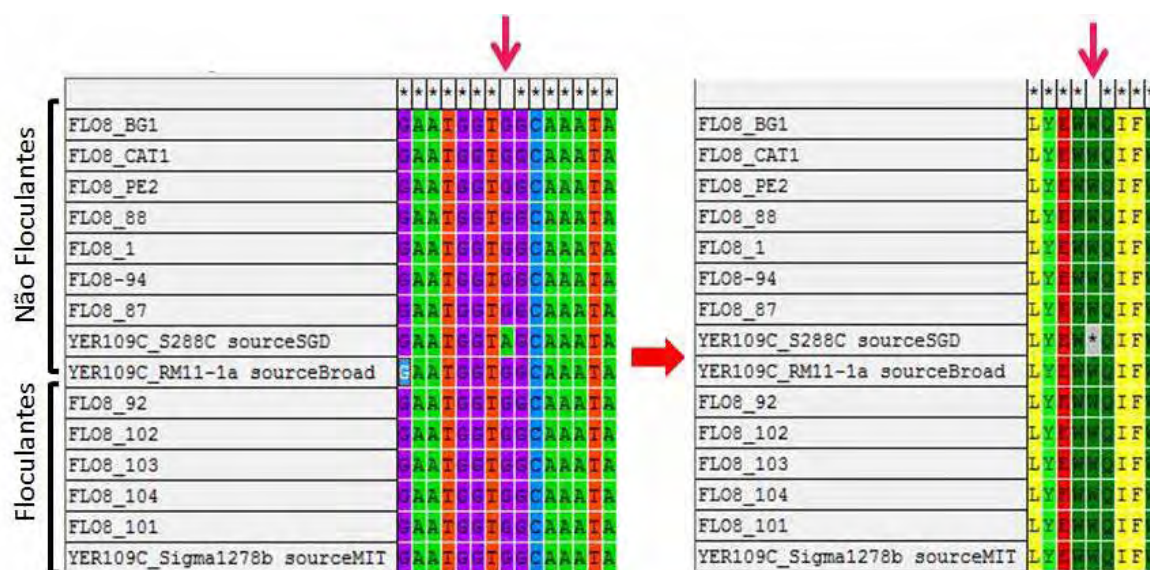


Figura 25. Representação gráfica do alinhamento de porção do gene FLO8 amplificado em linhagens floculantes e não floculantes. Destaque para a mutação nonsense no nucleotídeo 608. Alinhamento feito pelo programa Clustal X2 e visualizado no MEGA v. 4.

Quanto ao gene *FLO1* somente o par de oligonucleotídeos ScFLO1_Fc/ ScFLO1_Rc que amplifica 641 pares de bases (do nucleotídeo 321 ao 961) teve sucesso, embora os oligonucleotídeos tenham sido cuidadosamente desenhados, excluindo-se as regiões repetitivas do gene, o insucesso dos demais pares de oligonucleotídeos pode ser explicado por possíveis polimorfismos na sequência do gene das cepas escolhidas. O resultado do alinhamento das sequências obtidas nas cepas onde foi possível a amplificação do gene *FLO1* pode ser visualizado na Figura 26. Não foram detectados SNPs entre as cepas nativas floculantes e não floculantes, nem tão pouco entre as rugosas. Os SNPs exibidos na Figura 26 são das cepas dos bancos de dados Sigma (floculante) e S288c (não floculante) em relação às cepas nativas e pelo fato destas cepas exibirem os mesmos alelos na região sequenciada, também não é possível a diferenciação entre floculantes e não floculantes.

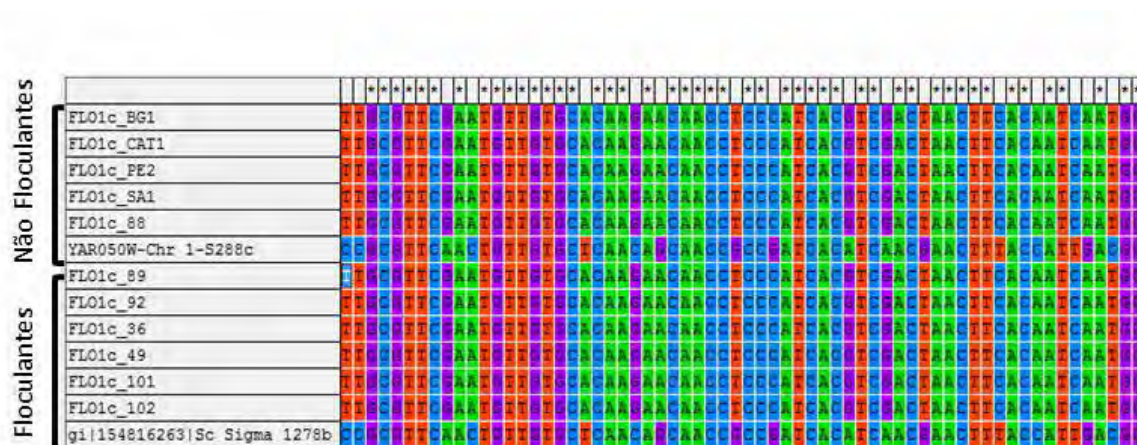


Figura 26. Representação gráfica do alinhamento de trecho do gene FLO1 amplificado em linhagens floculantes e não floculantes. Alinhamento feito pelo programa Clustal X2 e visualizado no MEGA v. 4.

4.4.4.1.4 Análise estatística

O teste do Qui- quadrado (χ^2) foi empregado para examinar a proporção dos genótipos dos genes *ASR1* e *FPS1* e associá-los com o fenótipo de tolerância ao etanol, do gene *GPD2* com fenótipo de tolerância ao estresse osmótico e dos genes *FLO1*, *FLO8* e *MSS11* com a floculação.

Com relação aos SNPs encontrados no gene *ASR1*, não houve associação significativa entre o genótipo e fenótipo, apesar da maioria das cepas tolerantes ao etanol apresentarem o genótipo mutado. Para os SNPs detectados no gene *FPS1* o único que obteve valor significativo foi o do nucleotídeo 1552 (A>G), onde o genótipo mutado (G) ou heterozigoto (A/G) foi significativamente mais frequente para aquelas cepas que apresentaram alta tolerância ao etanol (χ^2 17,52 $P=0,0001$).

Os valores de χ^2 obtidos para os SNPs do gene *GPD2* foram não significativos ($P=0,12$).

Para os genes de floculação não foi possível relacionar a ocorrência de SNPs com a característica fenotípica investigada por conta do baixo número de indivíduos que apresentaram o genótipo mutado.

4.4.4.1.5 Genotipagem de cepas nativas de *S. cerevisiae* por TaqMan.

As sondas TaqMan foram desenhadas para detecção do SNP do nucleotídeo 1552 do gene *FPS1* visando genotipar cepas isoladas do final do processo de fermentação de várias indústrias de álcool combustível. Das 68 cepas nativas analisadas a grande maioria (40) foi genotipada como homozigota para o alelo mutado (G), 20 cepas foram heterozigotas (A/G) e 8 cepas foram homozigotas para o alelo selvagem (A) (Fig.27). Portanto, a frequência do alelo mutado nas cepas analisadas foi de 73,53%. Este resultado corrobora a suspeita de que o alelo mutado (G) possa conferir resistência às altas concentrações de álcool, uma vez que estas cepas são oriundas de final de fermentação. Em vista disso esse SNP pode se mostrar promissor como marcador molecular para a genotipagem de cepas tolerantes ao álcool.

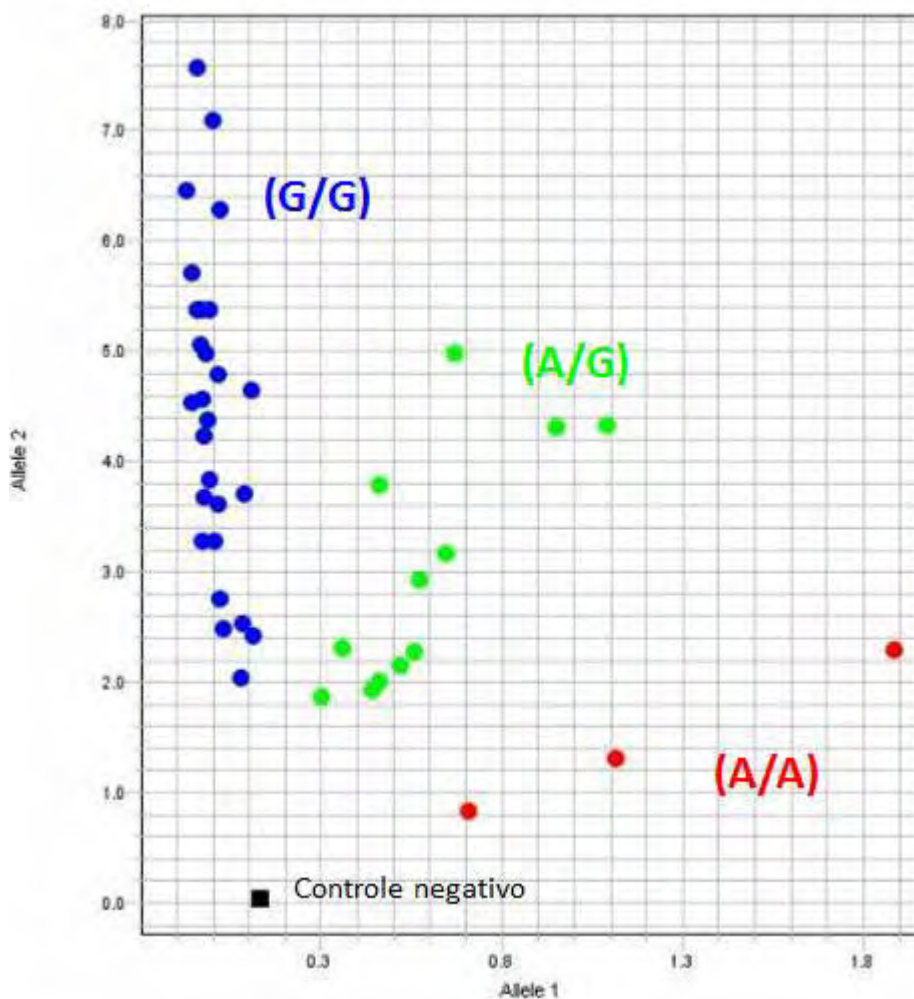


Figura 27. Representação da discriminação alélica de ensaio TaqMan para o SNP do nucleotídeo 1552 do gene *FPS1*. Cor azul= cluster de cepas homozigotas para os alelos G/G; Cor vermelha= cluster de cepas homozigotas para os alelos A/A; Cor verde= cluster de cepas heterozigotas para os alelos A/G; Cor preta= controle negativo.

4.5 Considerações finais

O cenário internacional favorável ao aumento de demanda de etanol pode se configurar em oportunidade para o Brasil. A competitividade da indústria sucroalcooleira no país é reflexo, principalmente, do conhecimento acumulado em décadas de experiência no processo de produção de açúcar e álcool; do aproveitamento energético do bagaço e da pesquisa por técnicas industriais e agrícolas mais eficientes, no entanto muito pouco se investe na melhoria do processo microbiológico e na seleção de cepas adequadas ao processo industrial.

Ainda pouco se sabe a respeito da diversificação dos fenótipos e especialização que possibilitam as cepas nativas de *Saccharomyces cerevisiae* sobreviverem sob diferentes condições de estresse durante centenas de ciclos fermentativos.

Para entender melhor as peculiaridades destas cepas, este trabalho investigou polimorfismos nas sequências de genes relacionados ao estresse e a floculação. Os resultados mostraram que:

- ✓ a maioria das sequências obtidas nas cepas nativas exibiram polimorfismos em relação às cepas laboratoriais

- ✓ com exceção do SNP do nucleotídeo 1552 do gene *FPS1* que parece se mostrar promissor como marcador molecular para tolerância ao álcool, a maioria dos polimorfismos encontrados não pode, pelo menos por enquanto, ser associado aos traços fenotípicos investigados.
- ✓ a cepa 34 tolerante a 17% de álcool e a pH 2,0 parece reunir atributos necessários para sua permanência no processo e após avaliação detalhada de vários parâmetros, pode se tornar uma alternativa para a indústria

5. Referências

- Amorim, H. V. & Oliveira, A. J. (1982) Infecção na fermentação: como evitá-la. *STAB Álcool & Açúcar* **2**(5): 12-18.
- Amorim, H. V.; Basso, L. C. & Lopes, M. L. (2004) Evolution of ethanol fermentation in Brazil. In: J H Bryce & GG Stewart. *Tradition and Innovation*. 2ed. Nottingham University Press. UK.
- Amorim, H. V; Lopes, M. L.; Oliveira, J. V. de C.; Buckeridge, M.S. & Goldman, G.H. (2011). Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol.* **91**: 1267-1275.
- Andrietta, M.G.S.; Andrietta, S.R. & Stupiello, E.N.A. (2011) Bioethanol – What has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane? Biofuel production-recent developments and prospects (Bernardes MAS, ed), pp.67-84. InTech, ISBN: 978-953-307-478-8. Disponível em: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/bioethanol-what-has-brazil-learned-about-yeasts-inhabiting-the-ethanol-production-processes-from-sug>.
- Andrietta, M.G.S.; Andrietta, S.R.; Steckelberg, C.; Stupiello, E.N.A. (2007) Bioethanol - 30 years of Proálcool. *Intern Sugar J.* **109** (1299):195-200.
- Ansell, R.; Granath, K.; Hohmann, S; Thevelein, J.M. & Adler, L. (1997) The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.* **16**(9):2179-87.
- Argueso, J.L. & Pereira A.G.G. (2010) Perspective: Indigenous sugarcane yeast strains as ideal biological platforms for the delivery of next generation biorefining technologies. *Intern. Sugar Journ.* **112** (1334):86-89.
- Argueso, J.L.; Carazzolle, M.F.; Mieczkowski, P.A. *et al.* (2009) Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Res.* **19**: 2258-2270.
- Arlorio, M.; Coisson, J. D.; Martelli, A. (1999) Identification of *Saccharomyces cerevisiae* in bakery products by PCR amplification of the ITS region of ribosomal DNA. *Eur. Food Res. Technol.* **209**:185–191.
- Ayoub, M.J.; Legras, J.L.; Saliba, R. & Gaillardin, C. (2006) Application of Multi Locus Sequence Typing to the analysis of the biodiversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon. *J Appl Microbiol* **100**: 699–711.
- Baleiras Couto, M. M; Eijssma, B.; Hofstra, H.; Huis In't Veld, J.H.J. & van der Vossen, J.M.B.M. (1996) Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl and Environm Microbiol.* **62** (1):41–46.
- Banat, I.M.; Nigam, P.; Singh, D.; Marchant, R. & McHale, A.P. (1998) Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentration: Part I- Yeast in general. *World J.Microbiol.* **13**:809-821.

- Basílio, A. C. M.; Araújo, P. R. L.; de Moraes, J. O. F.; Silva Filho, E. A.; de Moraes, Jr. M. A. & Simões D. A. (2008) Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Curr. Microbiol.* **56**:322–326.
- Basso, L.C.; Amorim, H.V.; Oliveira, A.J. & Lopes, M.L. (2008) Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res.* **8**: 1155–1163.
- Ben-Ari, G.; Zenvirth, D.; Sherman, A.; Simchen, G.; Lavi, U. & Hillel, J. (2005) Application of SNPs for assessing biodiversity and phylogeny among yeast strains. *Heredity* **95**:493-501.
- Bester, M. C.; Pretorius, I. S. & Bauer, F. F. (2006) The regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FLO gene expression and Ca²⁺-dependent flocculation by Flo8p and Mss11p. *Curr. Genet.* **49**: 375–383
- Betz, C.; Schlenstedt, G. & Bailer, S.M. (2004) Asr1p, a novel yeast Ring/PHD finger protein, signals alcohol stress to the nucleus. *The J. Biol. Chem.* **279** (27): 28174–28181.
- Biodieselbr.com- Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/energia/alcool/etanol.htm> Acesso em 29/12/2011.
- Blanco, P.; Ramilo, A.; Cerdeira, M. & Orriols, I. (2006) Genetic diversity of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains in an experimental winery from Galicia (NW Spain). *Anton van Leeuwen.* **89**: 351–357.
- Borneman, A. R.; Forgan, A. H.; Pretorius, I. S. & Chambers, P. J. (2008) Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *FEMS Yeast Reser.* **8**(7):1185-95.
- Bradbury, J.; Richards, K.; Niederer, H.; Lee, S.; Dunbar, P. R. & Gardner, R. (2006) A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. *A van Leeuw.* **89**:27-37.
- Breisha, G.Z. (2010) Production of 16% ethanol from 35% sucrose. *Biomass Bioenerg* **34**:1243-1249.
- Brookes, A.J. (1999) The essence of SNPs. *Gene* **234**:177–186.
- Brosnan, M.P.; Donnelly, D.; James, T.C. & Bond, U. (2000) The stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. *J Appl Microbiol.* **88**(5):746-55.
- Buschiazzi, E & Gemmell, N. J. (2006) The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes *BioEssays* **28**:1040–1050.
- Cappello, M.S.; Blevé, G.; Grieco, F.; Dellaglio, F. & Zacheo, G. (2004) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *J Appl Microbiol.* **97**(6):1274-80.
- Ceccato-Antonini, S.R. (2008) Biotechnological implications of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* **30**:1151–1161.
- CONAB (2006) Companhia Nacional de Abastecimento. Relatório técnico da Companhia Nacional de Abastecimento de Novembro de 2006 (www.conab.gov.br).
- Copersucar (2008) Disponível em: <http://www.copersucar.com.br/institucional/por/academia>.
- Cunha, A. F.; Masswa, S. K.; Gomes, L. H.; Reis, S. F & Pereira, G. A. G. (2006) Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production. *FEMS Yeast Resear.* **6**:280-287.
- de Barros Lopes, M.; Rainieri, S.; Henschke, P.A. & Langridge, P. (1999) AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int J Syst Bacteriol.* **49**:915-24.
- de Barros Lopes, M.; Soden, A.; Martens, A. L.; Henschke, P. A. & Langridge, P. (1998) Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int J Syst Bacteriol* **48**:279-286.
- Ding, J.; Huang, X.; Zhang, L.; Zhao, N.; Yang D.; Zhang K. (2009) Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**:253–263.

- Ding, J; Huang, X; Zhao, N; Gao, F; Lu, Q & Zhang, K. (2010) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol stress involves actions of protein Asr1p. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**(12): 1630–1636.
- Ellegren, H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Rev. Genetics* **5**: 435-445.
- Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F. & Querol, A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol.* **49**:329–337.
- Estruch, F. (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes, and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:469–486.
- Evanno, G.; Regnaut, S. & Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* **14**: 2611–2620.
- Excoffier, L.; Laval, G. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**:47-50.
- Fermentec (2008) Fermentec news. Disponível em: <http://www.fermentec.com.br/>.
- Ferreira, L.V. (2002) Estudo da fermentação alcoólica em frascos agitados. 266p.Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- Field, D. & Wills, C. (1998) Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proc Natl Acad Sci* **95**(4):1647-52.
- Field, D.; Eggert, L.; Metzgar, D.; Rose, R. & Wills, C. (1996) Use of polymorphic short and clustered coding-region microsatellites to distinguish strains of *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **15**(2-3):73-9.
- Figueiredo, C.M.; Alves-Jr, S.L.; Lopes, M.L.; Amorim, H.V.; Stambuk, B.U. (2008) Polimorfismo dos genes que codificam adesinas em leveduras utilizadas na produção industrial de álcool combustível no Brasil. Anais do 54º Congresso Brasileiro de Genética. 218. Salvador, BA.
- Furtado, A. T & Scandiffio, M.I.G.(2007) A Promessa do Etanol no Brasil. *Visages d'Amérique Latine.* **5**: 95-106
- Gallego, F.J.; Perez, M.A.; Martinez, I. & Hidalgo, P. (1998) Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Am. J. Enol. Vitic.* **49**:350-351.
- Goldemberg, J. (2007) Ethanol for a sustainable energy future. *Science* **315**:808–810.
- González-Techera, A.; Jubany, S.; Carrau, F.M. & Gaggero C. (2001) Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Lett Appl Microbiol.* **33**(1):71-5.
- Granchi, L.; Bosco, M.; Messini, A. & Vincenzini, M. (1999) Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *J Appl Microbiol.* **87**(6):949-956.
- Guo, Z.P; Zhang, L.; Ding, Z.Y. & Shi, G.Y. (2011) Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance *Metab Eng.* **13**(1):49-59).
- Hack, C.J. & Marchant, R. (1998) Characterization of a novel thermotolerant yeast, *kluveromyces marxianus* var. *marxianus*: development of an ethanol fermentation process. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **20**:323-327.
- Halme, A.; Bumgarner, S., Styles, C. & Fink, G. R. (2004) Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell.* **116**:405-415.

- Hennequin, C.; Thierry, A.; Richard, G.F.; Lecointre, G.; Nguyen, H.V.; Gaillardin, C. & Dujon, B. (2001) Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Clin. Microbiol.* **39**:551–559.
- Hohmann, S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:300–372.
- Howell, K.S.; Bartowsky, E.J.; Fleet, G.H. & Henschke, P.A. (2004) Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *Lett Appl Microbiol.* **38**(4):315–20.
- Izawa, S.; Ikeda, K.; Kita, T & Inoue, Y. (2006) Asr1, an alcohol-responsive factor of *Saccharomyces cerevisiae*, is dispensable for alcoholic fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* **72**(3):560–565.
- Jubany, S.; Tomasco, I.; Ponce de Leon, I.; Medina, K.; Carrau, F.; Arrambide, N.; Naya, H. & Gaggero, C. (2008) Toward a global database for the molecular typing of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Yeast Res.* **8**: 472–484.
- Kishimoto, M.; Soma, E. & Goto, S.h. (1994) Classification of cryophilic wine yeasts based on electrophoretic karyotype, G+C content and DNA similarity. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **40**:83–93.
- Kobayashi, O.; Hayashi, N.; Kuroki, R. & Sone, H. (1998) Region of Flo1 Proteins Responsible for Sugar Recognition. *J Bacteriol.* **180**(24): 6503–6510.
- Kong, Q.X.; Gu, J.G.; Cao, L.M.; Zhang, A.L.; Chen, X. & Zhao, X.M. (2006) Improved production of ethanol by deleting *FPS1* and over-expressing *GLT1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett.* **28**(24): 2033–8.
- Kruglyak, S.; Durrett, R.; Schug, M.D. & Aquadro, C.F. (2000) Distribution and abundance of microsatellites in the yeast genome can be explained by a balance between slippage events and point mutations. *Mol Biol Evol.* **17**(8):1210–9.
- Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.D.; Gibson, T.J & Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**:2947–2948.
- Lavallée, F.; Salvas Y.; Lamy, S.; Thomas, D.Y.; Degre, R.; & Dulau, L. (1994) PCR and DNA Fingerprinting Used as Quality Control in the Production of Wine Yeast Strains. *Am. J. Enol. Vitic.* **45**:86–91.
- Legras, J-L.; Ruh, O.; Merdinoglu, D. & Karst, F. (2005) Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiol.* **102**:73–83.
- Legras, J-L; Merdinoglu, D.; Cornuet, J-M. & Karst, F. (2007) Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecul Ecol* **16**: 2091–2102.
- Liti, G.; Carter, D.M.; Moses, A. M.; Warringer, J.; *et al.* & Louis, E.J. (2009) Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature.* **358**:337–341.
- Liu, H.; Styles, C.A. & Fink, G.R. (1996) *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. *Genetics.* **144**: 967–978.
- Lopes, M. L. (2010) 30 years of fuel ethanol production in Brazil: identification and selection of dominant industrial yeast strains. ICC-12, Florianópolis, Brazil. Disponível em: <http://www.iccc12.info/presentations/mlopes.pdf>.
- Lucena, B.T.L. (2004) Análise de polimorfismos cromossômicos em linhagens de leveduras de fermentação alcoólica. [tese], Recife, Universidade Federal de Pernambuco.
- Luyten, K.; Albertyn, J.; Skibbe, W. F.; Prior, B. A.; Ramos, J.; Thevelein, J. M. & Hohmann, S. (1995) Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J* **14** (7):1360–1371.

- Manzano, M.; Medrala, D.; Giusto, C.; Bartolomeoli, I.; Urso, R. & Comi, G. (2006) Classical and molecular analyses to characterize commercial dry yeasts used in wine fermentations. *J Appl Microbiol.* **100**(3):599-607.
- Masneuf-Pomarede, I.; Le Jeune, C.; Durrens, P.; Lollier, M.; Aigle, M. & Dubourdieu, D. (2007) Molecular typing of wine yeast strains *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* using microsatellite markers. *Syst Appl Microbiol.* **30**(1):75-82.
- Mills, D.A.; Johannsen, E.A. & Cocolin, L. (2002) Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl Environ Microbiol.* **68**(10):4884-93.
- Mussatto, S.I., Dragone, G.; Guimarães, P. M. R. *et al.* (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnol Advan.* **28**:817–830.
- Nei, M. (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- Nevoigt, E. & Stahl, U. (1997) Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* **21**:231-241.
- Nielsen, D.S.; Honholt, S.; Tano-Debrah, K. & Jespersen, L. (2005) Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast* **22**(4):271-84.
- Oliveira, E.J.; Pádua, J.G.; Zucchi, M.I.; Vencovsky, R. & Vieira, M.L.C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecul Biol.* **29**(2):294-307.
- Palková, Z. & Váchová, L. (2006) Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**:806-824.
- Paschoalini, G. & Alcarde, V.E. (2009) Estudo do processo fermentativo de usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização. *Revista Ciênc & Tecnol.* 16 (32): 59-68.
- Perez, M.A.; Gallego, F.J.; Martinez, I. & Hidalgo, P. (2001) Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Lett Appl Microbiol.* **33**(6):461-6.
- Perkel, J. (2008) SNP genotyping: six technologies that keyed a revolution. *Nat. Meths.* **5**(5): 447-54.
- Pettersson, N; Filipsson, C.; Becit, E.; Brive, L. & Hohmann, S. (2005) Aquaporins in yeasts and filamentous fungi . *Biol. Cell.* **97**: 487–500.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using Multilocus Genotype Data. *Genetics* **155**: 945–959.
- Querol, A.; Barrio, E.; Huerta, T. & Ramon, D. (1992) Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. *Appl Environ Microbiol.* **58**(9):2948-53.
- Reis, V.R. (2011) Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol. [dissertação]. Piracicaba: ESALQ, Universidade de São Paulo.
- Richard, G. F.; Hennequin, C.; Thierry, A. & Dujon, B. (1999) Trinucleotide repeats and other microsatellites in yeasts. *Res Microbiol.* **150**(9-10):589-602.
- Richard, G.F. & Dujon, B. (1996) Distribution and variability of trinucleotide repeats in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* **174**(1):165-74.
- Richard, G.F.; Kerrest, A. & Dujon, B. (2008) Comparative genome and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol. Molec Biol Rev.* **72** (4):686-727.
- Richards, K.; Goddard, M. & Gardner, R. (2009) A database of microsatellite genotypes for *Saccharomyces cerevisiae*. *A van Leeuw.* **96**:355-359.

- Robertson, G.P.; Dale, V.H.; Doering, O.C.; Hamburg, S.P.; Melillo, J.M.; Wander, M.M.; Parton, W.J.; Adler, P.R.; Barney, J.N.; Cruse, R.M. et al., (2008) Agriculture, sustainable biofuels redux. *Science* **322**:49–50.
- Sabate, J.; Cano, J.; Querol, A. & Guillamón, J.M. (1998) Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**:452–455.
- Salles, G; Buso, C.; Ciampi, A. Y.; Moretzsohn, M.C. & Amaral, Z. P. S. (2003) Desenvolvimento e aplicação de marcadores microssatélites em Maçaranduba. *Circular Técnica Embrapa*, 20. 1ª edição, 25 p.
- Santamaria, P.; Garijo, P.; Lopez, R.; Tenorio, C. & Rosa Gutierrez, A. (2005) Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *Int J Food Microbiol.* **103**(1):49-56.
- Schacherer, J. Ruderfer, D. M. Gresham D., Dolinski, K. Botstein, D., Kruglyak L. (2007) Genome-wide analysis of nucleotide-level variation in commonly used *Saccharomyces cerevisiae* strains. *PLoS ONE* **2**(3): e322.
- Schacherer, J.; Shapiro, J. A.; Ruderfer, D.M. & Kruglyak, L. (2009) Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **458**:342-345.
- SGD *Saccharomyces* Genome Database. Disponível em: <http://www.yeastgenome.org/>.
- Silva-Filho, E.A. (2003) Caracterização genética de populações de leveduras de destilarias de álcool combustível para otimização do processo de fermentação. [tese]. Recife: Universidade de Federal de Pernambuco.
- Silva-Filho, E.A.; de Melo, H.F.; Antunes, D.F.; dos Santos, S.K.B.; Resende, A.M., Simões, D.A. & Morais Jr. M.A. (2005 a) Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *J Ind Microb. Biot.* **32**:481–86.
- Silva-Filho, E.A.; dos Santos, S.K.B.; Resende, A.M., de Morais, J.O.F.; de Morais Jr. M.A. & Simões, D.A. (2005b) Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Ant van Leeuwen* **88**:13–23.
- Skelly, P.J. & Clark-Walker, G.D. (1991) Sequence rearrangements at the ori 7 region of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA. *J Mol Evol.* **32**(5):439-42.
- Steckelberg, C. (2001) Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. [Characterization of yeasts from alcoholic fermentation processes using cell composition attributes and kinetic characteristics]. MD Thesis, Campinas: Universidade Estadual de Campinas.
- Stroppa, C. T.; Andrietta, S. R. ; Andrietta, M. G. S. (2003) Caracterização de leveduras floculantes selecionadas em reator tipo torre em uma unidade de fermentação alcoólica. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003, Florianópolis/SC. Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações.
- Tamaz, M. J.; Luyten, K.; Sutherland, F. C.; Hernandez, A.; Albertyn, J.; Valadi, H.; Li, H.; Prior, B. A.; Kilian, S. G.; Ramos, J.; Gustafsson, L.; Thevelein, J. M. & Hohmann, S. (1999) Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol. Microbiol.* **31**:1087–1104.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**:1596-1599.

- Teixeira, M. C.; Raposo, L. R.; Mira, N. P.; Lourenço A. B. & Isabel Sa´ - Correia (2009) Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Applied Environm. Microbiol.* **75**(18):5761–5772.
- UDOP (União dos Produtores de Biocombustíveis) http://www.udop.com.br/download/estatistica/area_cultivada/infraestrutura_usinas_de_stilarias.pdf. Accessed in 9/20/11
- UNICA (2009) União da Indústria de Cana de Açúcar. Disponível em: <http://www.unica.com.br>.
- Valente, P.; Gouveia, F.C.; de Lemos, G.A.; Pimentel, D.; van Elsas, J.D.; Mendoga-Hagler, L.C. & Hagler, A.N. (1996) PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. *FEMS Microbiol Lett.* **137**: 253-256.
- Valero, E.; Schuller, D.; Cambon, B.; Casal, M. & Dequin, S. (2005) Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: a large-scale, 3-years study. *FEMS Yeast Res.* **5**: 959–969.
- van Der Westhuizen, T.J. & Pretorius, I.S. (1992) The value of electrophoretic fingerprinting and karyotyping in wine yeast breeding programmes. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **61**(4):249-57.
- van Mulders, S. E.; Christianen, E.; Saerens, S.M.G.; Daenen, L.; Verbelen, P.J.; Willaert, R.; Verstrepen, K.J. & Delvaux, F.R (2009) Phenotypic diversity of Flo protein family mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **9**: 178–190.
- Verstrepen, K. J.; Derdelinckx, G. & Verachtert, H. (2003) Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiol. Biotechnol.* **61**:197-205.
- Verstrepen, K. J.; Jansen, A.; Lewitter, F. & Fink, G. R. (2005) Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Natur. Genet.* **37**(9):986-990.
- Verstrepen, K.J. & Klis, F.M. (2006) Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **60**: 5–15.
- Vezinhet, F.; Blondin, B. & Hallet, J.N. (1990) Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**:568-571.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**(6):1358-1370.
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S. & Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols. A guide to methods and applications, (Innis, M.A.; Gelfaud, D.H.; Sninsky, J.J. & White, T.J. eds), pp. 315–322. Academic Press, San Diego, CA.
- Wilson, J.I. & Balding, D.J. (1998) Genealogical inference from microsatellite data. *Genetics* **150**: 499–510.
- Wojda, I.; Alonso-Monge, R.; Bebelman, J.; Mager, W. H. & Siderius, M. (2003) Response to high osmotic conditions and elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by intracellular glycerol and involves coordinate activity of MAP kinase pathways. *Microbiology.* **149**:1193–1204.
- Wright, S. (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics.* **15**:323–354.
- Xufre, A.; Albergaria, H.; Inacio, J.; Spencer-Martins, I. & Girio, F. (2006) Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *Int J Food Microbiol.* **108**(3):376-384.

Young, E.T.; Sloan, J.S. & Van Riper, K. (2000) Trinucleotide repeats are clustered in regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **154**(3):1053-68.

APÊNDICE A- Lista das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* autóctones isoladas do vinho fermentado das Usinas São Manoel e Santa Adélia entre 2008 e 2010. Cada cepa recebeu um número de identificação e uma sigla que indica o local, ano e número da coleta e seu aspecto morfológico em meio diferencial WLN quanto à cor, aspecto de superfície e forma da borda da colônia.

Cepa	Cor	Aspecto	Borda	Origem	Localização		
14) SM. 9.1.AL1	Verde claro	Lisa	Redonda	Usina São Manoel, 2009	São Manuel-São Paulo		
15) SM. 9.1.AL2	Verde claro	Lisa	Redonda				
16) SM. 9.1.AL3	Verde claro	Lisa	Redonda				
17) SM. 9.1.BL4	Branca	Lisa	Redonda				
18) SM.9.1.BL7	Branca	Lisa	Redonda				
19) SM. 9.2.BL4	Branca	Lisa	Redonda				
20) SM. 9.2.BR3(L)	Branca	Lisa	Redonda				
21) SM. 9.2.BR5	Branca	Rugosa	Irregular				
22) SM.9.3.BL4	Branca	Lisa	Redonda				
23) SM.9.3.BL5	Branca	Lisa	Redonda				
24) SM.9.4.AL1	Verde claro	Lisa	Redonda				
25) SM.9.4.BL2	Branca	Lisa	Redonda				
26) SM.9.4.BL3	Branca	Lisa	Redonda				
27) SM.9.4.BL4	Branca	Lisa	Redonda				
28) SM.9.4.BL5	Branca	Lisa	Redonda				
29) SM.9.4.LBA	Branca	Lisa	Redonda				
30) SM.9.4.BR1	Branca	Rugosa	Irregular				
31) SM.9.4.BR2	Branca	Rugosa	Irregular				
32) SM.8.2.C8	Verde claro	Lisa	Redonda			Usina São Manoel, 2008	São Manuel-São Paulo
33) SM.8.2.C11	Verde claro	Lisa	Redonda				
34) SM.8.2.C13	Verde claro	Lisa	Redonda				
35) SM.8.2.L12	Verde escuro	Lisa	Redonda				
36) SM.8.3.mtBL1	Branca	Lisa	Redonda				
37) SM.8.3.M4	Branca	Lisa	Redonda				
38) SM.8.3.M5	Verde claro	Lisa	Redonda				
39) SM.8.3.M6	Branca	Lisa	Redonda				
40) SM.8.3.M9	Verde claro	Lisa	Redonda				
41) SM.8.7.L7	Verde escuro	Lisa	Redonda				
42) SM.8.7.L8	Verde claro	Lisa	Redonda				
43) SM.8.7.L9	Branca	Lisa	Redonda				
44) SM.8.7.BR1	Branca	Rugosa	Irregular				
45) SM.8.7.ctBL1	Branca	Lisa	Redonda				
46) SM.8.7.ctBR1	Branca	Rugosa	Irregular				
47) SM.8.8.BL1	Branca	Lisa	Redonda				
48) SM.8.8.CVR1	Verde escuro	Rugosa	Irregular				
49) SA.9.1.5.	Verde claro	Rugosa	Irregular	Usina Santa Adélia, 2009	Jaboticabal-São Paulo		
50) SA.9.2.BL3	Branca	Lisa	Redonda				
51) SA.9.2.BR4	Branca	Rugosa	Irregular				
52) SA.9.3.BR2	Branca	Rugosa	Irregular				
53) SA.9.3.VL8	Verde escuro	Lisa	Redonda				
54) SA.9.3.VR1	Verde escuro	Rugosa	Irregular				
55) SA.9.4.VL4	Verde escuro	Lisa	Redonda				
56) SA.9.4.BR2	Branca	Rugosa	Irregular	Usina Santa Adélia, 2010			
57) SA.10.1.VL1	Verde escuro	Lisa	Redonda				
58) SA.10.1.VL8	Verde escuro	Lisa	Redonda				
59) SA.10.1.VR4	Verde escuro	Rugosa	Irregular				
60) SA.10.1.CVL1	Verde escuro	Lisa	Redonda				

