

**Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP**

**Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas – NUPEB**

**Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – BIOTEC**

Hygor Mezadri

**Análise poligênica da tolerância ao alumínio em *Saccharomyces cerevisiae* por  
mapeamento de QTL**

Ouro Preto

2018

Hygor Mezdri

**Análise poligênica da tolerância ao alumínio em *Saccharomyces cerevisiae* por mapeamento de QTL**

**Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão**

**Coorientadores: PhD. Johan Thevelein**

**PhD. Françoise Dumortier**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia industrial.

Ouro Preto

Março de 2018

M579a Mezdri, Hygor.  
Análise poligênica da tolerância ao alumínio em *Saccharomyces cerevisiae*  
por mapeamento de QTL [manuscrito] / Hygor Mezdri. - 2018.  
74f.: il.: color; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de  
Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.  
Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Alumínio - Biocompatibilidade. 3.  
Bioetanol. I. Brandão, Rogelio Lopes. II. Universidade Federal de Ouro Preto.  
III. Título.

CDU: 582.282.23



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**ATA DE DEFESA DE TESE**

Aos 28 dias do mês de março do ano de 2018, às 13:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese do doutorando Hygor Mezadri, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Rogelio Lopes Brandao (Presidente - UFOP), pelo Prof. Carlos Augusto Rosa (Membro - Externo), pelo Prof. Marcos Rogerio Totola (Membro - Externo), pela Profa. Renata Guerra de Sá Cota (Membro - UFOP), pela Profa. Renata Nascimento de Freitas (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu ao doutorando Hygor Mezadri 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Análise Poligênica da Tolerância ao Alumínio em Células de *Saccharomyces Cerevisiae*", na área de concentração: Biotecnologia Industrial. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas ao candidato sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que o doutorando foi aprovado por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pelo doutorando. Ouro Preto, 28 de março de 2018.

Presidente: \_\_\_\_\_

Membro: \_\_\_\_\_

Membro: \_\_\_\_\_

Membro: \_\_\_\_\_

Membro: \_\_\_\_\_

Doutorando: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Wanderly Mezdri e Iziná Luzia Fioroti, que sempre me apoiaram incondicionalmente em minhas decisões, e aos meus irmãos Handrey e Awdrey, mesmo tão longe, sempre presentes na minha vida, meu muito obrigado com todo amor, carinho e respeito.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Rogelio Lopes Brandão pela oportunidade, pelas críticas construtivas, pelas discussões e reflexões que fizeram de mim um pesquisador melhor.

Ao Professor Johan Thevelein, pela confiança depositada em meu trabalho.

Ao Professor Ieso pela disponibilidade e contribuições.

Às agências de fomento CNPQ, CAPES e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

À Universidade Federal de Ouro Preto pelo ensino público, gratuito e de qualidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e ao NUPEB pela estrutura.

Aos Pós-doutorandos Thiago, Margarete, Raphael, Fabio, Fernanda e Piló pelas contribuições a este trabalho.

Aos Amigos do LBCM, principalmente Ana Clara, Aureliano, Diogo, Felipe, Lorena Thalita, Geraldo e Zezé por todos esses anos de convívio e amizade que levarei para sempre comigo.

À KULeuven, VIB e todas as amizades conquistadas na Bélgica, principalmente, Bruna, Edgar, Frederik, Mekonnen, Hilde Leni, Vaskar, Maria e, especialmente, à Françoise por toda paciência e pela acolhida em terras tão distantes que me tornaram uma pessoa melhor.

Aos meus pais, familiares e amigos pelo apoio e confiança em mim depositados, não me deixando esquecer meus objetivos. Sem vocês eu nada seria.

## RESUMO

O bioetanol é um produto de grande importância econômica, principalmente devido a sua utilização como combustível renovável. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza a sacarose obtida da cana-de-açúcar para produzir bioetanol por fermentação. Alguns fatores diminuem a capacidade fermentativa dessa levedura, por exemplo, a presença de  $Al^{3+}$  no caldo de cana-de-açúcar, levando a um aumento do tempo de fermentação e menor produção de bioetanol. Este trabalho teve como objetivo realizar a análise poligênica da tolerância ao alumínio em *Saccharomyces cerevisiae* utilizando a técnica de mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Locus*). Uma triagem entre 840 estirpes de leveduras isoladas de diferentes ambientes foi feita a fim de selecionar uma altamente tolerante ao alumínio. Dentre as estirpes testadas, a levedura denominada *Bruggeman Fresh* apresentou crescimento e melhor desempenho fermentativo em presença de 5 mM de  $Al_2(SO_4)_3$ . A estirpe PE-2, amplamente utilizada na produção de etanol pela indústria brasileira, apresentou uma maior sensibilidade ao alumínio. Estas duas leveduras, *Bruggeman Fresh* e PE-2, foram escolhidas para a estratégia de análise poligênica para o fenótipo de resistência ao alumínio adotada neste estudo. Após esporulação e dissecação das tétrades, os parentais superior e inferior foram selecionados e cruzados dando origem ao híbrido diploide. Foi realizado um pré-teste em meio sólido contendo alumínio com 658 segregantes obtidos a partir desse híbrido diploide, sendo que 150 segregantes foram selecionados e submetidos ao teste fermentativo. A partir do teste da performance fermentativa em presença de  $Al_2(SO_4)_3$ , 30 segregantes foram selecionados como fenótipo superior (alta tolerância ao alumínio). Foi realizada a extração do DNA genômico desses 30 segregantes agrupados e 120 segregantes não selecionados (agrupados randomicamente), assim como das estirpes parentais superior e inferior e sequenciadas. A partir das análises das sequências e mapeamento de QTL foi encontrada uma região no cromossomo VI com grande ligação ao fenótipo de interesse, observado devido à diferença na frequência dos SNPs entre os grupos selecionado e não selecionado. Após a análise de reciprocidade hemizigótica, foi identificado que o gene *FAB1* tem um importante papel sobre a tolerância ao alumínio em *S. cerevisiae*.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. QTL. Tolerância ao Alumínio. Bioetanol. *FAB1*.

## ABSTRACT

Bioethanol is a product of great economic importance, mainly due to its use as a renewable fuel. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* uses the sucrose obtained from sugarcane to produce bioethanol by fermentation. Some factors decrease its fermentation capacity, such as the presence of  $Al^{3+}$  in sugarcane juice, leading to an increase in fermentation time and lower production of bioethanol. This work aimed to perform the polygenic analysis of aluminum tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* using the Quantitative Trait Locus (QTL) mapping technique. A screening of 840 isolated yeast strains from different environments was done in order to select a highly tolerant to aluminum one. Among the tested strains, the yeast denominated Bruggeman Fresh showed growth and better fermentative performance in the presence of 5 mM  $Al_2(SO_4)_3$ . The PE-2 strain, widely used in the production of ethanol by the Brazilian industry, showed higher sensitivity to aluminum. These two yeasts, Bruggeman Fresh and PE-2, were chosen for the polygenic analysis strategy for the aluminum resistance phenotype in this study. After sporulation and dissection of the tetrad, the superior and inferior parent were selected and crossed to give rise to the diploid hybrid. A pre-test was carried out in solid medium containing aluminum with 658 segregants obtained from this hybrid diploid, 150 segregants were selected and submitted to the fermentation test. From the fermentation performance test in presence of  $Al_2(SO_4)_3$ , 30 segregants were selected as superior phenotype (high tolerance to aluminum). Genomic DNA was extracted from these 30 grouped segregants and 120 non-selected segregators (random group), as well as the upper and lower and sequenced parental strains. From the analysis of the sequences and mapping of QTL, a region was found on chromosome VI with great connection to the phenotype of interest, observed due to the difference in the frequency of SNPs between the selected and non-selected groups. After the hemizygous reciprocity analysis it was identified that the *FABI* gene has an important role on aluminum tolerance in *S. cerevisiae*.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. QTL. Aluminium tolerance. Bioethanol. *FABI*.

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1– Processo de produção do etanol .....	3
1.2 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	4
1.3 – Condições ambientais de estresse para a levedura.....	9
1.4 – Estresse e tolerância ao alumínio em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	11
1.5 – Análise poligênica por mapeamento de QTL ( <i>Quantitative traits locus</i> ) .....	12
1.6 – Análise de segregantes agrupados (BSA – <i>Bulk Segregant Analysis</i> ) .....	14
1.7 – Análise de reciprocidade hemizigótica .....	16
<b>2 – OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 – Objetivo Geral .....	17
2.2 – Objetivos Específicos .....	17
<b>3 – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1 – Micro-organismos e seleção das estirpes de levedura .....	18
3.2 – Esporulação e dissecação de tétrades .....	18
3.3 – Determinação do <i>mating type</i> .....	19
3.4 – Determinação da ploidia.....	19
3.5 – Cruzamento dos parentais.....	20
3.6 – Fermentação em escala laboratorial.....	20
3.7 – Preparação das amostras de DNA e sequenciamento .....	22
3.8 – Análise das sequências e mapeamento dos QTLs.....	22
3.9 – Análise de Reciprocidade Hemizigótica (ARH) .....	23
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
4.1 – Seleção de leveduras tolerantes ao alumínio.....	25
4.2 – Esporulação e análise das tétrades e obtenção de segregantes das estirpes com fenótipo superior e inferior .....	26
4.3 – Testes fermentativos.....	27
4.4 – Determinação do <i>mating type</i> dos segregantes.....	29
4.6 – Determinação do conteúdo de DNA .....	34
4.7 – Seleção dos segregantes para o mapeamento por QTLs.....	37

<b>4.8 – Mapeamento de QTL por sequenciamento completo de segregantes agrupados (BSA) .....</b>	<b>40</b>
<b>4.9 – Análise de Reciprocidade Hemizigótica (ARH) .....</b>	<b>43</b>
<b>5 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>48</b>
<b>6 – PERSPECTIVAS .....</b>	<b>49</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>50</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção mundial de etanol por país e/ou região de 2007 a 2015 .....	2
Figura 2: Via metabólica da fermentação do etanol em <i>S. cerevisiae</i> .....	5
Figura 3: Estágios da formação de esporos e ascus em <i>S. cerevisiae</i> .....	7
Figura 4: Representação do ciclo de vida homotático em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	9
Figura 5: Representação esquemática do método de mapeamento por QTL. ....	13
Figura 6: BSA para mapeamento de regiões genômicas ligadas a um fenótipo de interesse em leveduras.. .....	15
Figura 7: Esquema da Análise de Reciprocidade Hemizigótica. ....	16
Figura 8: Esquema da metodologia de fermentação em escala laboratorial.....	21
Figura 9: Equações químicas balanceadas da produção de etanol por fermentação. ....	21
Figura 10: Estratégia de recombinação utilizada para construir estirpes para a Análise de Reciprocidade Hemizigótica.....	24
Figura 11: Perfil fermentativo de estirpes de leveduras em meio YPS 20% contendo 5 mM de $Al_2(SO_4)_3$ . ....	26
Figura 12: Gráfico da perda de peso pelo tempo dos segregantes da estirpe <i>Bruggeman fresh</i> . ....	28
Figura 13: Gráfico da perda de peso pelo tempo dos segregantes da estirpe industrial PE-2. ....	29
Figura 14: Gel de eletroforese de determinação do <i>mating type</i> do segregante da estirpe superior <i>Bruggeman fresh</i> 8C, demonstrando o <i>mating type</i> a, e do segregante da estirpe inferior PE-2 5A que tem o <i>mating type</i> $\alpha$ . ....	30
Figura 15: Gel de eletroforese das colônias do cruzamento P5AxB8C para análise do <i>mating type</i> .....	31
Figura 16: Gel de eletroforese das colônias dos cruzamentos P2AxB8C e P8CxB8C, para análise do <i>mating type</i> .....	32
Figura 17: Análise do crescimento dos segregantes após dissecação das tétrades em micromanipulador.....	33
Figura 18: Análise de citometria de fluxo para determinação de conteúdo de DNA. ....	34

Figura 19: Segregantes do aneuplóide 20D obtido do cruzamento entre B8CxP5A.....	35
Figura 20: Análise do conteúdo de DNA dos segregantes superiores e inferiores e do cruzamento entre eles.....	36
Figura 21: Placa meio YPS 2% ágar à esquerda e placa YPS 2% ágar + Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> em uma concentração de 17 mM à direita, mostrando os segregantes que apresentam tolerância ao alumínio para o crescimento. ....	38
Figura 22: Perfil fermentativo dos 30 segregantes superiores para o fenótipo de tolerância ao alumínio. ....	39
Figura 23: Mapeamento genético dos QTLs envolvidos com a tolerância ao alumínio. ....	42
Figura 24: Genes identificados no QTL do cromossomo VI.....	43
Figura 25: Análise de Reciprocidade Hemizigótica. Fermentação realizada em meio YPS 20% com 5mM de Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> . ....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estirpes e percentuais de eficiência de esporulação. ....	32
Tabela 2: Segregantes com DNA sequenciado.....	40
Tabela 3: Alinhamento dos SNPs das cepas 8.20D (superior), P5A (inferior), LBCM 47 e S288c. Aminoácido identificado nos parentais superior e inferior nas posições dos SNPs com a respectiva identidade nestas posições. ....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFDC: *Alternative Fuels Data Center*

ARH: Análise de reciprocidade hemizigótica

ATP: Adenosina trifosfato

BSA: *Bulk segregant analysis*

CNV: *Copy number variation*

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

D.O.<sub>600nm</sub>: Densidade ótica a 600nm

DAG: Diacilglicerol

DNA: Ácido desoxirribonucleico

HMM: *Hidden Markov Model*

INDELS: Inserção ou deleção de bases ao genoma

IP3: 1,4,5 – Fosfatidilinositol trifosfato

NGSEP: *Next Generation Sequencing Experience Platform*

ORF: *Open reading frame*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PI(3,5)P2: Fosfatidilinositol 3,5 bifosfato

PLC: *Phospholipase C*

Proálcool: Programa nacional do álcool

PtdIns: Fosfatidilinositol

QTL: *Quantitative trait locus*

RFLP: *Restriction fragment length polymorphism*

SGD: *Saccharomyces cerevisiae database*

SNP: *Single nucleotide polymorphism*

SNV: *Single nucleotide variants*

SSR: *Simple sequence repeats*

VCF: *Variant call format*

YP: Meio extrato de levedura e Peptona

YPD: Meio extrato de levedura, Peptona e Dextrose

YPS: Meio extrato de levedura, Peptona e Sacarose



## 1 – INTRODUÇÃO

O interesse de diversos países, como Brasil, Estados Unidos, Canadá, Japão, China, Índia e alguns países da Europa, na utilização de biocombustíveis está relacionado à sua baixa emissão de gases poluentes e à grande oscilação dos preços dos combustíveis fósseis no mercado. A utilização de etanol no lugar da gasolina pode reduzir a emissão de carbono em 80% e eliminar completamente a emissão de dióxido de enxofre (Mussatto, Dragone et al. 2010).

O Brasil tem tradição na produção de bioetanol utilizando cana-de-açúcar, que apresenta balanço energético mais favorável quando comparado a outras culturas. Em 1927, um programa pioneiro para produção de álcool combustível foi instalado no Brasil e continuou até meados da década seguinte de maneira incipiente. Com a crise do petróleo no início dos anos 70 do século passado e tendo como intenção a redução do consumo de derivados do petróleo, o Governo Brasileiro criou, por meio do decreto-lei nº 76.593 de 14 de novembro de 1975, o Programa Nacional do Álcool – PROÁLCOOL. Em 1977, foi incentivado o uso de automóveis movidos a álcool, o que levou a um aumento no consumo desse combustível e expandindo, assim, sua produção. Dentre as vantagens estava a redução na importação de petróleo, equilibrando a balança comercial, o incentivo à agricultura com a produção da cana-de-açúcar, além da criação de novos empregos nas refinarias, destilarias e indústrias fornecedoras de equipamentos (Andrade, Carvalho et al. 2010). Em 1999, com a evolução da indústria sucroalcooleira, o PROÁLCOOL foi extinto, permitindo mais incentivos para investimentos privados e reduzindo a intervenção estatal (Mussatto, Dragone et al. 2010).

A obrigatoriedade da adição do etanol à gasolina, mantida no país há mais de três décadas, e a manutenção da pequena preferência tributária na compra dos veículos “flex”, que utilizam tanto gasolina quanto bioetanol como combustíveis, são incentivos governamentais importantes, pois oferecem sinais de aumento do mercado aos produtores (Bastos 2007). O Brasil é um produtor de bioetanol muito competitivo no cenário mundial. Seu mercado interno para esse tipo de combustível é bem desenvolvido, principalmente pelo crescimento de vendas dos carros “flex” (Ibeto, Ofoefule et al. 2011).

Além disso, a Lei 13.033 de 24 de setembro de 2014 elevou o percentual de álcool adicionado à gasolina de 25% para 27%, o que representou um aumento de mais de 1 bilhão de litros de etanol por ano.

A produção mundial de etanol foi crescente até o ano de 2010, sendo os Estados Unidos da América o maior produtor de etanol na atualidade (Figura 1). Esse fato se deve à criação em 2005 da Lei de Política Energética dos Estados Unidos, que instituiu o Padrão de Combustíveis Renováveis, um programa que determina o consumo de ao menos 136 bilhões de litros de biocombustíveis até 2022 (A.F.D.C, 2015). Políticas como essa têm sido adotadas em diferentes partes do mundo, o que potencializa a utilização dos combustíveis renováveis.

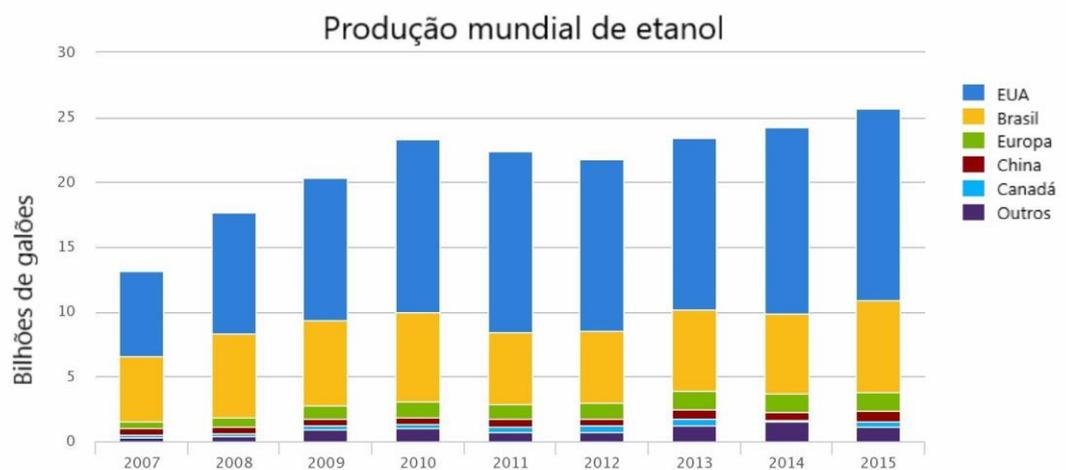


Figura 1: Produção mundial de etanol por país e/ou região de 2007 a 2015 (A.F.D.C., 2015).

A substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis tem sido estimulada pelos governos, não apenas em virtude da volatilidade e do aumento dos preços do petróleo, mas também pela perspectiva de esgotamento das reservas mundiais dentro de, no máximo, setenta anos. Além disso, existe a preocupação com as emissões de dióxido de carbono na atmosfera, sendo o montante de CO<sub>2</sub> emitido na queima do etanol praticamente igual ao absorvido pelas plantas em sua produção (Bastos 2007).

## 1.1 – Processo de produção do etanol

A produção de etanol se dá pela fermentação de açúcares simples ou polissacarídeos, como amido e celulose, que podem ser convertidos em açúcares fermentáveis. O processo produtivo geralmente é realizado em 3 etapas: obtenção de uma solução de açúcares fermentáveis, fermentação dos açúcares em etanol e a separação e purificação do etanol (Demirbaş 2005). A principal diferença entre os processos de produção de etanol a partir de açúcares simples, amido e material lignocelulósico está na obtenção dos açúcares fermentáveis. Na produção de etanol a partir do amido, é necessário um processo de sacarificação antes da fermentação. Nesse processo, o amido é gelatinizado por cozimento e, então, submetido a uma hidrólise enzimática para dar origem a monômeros de glicose (Mussatto, Dragone et al. 2010).

Em materiais lignocelulósicos, incluindo a celulose e hemicelulose, o processo envolvido é mais complexo e tem um custo mais elevado. Os materiais lignocelulósicos são subprodutos de atividades agrícolas e resíduos industriais (como o bagaço da cana-de-açúcar), demonstrando grande potencial como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração (Mussatto, Dragone et al. 2010).

No pré-tratamento, enzimas são responsáveis por quebrar a celulose, a lignina e a hemicelulose, facilitando a hidrólise e a produção do etanol. A hidrólise da celulose gera glicose, enquanto a hidrólise da hemicelulose leva à formação de pentoses e hexoses, que serão utilizadas na fermentação para a produção de bioetanol.

A produção de etanol a partir da beterraba e da cana-de-açúcar necessita apenas do processo de moagem para a extração dos açúcares fermentáveis, o que torna esses processos mais simples. Nesse último, a fermentação pode ocorrer utilizando tanto o caldo da cana quanto o melaço, geralmente obtido como um subproduto após a extração do açúcar (İçöz, Tuğrul et al. 2009).

A produção de bioetanol tendo a cana-de-açúcar como substrato é um processo bem estabelecido pela indústria brasileira. Há um grande interesse em aperfeiçoar esses processos para que o bioetanol seja um produto cada vez mais competitivo no âmbito energético. Além disso, a cana-de-açúcar contribui para a redução dos custos, uma vez

que o rendimento da fermentação é superior ao de outras matérias-primas, como o milho (Basso, de Amorim et al. 2008).

Na produção industrial de etanol são utilizadas leveduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, devido a sua alta capacidade fermentativa, alta tolerância ao etanol e outros inibidores. Apesar disso, o desenvolvimento de estirpes com uma maior produtividade de etanol é o objetivo de muitos estudos na área biotecnológica (Knauf and Kraus 2006).

Em termos gerais, a principal via metabólica envolvida na produção de etanol por leveduras é a glicólise, na qual uma molécula de glicose é oxidada produzindo duas moléculas de piruvato. Nas condições de produção (alta densidade celular e alta concentração de açúcares), o piruvato é reduzido a etanol com a liberação de uma molécula de gás carbônico (Bai, Anderson et al. 2008).

No processo de produção de bioetanol no Brasil, o caldo de cana e o melaço são utilizados como substratos e as concentrações de etanol entre 8-11% são alcançadas no período de 6-11 horas. Após essa rápida fermentação, as células de leveduras são coletadas por centrifugação, lavadas com ácido (para reduzir as contaminações bacterianas) e são reutilizadas em novo ciclo fermentativo (Basso, de Amorim et al. 2008). Nesse processo, a levedura passa por um tratamento com ácido sulfúrico em pH de 2.0 a 3.2 durante uma a duas horas para a redução da carga microbiana contaminante (Menezes 1980, AMORIM 2001).

## 1.2 – *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular, geralmente diploide, que se reproduz assexuadamente por brotamento (Boulton and Quain 2008), ou sexuadamente por esporulação e consequente cruzamento entre haploides com formação dos diploides (Pretorius 2000). *S. cerevisiae* apresenta um papel de extrema importância para a vida humana há milhares de anos, sendo utilizados na produção de pães e bebidas alcoólicas (McGovern, Zhang et al. 2004, Legras, Merdinoglu et al. 2007). Esses micro-organismos são também utilizados como modelos para diversos estudos genéticos, bioquímicos e fisiológicos sendo um dos primeiros organismos eucariotos a ter o seu genoma totalmente sequenciado (Goffeau, Barrell et al. 1996). Além do seu importante papel na produção de

alimentos e bebidas, essas leveduras desempenham papel fundamental na produção industrial de bioetanol. *S. cerevisiae* é um organismo anaeróbico facultativo, e uma das suas principais características é a capacidade de fermentar açúcares para produção de etanol (Sherman 2002).

A glicólise é a principal via metabólica envolvida na produção de etanol (Figura 2): para cada molécula de glicose oxidada, duas moléculas de piruvato são produzidas. O piruvato é, então, reduzido a etanol com a liberação de CO<sub>2</sub>. O rendimento teórico é de 0,511g de etanol e 0,489 g de gás carbônico para cada 1g de glicose metabolizada. Além de etanol e gás carbônico, vários outros subprodutos são também produzidos durante a fermentação alcoólica, sendo o glicerol o principal (Bai, Anderson et al. 2008).

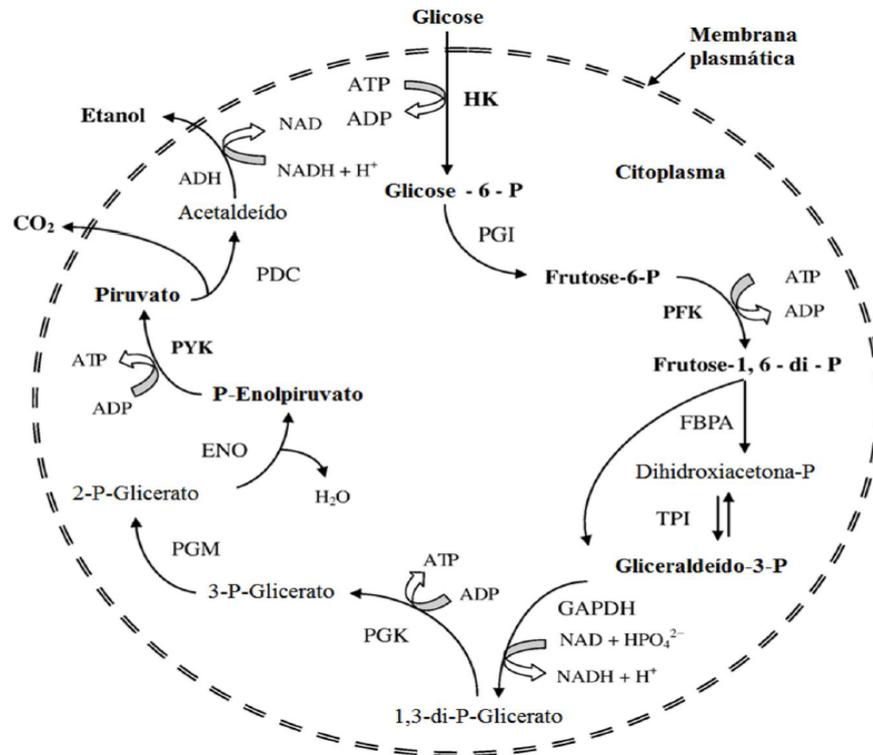


Figura 2: Via metabólica da fermentação do etanol em *S. cerevisiae* (Abreviaturas: HK: hexoquinase; PGI: fosfoglicoisomerase; PFK: fosfofrutoquinase; FBPA: frutose bifosfato aldolase; TPI: triose fosfato isomerase; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK: fosfoglicerato quinase; PGM: fosfogliceromutase; ENO: enolase;

PYK: piruvato quinase; PDC: piruvato descarboxilase; ADH: álcool desidrogenase).  
(Bai et al., 2008).

Como as células de leveduras *S. cerevisiae* não apresentam motilidade, dependem da disponibilidade de nutrientes ao seu redor. Na presença de nutrientes, independentemente da ploidia, as células seguem o ciclo mitótico, se proliferando por brotamento. Em ambientes com escassez de nutrientes, as células haploides se encontram numa fase estacionária inativa, enquanto as diploides iniciam a via de diferenciação chamada de esporulação (Piekarska, Rytka et al. 2010).

A esporulação ocorre em três fases principais. A fase inicial ocorre quando as células se diferenciam em esporos (Mitchell 1994). Isso leva do ciclo mitótico na fase G1 para a fase S pré-meiótica. Após a replicação do DNA, ocorre recombinação homóloga e emparelhamento, caracterizando uma etapa do ciclo conhecida como prófase (Shuster and Byers 1989, Clancy, Shambaugh et al. 2002). Na fase seguinte ocorrem os eventos citológicos de esporulação em que as divisões meióticas originam quatro núcleos haploides. A fase final da formação dos ascósporos ocorre após o encerramento da membrana pró-esporo, sendo formada a parede em torno de cada esporo (Briza, Breitenbach et al. 1990, Coluccio, Bogengruber et al. 2004).

Após o encerramento do ciclo, ocorre a compactação da cromatina no núcleo, a regeneração de certas organelas e a completa montagem da parede dos esporos. A célula-mãe original colapsa em torno dos esporos para dar origem ao asco maduro em forma de tétrade (Roeder and Shaw 1996, Suda, Nakanishi et al. 2007, Neiman 2011).

A Figura 3 apresenta de forma esquemática as etapas de formação dos esporos. Na presença de uma fonte de carbono não fermentável, as células diploides privadas de nitrogênio sofrerão meiose. Durante a segunda divisão meiótica, os microtúbulos (indicados como  $\rightarrow$ ), que estão incorporados no envelope nuclear (mostrado em vermelho), tornam-se locais para a formação de membranas prospore (mostradas em verde). À medida que a meiose II prossegue, as membranas prospore se expandem e engrossam a formação de núcleos haploides. Após a divisão nuclear, cada membrana prospore fecha-se para capturar um núcleo haploide dentro de duas membranas distintas. A síntese da parede de esporos começa, então, no lúmen entre as duas membranas

derivadas da membrana do prospore. Após a síntese da parede de esporos terminar, a célula-mãe colapsa para formar o ascus (Neiman, 2005).

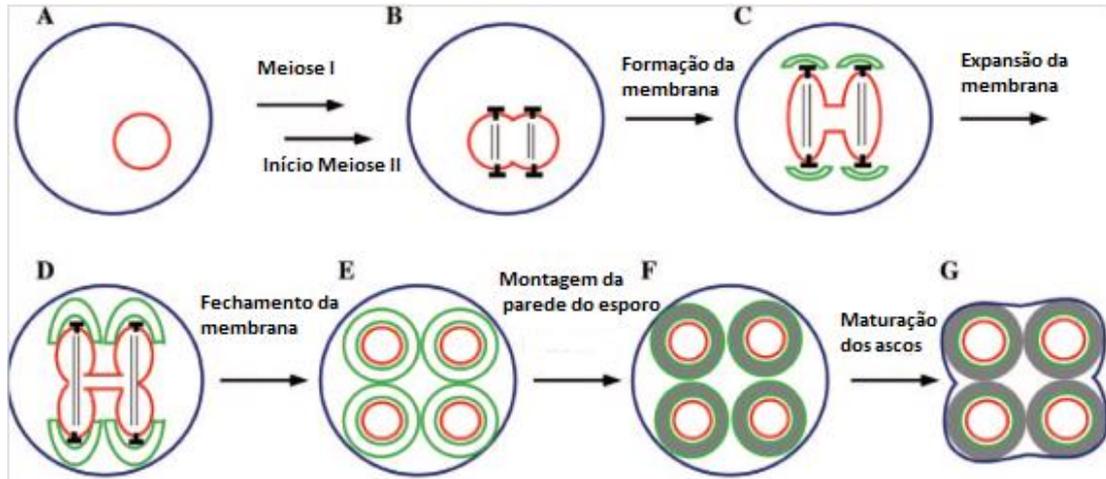


Figura 3: Estágios da formação de esporos e ascus em *S. cerevisiae*. Adaptada de Neiman (2005).

Os esporos podem apresentar “mating types” opostos, MAT $\alpha$  ou MAT $a$ , determinados por dois diferentes alelos do locus, e realizar o ciclo sexuado originando células diploides, MAT $a/\alpha$  (Montelone 2002, Ezov, Chang et al. 2010). O MAT locus é dividido em cinco regiões (W, X, Y, Z1 e Z2) nas sequências de bases que são compartilhadas entre MAT e duas cópias da sequência de “mating type” localizadas em *HML $\alpha$*  e *HML $a$* , que servem como doadores durante o processo de recombinação que permite a célula trocar um “mating type” por outro (Haber 2012). Os alelos *mating type* se diferenciam por uma sequência de aproximadamente 700 bp denominadas *Y $a$*  e *Y $\alpha$* , que contêm promotores e ORFs para proteínas que regulam vários aspectos da atividade sexual nas células. Essa conversão de um “mating type” em outro envolve a substituição do locus *Y $a$*  ou *Y $\alpha$*  por uma conversão gênica induzida por uma quebra de cadeia dupla pela endonuclease Ho. Assim, a endonuclease codificada pelo gene *HO* desempenha um papel essencial no ciclo de vida em *S. cerevisiae*. A transcrição do gene *HO* ocorre em células haploides MAT $a$  ou MAT $\alpha$ , mas não ocorre em diploides. A transcrição do gene

*HO* ocorre no final da fase G1 apenas na célula-mãe, mas não na célula-filha (Ekino, Kwon et al. 1999).

*S. cerevisiae* pode apresentar dois tipos de ciclo de vida: homotático e heterotático. Essa diferença é determinada pela capacidade ou não de interconversão do “mating type” da célula após esporulação. Células de *S. cerevisiae* heterozigóticas para o locus de “mating type” podem responder a alterações na disponibilidade de nutrientes do meio de várias formas, como levar as células a entrar na fase estacionária ou alterar sua morfologia. A ausência de fonte de nitrogênio combinada com a presença de uma fonte de carbono não fermentável leva as células aos processos de meiose e esporulação (Neiman 2011).

Na Figura 4, a célula-mãe homotática (HO) MAT $\alpha$  (rosa) e sua nova filha podem mudar para MAT $\alpha$  (azul). Essa linhagem é estabelecida pela partição assimétrica do mRNA que codifica o repressor Ash1 da expressão do gene HO em células-filhas (verde). Essas células podem se conjugar para formar um zigoto que dê origem a diploides MAT $\alpha$  / MAT $\alpha$  (roxo), em que a expressão do gene HO é reprimida. Na ausência de nitrogênio, os diploides sofrem meiose e esporulação para produzir quatro esporos haploides (dois MAT $\alpha$  e dois MAT $\alpha$ ) em um asco. Os esporos germinam e crescem vegetativamente, podendo repetir o ciclo homotático. As células heterotáticas (ho) possuem *mating types* estáveis e crescem vegetativamente até esgotarem seus nutrientes e entrar na fase estacionária. (Haber, 2012).

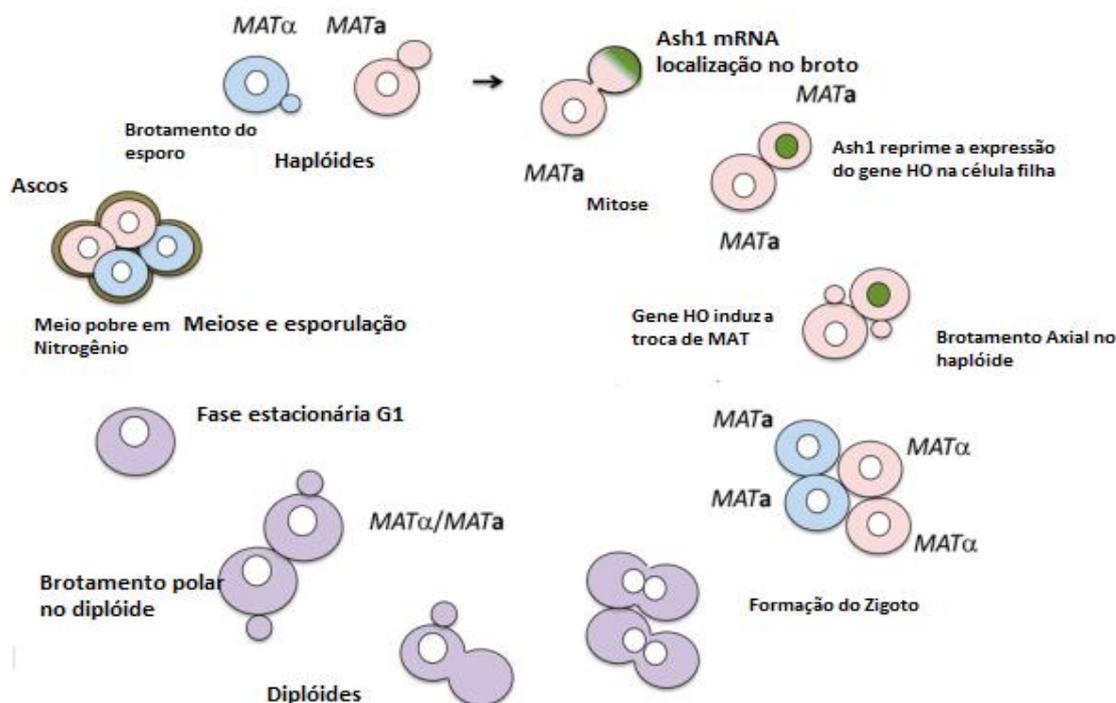


Figura 4: Representação do ciclo de vida homotático em *Saccharomyces cerevisiae*.

Adaptada de Haber (2012).

### 1.3 – Condições ambientais de estresse para a levedura

Assim como ocorre na esporulação, onde as células de levedura mudam seu metabolismo para sobreviver ao estado de ausência de nutrientes, essas células também apresentam a capacidade de responder às mudanças de outras condições ambientais (Piekaraska, Rytka et al. 2010). Essas respostas levam à adaptação das células quanto ao crescimento e proliferação, além da expressão de certos genes envolvidos em vias metabólicas que tem como objetivo principal garantir a manutenção das principais funções celulares (Hohmann and Mager 2003).

As condições de estresse podem se apresentar de várias formas: estresse a altas concentrações de etanol, diferença de pressão osmótica, variações do pH, variações da temperatura, estresse pela presença de metais e compostos tóxicos, além de outras que na produção industrial de bioetanol são ainda mais críticas devido ao processo de reciclo das células de leveduras utilizadas na fermentação (Basso, de Amorim et al. 2008).

Na fermentação utilizando cana-de-açúcar como substrato, as leveduras são expostas a altas concentrações de açúcar, uma vez que a concentração final alcançada de etanol nesse processo é de 8-12% (v/v). Por outro lado, o estresse osmótico causado por sais, que estão presentes em grandes quantidades no melaço de cana-de-açúcar é uma questão preocupante. Altos níveis de potássio, cálcio e magnésio são encontrados nesse substrato excedendo muito os níveis requeridos para a nutrição das leveduras. Altos níveis de potássio induzem respostas ao estresse, como o aumento da produção de glicerol, reduzindo o rendimento da fermentação (Basso, Rocha et al. 2011).

Uma vez que altas concentrações de etanol são atingidas ao fim do ciclo fermentativo, esse é um dos principais fatores de estresse para a levedura. O mecanismo inibitório do etanol sobre a levedura ainda não é totalmente compreendido, mas a principal estrutura afetada é a membrana citoplasmática (Alexandre, Ansanay-Galeote et al. 2001). A fluidez da membrana, que está relacionada com a sua composição lipídica, é profundamente alterada na presença de etanol, tendo como resultado a alteração da permeabilidade a alguns íons (especialmente  $H^+$ ). Com a entrada desregulada de íons na célula ocorre uma dissipação do gradiente eletroquímico por meio da membrana, que afeta a formação e manutenção da força próton-motriz com subsequente diminuição do pH intracelular. Além da composição da membrana existem muitos outros efeitos incluindo a inibição do crescimento e inativação enzimática, que leva à diminuição da viabilidade celular (Basso, Rocha et al. 2011).

As bases genéticas para a tolerância ao etanol são poligênicas e complexas. Mais de 250 genes estão relacionados com esse fenótipo, sendo que a maioria deles está envolvida no metabolismo energético, com a biossíntese de lipídios, a homeostase iônica e a biossíntese de trealose (Alexandre, Ansanay-Galeote et al. 2001, Hu, Wang et al. 2007). Além desses processos, genes envolvidos na reparação do DNA, *ADE1*, *URA3* e *KIN3* foram identificados por mapeamento de QTL em *S. cerevisiae* com capacidade de máxima acumulação de etanol (Pais, Foulquie-Moreno et al. 2013), o que torna difícil o melhoramento genético de leveduras tolerantes a altas concentrações de etanol para aplicação industrial.

Embora seja bem conhecido que as leveduras geralmente possam tolerar baixos valores de pH, a solução de ácido sulfúrico em pH 2.0, utilizada no tratamento das leveduras para reduzir a contaminação bacteriana, causa distúrbios fisiológicos nas

células de leveduras. Isso é observado devido à perda de minerais e à diminuição de trealose intracelular, diminuindo a viabilidade celular (Ferreira, Amorim et al. 1999). Leveduras tolerantes a essa condição de estresse da fermentação industrial geralmente apresentam altos níveis de trealose (Basso, de Amorim et al. 2008).

#### **1.4 – Estresse e tolerância ao alumínio em *Saccharomyces cerevisiae***

A presença de níveis tóxicos de alumínio também leva à diminuição do desempenho fermentativo da levedura. Devido à condição de acidez da fermentação, o alumínio (absorvido pela cana em solos ácidos) que está presente em sua forma tóxica ( $Al^{3+}$ ) leva a sérios problemas durante a fermentação, destacando-se a diminuição da viabilidade e dos níveis de trealose celular, além da diminuição da taxa de fermentação e do rendimento da produção de etanol. Os efeitos tóxicos do alumínio podem ser reduzidos pela presença de íons de magnésio e utilizando o melão de cana rico em composto quelante (Basso, Rocha et al. 2011).

Os mecanismos relacionados à tolerância ao alumínio em *S. cerevisiae* ainda não são totalmente esclarecidos, mas alguns trabalhos têm demonstrado pontos interessantes a serem considerados na elucidação desse fenótipo. Foi demonstrada uma correlação entre 37 genes e uma maior tolerância ao alumínio, sendo que esses genes podem ser agrupados em três grupos de acordo com suas funções: genes envolvidos no processo de transporte vesicular, em vias de transdução de sinais (PKC1-MAPK) e na manosição de proteínas que compõe a parede celular desses organismos (Kakimoto, Kobayashi et al. 2005).

Schott e Gardner demonstraram como a deleção dos genes *SLT2* e *SLK1*, que codificam as MAP kinases (stl2p e bck1p), faz com que as estirpes sejam sensíveis ao alumínio, tendo seu crescimento afetado. A tolerância ao alumínio foi restaurada pela expressão do gene *STL2*, indicando que a via de transdução de sinal STL2 MAP quinase é necessária para a tolerância ao alumínio (Schott and Gardner 1997).

Existem três tipos diferentes de ATPases que transportam íons: ATPases tipo P (membrana), V (vacuolar e lisossomal) e F (mitocôndrias). Foi demonstrado que a  $H^+$ -ATPase vacuolar é requerida para a resistência, ao alumínio em *S. cerevisiae*. A chamada V- $H^+$ -ATPase é uma proteína transmembranar que tem como função o bombeamento de prótons do citoplasma para o lúmen do vacúolo utilizando energia liberada pela hidrólise

de ATP. Hamilton e colaboradores (2001) demonstraram que mutantes para os genes *VMA1* e *VMA2* são hipersensíveis à presença de alumínio, apresentando uma diminuição de crescimento de até 40% em meio LPP, enquanto que os mutantes para  $F_1F_0$ -ATPase não apresentaram diferenças estatísticas (Hamilton, Good et al. 2001). Alguns trabalhos têm demonstrado a inibição causada pelo alumínio à  $H^+$ -ATPase de membrana em plantas, em plantas resistentes ao alumínio a atividade desta enzima está muito aumentada, quando comparada as plantas sensíveis as alumínio (Ahn, Sivaguru et al. 2001, Zhang, Wei et al. 2017).

Há evidências ainda de que a superexpressão dos genes que codificam os transportadores de  $Mg^{2+}$ , como *ALR1* e *ALR2*, confere à *S. cerevisiae* tolerância ao alumínio, e que a toxicidade desse íon para levedura pode estar relacionada à redução no influxo de  $Mg^{2+}$  (Schott and Gardner 1997) (MacDiarmid and Gardner 1998).

Dessa forma, a tolerância ao alumínio em *S. cerevisiae* parece ser um fator relacionado a vários genes. Sendo assim, devem-se utilizar ferramentas que possibilitem a análise do genoma desse organismo, para determinar quais fatores são realmente relevantes para essa característica. Nesse sentido, a utilização da técnica de mapeamento de QTL pode ser uma solução interessante para a resolução dessa questão.

### **1.5 – Análise poligênica por mapeamento de QTL (*Quantitative traits locus*)**

Com o desenvolvimento de novas técnicas e metodologias de análise de sequenciamento do genoma, houve um avanço também na análise de características quantitativas ou complexas em leveduras. A metodologia de mapeamento de QTL tem permitido a comparação das bases genéticas envolvidas com várias características fenotípicas em leveduras (Mackay, Stone et al. 2009, Zimmer, Durand et al. 2014).

A análise dos QTLs é um método estatístico que correlaciona dois tipos de informações - dados fenotípicos mensuráveis e dados genotípicos por marcadores moleculares - para explicar como essas bases genéticas se relacionam com a variação de características complexas (Kearsey and Farquhar 1998, Hill and Mackay 2004).

Para o estudo desses QTLs, são necessários, pelo menos, dois organismos que apresentem diferenças quantitativas em uma determinada característica. Além disso,

esses micro-organismos devem apresentar uma diferenciação por marcadores moleculares como o polimorfismo de nucleotídeos simples (SNPs), repetições de seqüências simples (SSRs), polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLPs) ou na posição de elementos transponíveis (Casa, Brouwer et al. 2000, Vignal, Milan et al. 2002, Gupta and Rustgi 2004). A identificação dos fatores genéticos envolvidos em características complexas inclui basicamente três fases: o mapeamento do intervalo genético (QTL), a identificação dos genes candidatos e a avaliação da contribuição do alelo para o fenótipo em estudos (Pais, Foulquie-Moreno et al. 2013).

Observar-se na figura 5 que os parentais superior e inferior são cruzados dando origem ao diploide com os locus de interesse. Os segregantes desse diploide são, então, selecionados, o DNA é sequenciado e o polimorfismo identificado por comparação. O *locus* de interesse geralmente está localizado na posição central do QTL, onde a frequência dos SNPs se aproxima de 100% (Segre, Murray et al. 2006).

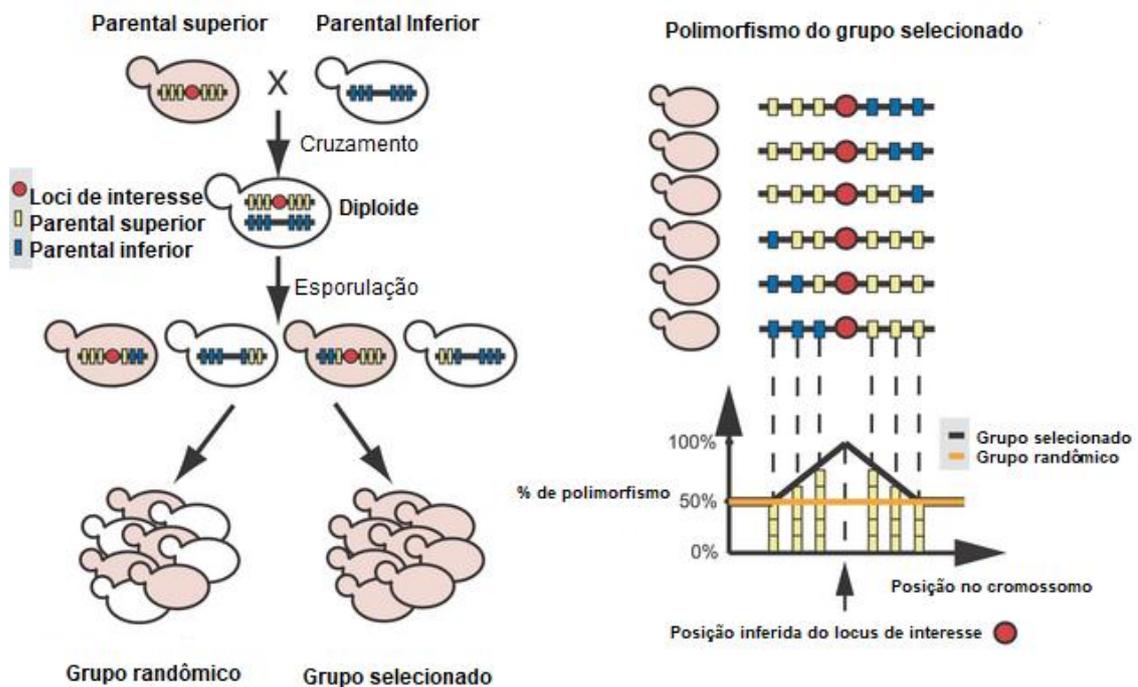


Figura 5: Representação esquemática do método de mapeamento por QTL.

Estudos de mapeamento de QTL têm identificado genes relacionados a diversos fenótipos em leveduras como: crescimento em altas temperaturas (Steinmetz, Sinha et al.

2002), capacidade de esporulação (Deutschbauer and Davis 2005), genes relacionados à capacidade máxima de acumulação de etanol e à tolerância a altos níveis de etanol (Pais, Foulquie-Moreno et al. 2013), genes que interagem conferindo baixa produção de glicerol e alta de etanol (Hubmann, Mathe et al. 2013), tolerância a altas concentrações de ácido acético (Meijnen, Randazzo et al. 2016), genes que afetam a produção de acetato de etila (Abt, Souffriau et al. 2016, Meijnen, Randazzo et al. 2016), alelo que confere alta produção de acetato de feniletila (Trindade de Carvalho, Holt et al. 2017), sendo uma técnica muito poderosa para avaliar características complexas. Um dos objetivos dessa técnica é verificar se uma característica fenotípica é determinada por poucos genes com grande efeito ou por muitos genes com pequenos efeitos individuais (Mackay 2001, Remington, Ungerer et al. 2001, Roff 2007).

#### **1.6 – Análise de segregantes agrupados (BSA – *Bulk Segregant Analysis*)**

A análise de segregantes agrupados (BSA), acoplada a sequenciadores de alto desempenho, é um poderoso método para o mapeamento de regiões genômicas relacionadas com fenótipos de interesse. Essa técnica baseia-se no cruzamento de dois parentais, um superior e outro inferior, para a característica de interesse. Segregantes exibindo a característica do parental superior são agrupados, seus DNAs extraídos e sequenciados. Regiões genômicas ligadas à característica de interesse são identificadas pesquisando os grupos de alelos mais presentes que normalmente se originam a partir do parental superior. A análise dos dados obtidos pelo método BSA não é simples, uma vez que envolve o sequenciamento e alinhamento do DNA do organismo estudado, além de que erros na etapa de seleção dos segregantes podem gerar dados falsos.

Um parental exibindo uma característica fenotípica de interesse (parental superior) é cruzado com uma estirpe de referência que não apresenta a característica (parental inferior). A estirpe heterozigótica diploide é, então, esporulada para gerar segregantes haploides. A nova geração de segregantes carrega um mosaico de material genético derivado dos dois parentais devido aos eventos de recombinação da meiose. Após a fenotipagem, o subgrupo de segregantes que apresentam a característica do parental superior é selecionada. DNA genômico extraído do grupo de segregantes

selecionados é sequenciado e regiões genômicas polimórficas são identificadas (Figura 6).

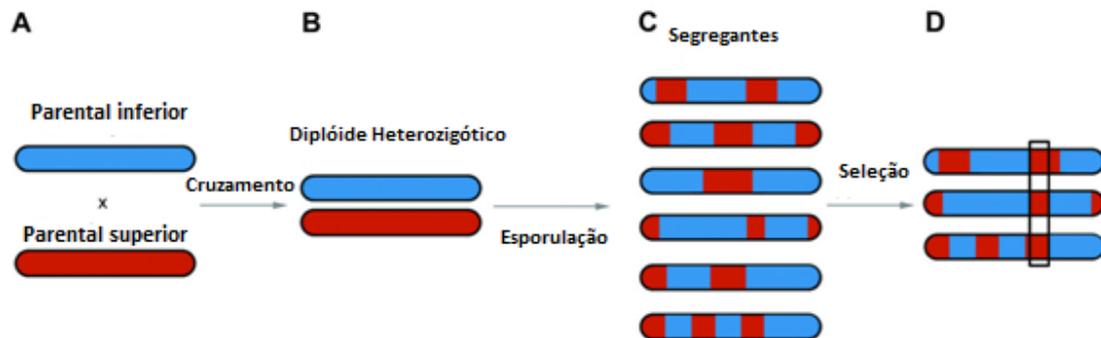


Figura 6: BSA para mapeamento de regiões genômicas ligadas a um fenótipo de interesse em leveduras. A: Parentais superior e inferior são cruzados. B: Diploide é formado e submetido a esporulação. C: Segregantes são obtidos por dissecação em micromanipulador. D: Seleção dos segregantes pelo fenótipo. (Duitama et al., 2014).

Teoricamente, para qualquer sítio marcador que não é ligado ao fenótipo de interesse, os alelos no grupo de segregantes devem ser herdados em proporções iguais (50%) a partir de cada parental. Um teste estatístico pode ser aplicado para cada marcador genético separadamente para avaliar a medida que a variação no sítio marcador se desvia da probabilidade esperada da herança de 50%. Assim, a eficiência dessa técnica de mapeamento de QTL por BSA depende do tamanho inicial da população de segregantes, do tamanho do grupo selecionado e do efeito do QTL sobre o fenótipo (Duitama, Sánchez-Rodríguez et al. 2014).

Sendo a tolerância ao alumínio importante para a produção de bioetanol, este trabalho utilizou a técnica de mapeamento de QTLs para analisar os fatores genéticos envolvidos nesse processo. Após a identificação das regiões dos QTLs são utilizadas técnicas para a avaliação dos genes candidatos e também para uma análise de reciprocidade hemizigótica para os parentais, confirmando, assim, quais são os fatores moleculares mais importantes que levam a uma determinada característica (Pais, Foulquie-Moreno et al. 2013).

## 1.7 – Análise de reciprocidade hemizigótica

A análise de reciprocidade hemizigótica é uma ferramenta utilizada para analisar cada alelo em um “background” genético híbrido. Nessa análise, cada alelo (parental superior ou inferior) é deletado no haploide e, posteriormente, este é cruzado com o haploide do outro parental, não deletado, e são construídas duas estirpes isogênicas que diferem geneticamente apenas no alelo em que cada gene é deletado (Steinmetz, Sinha et al. 2002), como esquematizado na figura 7.

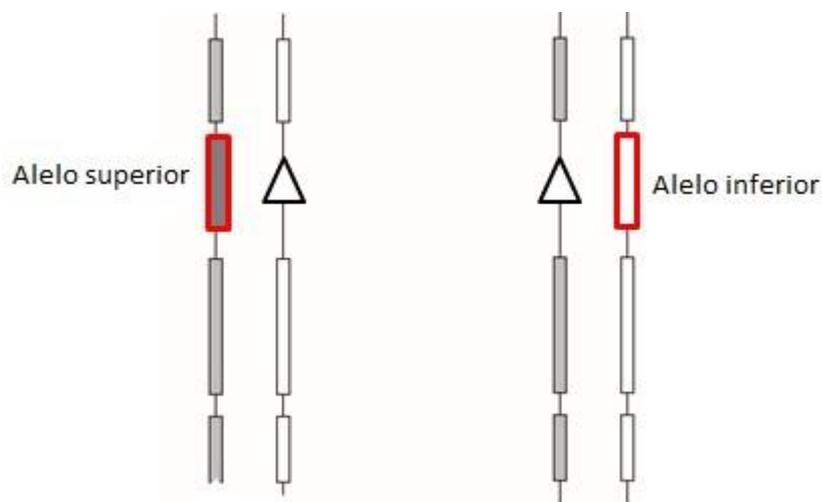


Figura 7: Esquema da Análise de Reciprocidade Hemizigótica.

A partir dessas estirpes são realizados os testes fenotípicos. Assim, um determinado gene terá ligação com a característica em estudo quando, ao ser deletado, esse gene causa a perda da característica fenotípica do seu parental.

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 – Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi realizar a análise poligênica da tolerância ao alumínio em *S. cerevisiae* para a produção de bioetanol utilizando o mapeamento de QTL.

### **2.2 – Objetivos Específicos**

- a) Comparar a capacidade fermentativa de estirpes *S. cerevisiae* selvagens e industriais em presença de alumínio;
- b) Selecionar uma estirpe parental superior e inferior e obter um híbrido a partir dos parentais;
- c) Determinar o grupo de segregantes superiores e o grupo de segregantes randômicos para sequenciamento do DNA e analisar os QTLs presentes;
- d) Avaliar os genes candidatos por meio da análise de reciprocidade hemizigótica para correlacionar sua função ao fenótipo em estudo.

### **3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, tendo sido realizado um período de 1 ano de doutorado sanduiche no MCB (*Laboratory of Molecules Cell Biology* pertencente ao VIB (*Vlaams Instituut voor biotechnologie*) – KULeuven (Bélgica).

#### **3.1 – Micro-organismos e seleção das estirpes de levedura**

As leveduras utilizadas neste estudo foram selecionadas a partir da coleção do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, contendo 120 estirpes isoladas de dornas de fermentação de cachaça, e da coleção do Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Católica de Leuven (Bélgica), contendo 720 estirpes de variadas fontes. As estirpes foram testadas quanto à capacidade de crescimento em meio YPS-ágar (extrato de levedura 1%, peptona bacteriológica 2%, glicose 2%, ágar 1,5% + 17 mM de  $Al_2(SO_4)_3$ ). As estirpes que apresentaram bom crescimento em meio alumínio sólido foram, então, fermentadas para se obter a estirpe com maior tolerância ao alumínio para o desenvolvimento do estudo.

#### **3.2 – Esporulação e dissecação de tétrades**

Para a esporulação, as estirpes foram cultivadas em 3 mL de meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona bacteriológica 2% e glicose 2%) à temperatura de 30°C sob agitação constante de 200rpm por um período de 24 horas. Após o crescimento, as células foram coletadas por centrifugação a 1000 x g por 5 minutos e lavadas com água destilada estéril. Posteriormente, uma alíquota de 20µL de células foi transferida para uma placa

de Petri contendo meio acetato de potássio 1% pH 6.0 (acetato de potássio 1%, extrato de levedura 0,1%, glicose 0,05% e ágar 2%), e incubada a 23°C por 5 dias, sendo a esporulação avaliada por microscopia óptica (Sherman and Hicks 1991).

Uma alíquota de 45 µL de células de leveduras esporuladas foram tratadas com uma solução de liticase (10.000U/mL) por 5 minutos em temperatura ambiente. Uma suspensão de 10µL foi transferida para uma placa contendo YPD, onde foi realizada a dissecação das tétrades utilizando o Micromanipulador (MSM 400, *Singer Instruments*). Após a dissecação, a placa foi incubada a 30 °C por 3 dias.

### 3.3 – Determinação do *mating type*

*Mating type* foi determinado por PCR com a combinação de *primers* complementares ao MAT locus, 5`TTGTCATCCGTCCCGTATAGC3`, MAT a, 5`AAGAAAGCAAAGCCTTAATTCCAA3` e MAT α, 5`GACTACTTCGCGCAACAGTATAATTT3` utilizando as seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação 94°C por 4 minutos; 29 ciclos de amplificação a 92°C por 1 minuto; 58°C por 2 minutos; 72°C por 2 minutos e temperatura de extensão final de 72°C por 10 minutos. (Huxley, Green et al. 1990).

A estirpe MATa gera um produto de PCR de 544pb e a estirpe MATα gera um produto de 404pb quando visualizados em gel de agarose 1%. As estirpes MAT a/α geram os dois produtos de PCR.

### 3.4 – Determinação da ploidia

A ploidia das leveduras foi determinada por meio da intensidade da fluorescência emitida pelo iodeto de propídio intercalado aos ácidos nucleicos, possibilitando quantificar o conteúdo de DNA analisado por citometria de fluxo, conforme já descrito na literatura (Popolo et al., 1982), com as devidas modificações. As células de leveduras previamente cultivadas em 3mL de YP glicose por 12 horas foram coletadas por centrifugação e lavadas 3 vezes em tampão Tris-HCl (50 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.7). Uma amostra de 2 x 10<sup>7</sup> células/mL foi fixada com 1mL de etanol 70% (v/v)

gelado em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em 100µL de tampão Tris-HCl com RNase (0,25 mg/mL) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, as células foram tratadas com proteinase K (1mg/mL) por 1 hora a 50°C. Posteriormente, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 100 µL de solução de iodeto de propídio (0,046 mM) e mantidas a 4°C por 48 horas. A quantidade de DNA foi estimada com base na intensidade da fluorescência e comparando com o conteúdo de DNA das células de leveduras de referência.

### **3.5 – Cruzamento dos parentais**

O cruzamento entre as estirpes parentais superior e inferior foi realizado misturando uma pequena quantidade de células de cada estirpe (MATa e MATα) em meio YPD-ágar. Entre 6-10 horas foi avaliada a formação do zigoto no microscópio. Após 24 horas foi realizado o isolamento de colônias e a confirmação do “mating type” e do conteúdo de DNA.

### **3.6 – Fermentação em escala laboratorial**

O pré-inóculo foi preparado reativando as leveduras em 3 mL de meio YPS 2% a 30°C com agitação por 24 horas. Foi transferido 1 mL do pré-inóculo para 50 mL de meio YPS 10% (extrato de levedura 1%, peptona bacteriológica 2% e 10% de sacarose) e incubados a 30°C com agitação por 48 horas até atingirem a fase estacionária. Após medida da D.O.<sub>600nm</sub>, as células foram centrifugadas (1000 x g, 5 minutos a 4°C), sendo o volume correspondente a D.O.<sub>600nm</sub> de 5 foi inoculado em 65 mL de meio YPS 20% contendo 5 mM de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> em tubos de fermentação vedados com tampas “airlock” (Figura 8). Os tubos de fermentação foram incubados em cabines modelo TC 255 S Aqualytic® a 30 °C sob agitação magnética de 200 rpm. durante 7 dias.

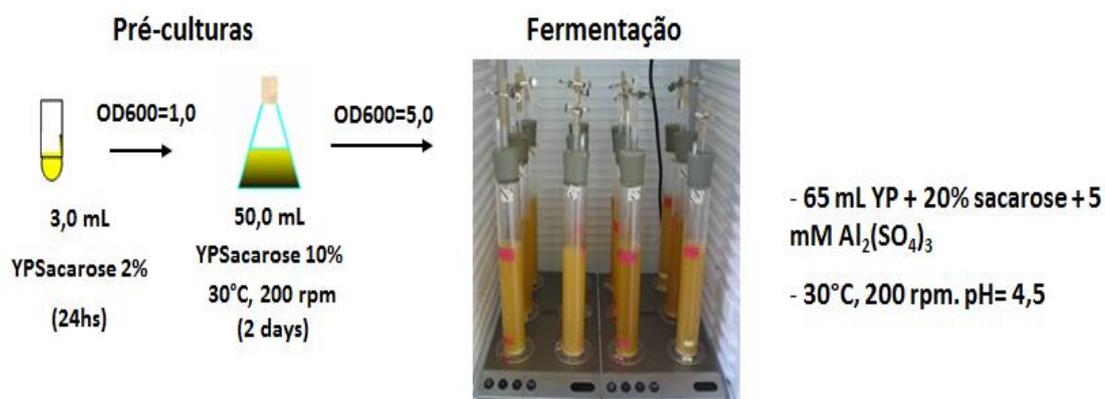


Figura 8: Esquema da metodologia de fermentação em escala laboratorial.

A capacidade fermentativa das leveduras foi monitorada pesando-se os tubos em tempos definidos. A partir da perda de peso (liberação de  $\text{CO}_2$ ) a produção de etanol foi estimada pela equação balanceada (figura 9).

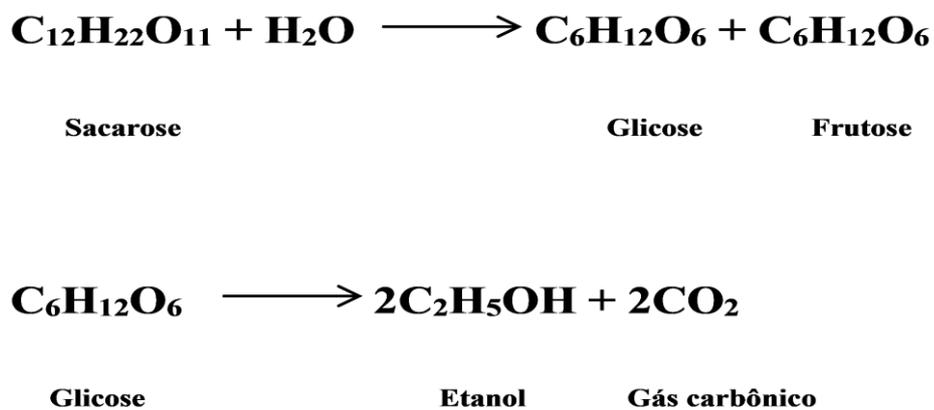


Figura 9: Equações químicas balanceadas da produção de etanol por fermentação.

### 3.7 – Preparação das amostras de DNA e sequenciamento

Amostras do DNA das leveduras parentais *Bruggeman Fresh* (B8C), PE-2 (P5A) e dos grupos de segregantes, tanto superior quanto randômico, foram extraídas para posterior sequenciamento. As células foram cultivadas em meio YPD 2% com ampicilina (20 µg/mL) por 48 horas até a fase estacionária. Após o crescimento, as culturas dos segregantes foram padronizadas com base na  $DO_{600nm}$  a fim de garantir quantidades iguais de DNA de cada segregante nos grupos.

Após verificar a qualidade do DNA, as amostras foram enviadas para a realização do sequenciamento pela empresa *Beijing Genomics Institute* (BGI, Hong Kong, China). O sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma Illumina.

### 3.8 – Análise das sequências e mapeamento dos QTLs

A identificação e a genotipagem das SNVs, “indels” e CNVs foram realizadas e o genótipo das diferentes amostras (parental superior, parental inferior, grupo selecionado e grupo randômico) foi agrupado em um arquivo vcf (*Variant Call Format*). SNVs foram selecionados com base no filtro para suficiente cobertura ( $\geq 20$  vezes) e taxa ( $\geq 80\%$ ) (Swinnen, Schaerlaekens et al. 2012, Claesen, Clement et al. 2013) utilizando o programa “Next Generation Sequencing Eclipse Plugin” (NGSEP), uma estrutura integrada para analisar leituras de sequenciamento de alto rendimento (Duitama, Quintero et al. 2014). Em seguida, as frequências de variação dos SNPs foram calculadas dividindo o número de variantes alternativas pelo número total de leituras alinhadas. Uma frequência muito alta ou muito baixa é sinal de uma segregação de SNP unilateral derivada preferencialmente de um dos parentais, indicando uma ligação genética à característica de interesse.

A ligação genética foi estatisticamente confirmada utilizando o modelo HMM (*Hidden Markov Model*) um algoritmo para extração de alelos representados na análise de segregantes agrupados. Nesse algoritmo, um marcador é identificado como significativo quando sua probabilidade atribuída é maior que 0,95 (Duitama, Sanchez-Rodriguez et al. 2014). Finalmente, o mapa com a frequência da variação dos SNPs foi

obtido utilizando o programa R. Esse algoritmo permitiu a redução da largura de QTLs estimando a significância (valor de p) da ligação em cada posição do SNP por comparação da variação da frequência do SNP do grupo superior e do grupo randômico nessa posição.

A partir da identificação dos QTLs presentes para uma determinada característica é possível testar, pela técnica de Análise de Reciprocidade Hemizigótica, se os genes candidatos presentes na região central do QTL realmente apresentam ligação com a característica.

### **3.9 – Análise de Reciprocidade Hemizigótica (ARH)**

Para a Análise de Reciprocidade Hemizigótica (ARH) foi realizada a deleção do gene candidato tanto no parental haploide superior (B8C), quanto no haploide inferior (P5A). Para isso, foi realizada a amplificação do cassete contendo o marcador KanMX a partir do DNA da estirpe pertencente à coleção da Euroscarf deletada para o gene em questão. Essa amplificação foi realizada em duas etapas. Primeiro, foi amplificada uma parte do cassete utilizando o *primer 1* AATACGTACTTCATTCCCATGCTTA, que flanqueia uma região *upstream* em torno de 300pb da ORF, com um *primer 2*, interno à KanMX GCCTGAGCGAGACGAAATAC, formando a primeira parte do cassete. Depois, foi utilizado o *primer 4* CGTTCATAAGCACACCAGCA reverso para o gene em questão em associação com outro *primer 3* TTATGCCTCTTCCGACCATC interno ao KanMX para formar a segunda parte do cassete. Os dois fragmentos possuem uma região de homologia em torno de 300 pares de base em KanMX. Assim, na deleção do gene eram adicionados os dois fragmentos descritos para aumentar a eficiência da recombinação homóloga. A confirmação foi realizada utilizando o *primer 5* CTCAAAGGCTTGCGTCTCAAC com o *primer 6* CCGACTCGTCCAACATCAATACAA, para garantir que ambos os fragmentos foram inseridos no lugar do gene (Figura 10).

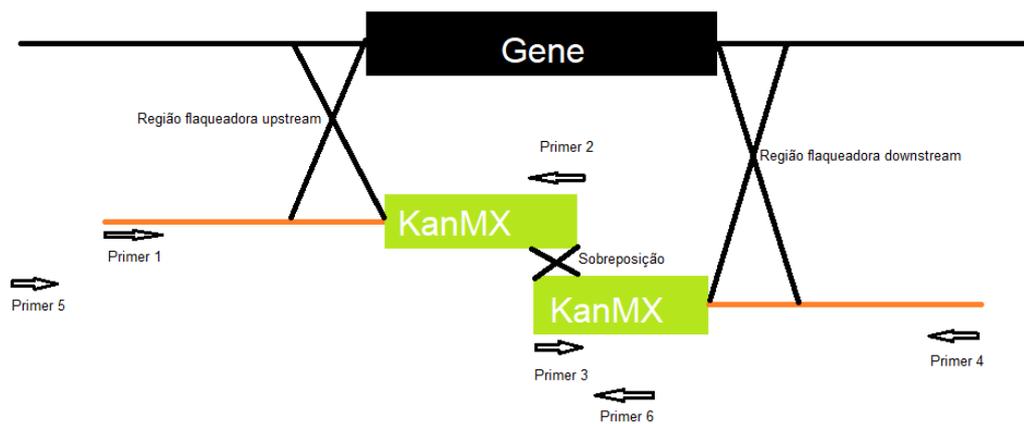


Figura 10: Estratégia de recombinação utilizada para construir estirpes para a Análise de Reciprocidade Hemizigótica.

Foi realizado o cruzamento do parental superior deletado com o parental inferior não deletado, e vice-versa, resultando em duas estirpes diploides hemizigóticas, sendo a única diferença a origem do alelo deletado. Para realizar a deleção nos haploides, o cassete de deleção foi amplificado a partir da coleção da Euroscarf. O cassete amplificado foi, então, inserido nos parentais por recombinação homóloga, e a correta integração confirmada por PCR.

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 – Seleção de leveduras tolerantes ao alumínio

Em um ensaio prévio realizado com 118 estirpes de levedura, provenientes da coleção do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, em placa de Petri contendo meio YPS-ágar +  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  em uma concentração de 17 mM, constatou-se uma maior tolerância ao alumínio em cinco estirpes, LBCM09, LBCM15, LBCM20, LBCM47 e LBCM105. Sendo assim, essas estirpes foram escolhidas para dar sequência aos testes fermentativos e avaliar a produção de etanol. Após os mesmos testes em placa descritos anteriormente com as 720 estirpes da coleção do Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Católica de Leuven, 4 estirpes foram selecionadas para os testes em tubos de fermentação, sendo elas, *Bruggeman Fresh*, *Fleisch 1*, *Fleischman traditional* e a FT858L. Os testes fermentativos com as 10 estirpes previamente selecionadas foram realizados em tubos de fermentação contendo meio YPS 20% +  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  em uma concentração de 5 mM (Figura 11).

A estirpe *Bruggeman Fresh*, levedura utilizada na panificação, apresentou o melhor desempenho fermentativo em presença de alumínio quando comparada às demais leveduras testadas. Assim, essa levedura foi selecionada como a estirpe com fenótipo superior para a continuidade dos estudos envolvendo a análise poligênica da tolerância ao alumínio. Das 10 estirpes de leveduras testadas, oito apresentaram um desempenho fermentativo inferior em presença de alumínio. Uma dessas estirpes, PE-2, foi definida como estirpe com fenótipo inferior para a análise poligênica, pois é amplamente utilizada na produção de bioetanol a partir de cana-de-açúcar no Brasil, e apresenta uma considerável sensibilidade ao meio contendo alumínio, o que limita sua capacidade fermentativa, sendo esse o ponto de interesse deste trabalho.

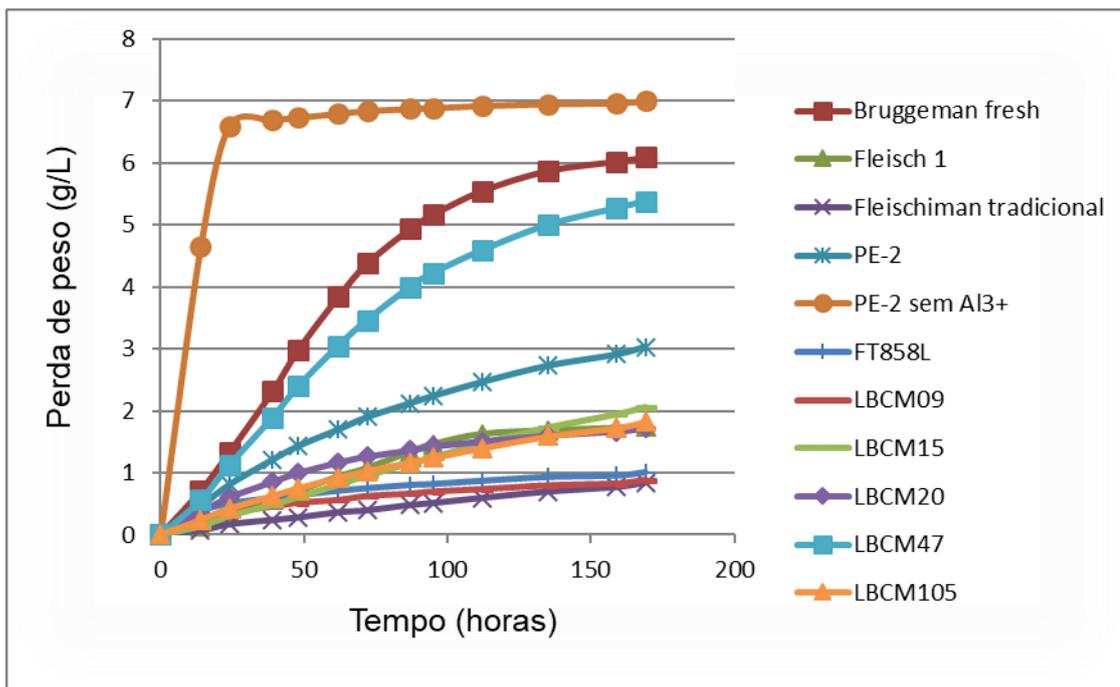


Figura 11: Perfil fermentativo de estirpes de leveduras em meio YPS 20% contendo 5 mM de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ .

#### 4.2 – Esporulação e análise das tétrades e obtenção de segregantes das estirpes com fenótipo superior e inferior

Após a escolha das estirpes superior e inferior, *Bruggeman Fresh* e PE-2 respectivamente, foi realizada sua esporulação com o intuito de obter esporos viáveis após dissecação com auxílio do micromanipulador. Devido à ausência de fontes de nitrogênio e de carbono fermentável, as duas estirpes *Bruggeman Fresh* e PE-2 foram capazes de esporular, apresentando formação de tétrades visíveis ao microscópio após 5 dias incubação.

As leveduras podem apresentar variações na quantidade de esporos viáveis após tratamento com a enzima liticase, sendo o tempo de exposição padronizado para cada estirpe. O tratamento utilizado neste trabalho foi suficiente para separação dos esporos durante a dissecação sem afetar a sua viabilidade.

As estirpes com fenótipo superior e inferior apresentaram diferenças quanto à viabilidade dos esporos. A estirpe industrial PE-2 mostrou 80% dos esporos viáveis e a estirpe superior *Bruggeman fresh* apresentou em torno de 70% de viabilidade. Essas taxas indicam uma boa capacidade de os esporos dissecados crescerem e é de grande importância para o desenvolvimento dos estudos de mapeamento por QTLs.

### 4.3 – Testes fermentativos

Os segregantes que apresentaram *mating type* estável foram utilizados para a realização dos testes em tubos de fermentação contendo 65 mL de meio YPS 20% + 5mM de  $Al_2(SO_4)_3$ , sendo a fermentação acompanhada pela perda de peso pelo tempo até a estabilização do peso dos tubos. O teste com os segregantes da estirpe superior *Bruggeman Fresh* foi realizado, sendo seus resultados demonstrados na Figura 12.

Todas as fermentações foram realizadas utilizando os parentais superior e inferior com e sem alumínio para comparação. Quando analisamos o gráfico (Figura 12), é possível observar que a perda de peso pelo tempo do segregante 8C da *Bruggeman Fresh* foi muito mais rápida quando comparada aos demais segregantes isolados a partir dessa estirpe, sendo seu perfil fermentativo muito semelhante ao do seu parental diploide. Devido a esse perfil, o segregante 8C foi escolhido como o segregante superior.

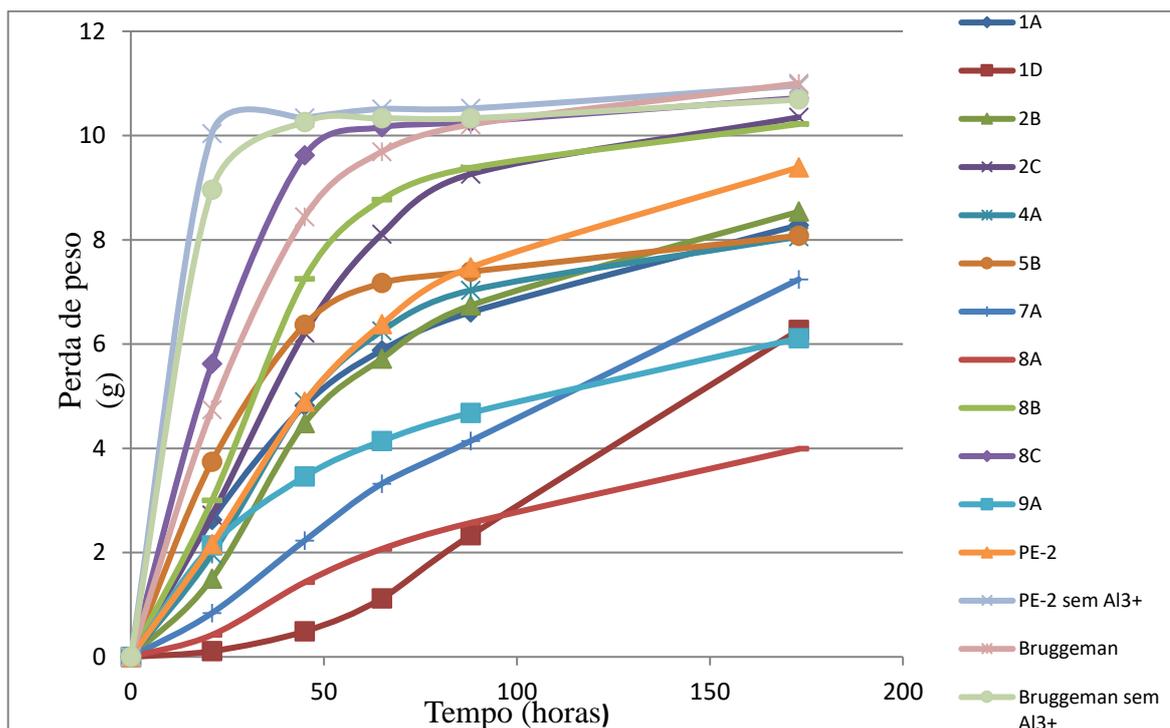


Figura 12: Gráfico da perda de peso pelo tempo dos segregantes da estirpe *Bruggeman fresh*.

Foi realizada a fermentação dos segregantes da estirpe inferior PE-2 para a seleção de um segregante que apresentava a mesma característica fenotípica desta estirpe industrial.

Analisando o gráfico da Figura 13, observamos um perfil fermentativo semelhante em 3 segregantes (seg 2A, seg 5A e seg 8C) com *mating type* estável e que apresentavam fenótipo semelhante ao parental. Os segregantes devem apresentar o mesmo fenótipo que o parental para garantir que o genoma encontrado no segregante seja correspondente ao do seu parental. Esses segregantes, juntamente com o seg 8C da *Bruggeman Fresh*, foram selecionados para o cruzamento.

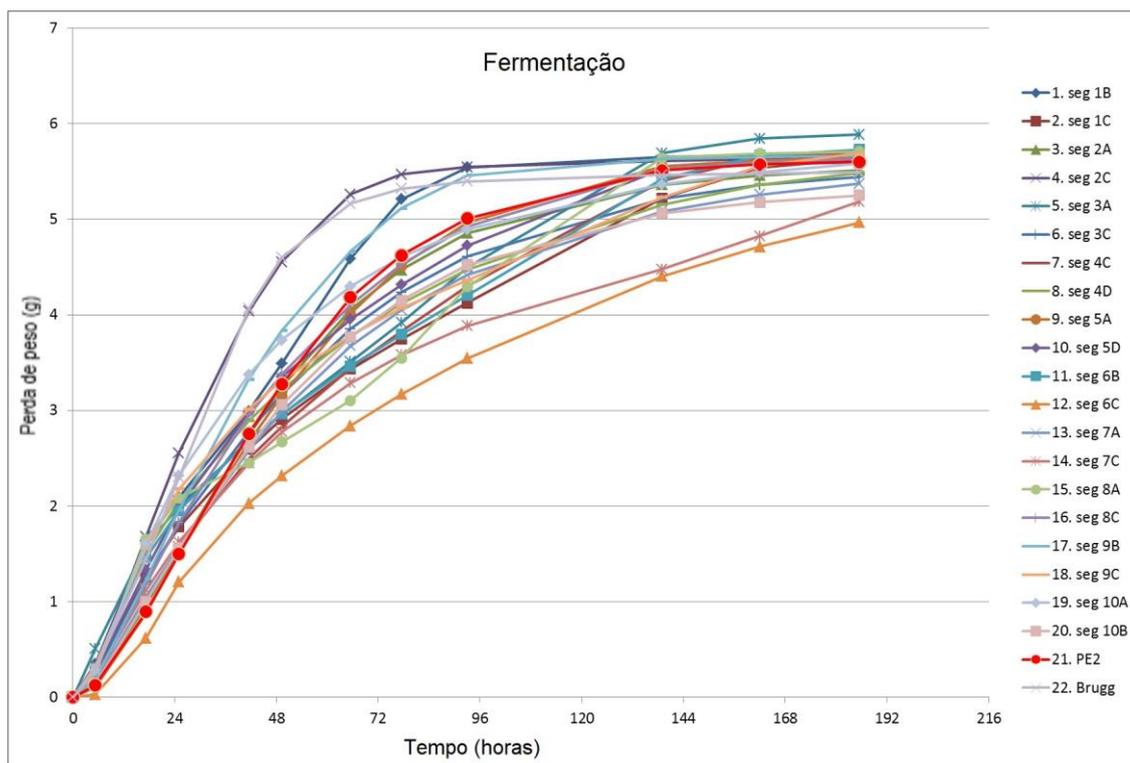


Figura 13: Gráfico da perda de peso pelo tempo dos segregantes da estirpe industrial PE-2.

#### 4.4 – Determinação do *mating type* dos segregantes

Para a determinação do *mating type* dos segregantes obtidos após a dissecação das tétrades, foi utilizada a técnica de PCR utilizando 3 diferentes iniciadores. Essa etapa foi de grande importância para identificar se esses segregantes apresentavam um único *mating type*,  $a$  ou  $\alpha$ , como também para identificar possível atividade do gene HO nos segregantes, o que torna inviável a possibilidade de se isolar segregantes haploides a partir das estirpes diploides. O gel de agarose com a análise dos dois segregantes pode ser visualizada na Figura 14.

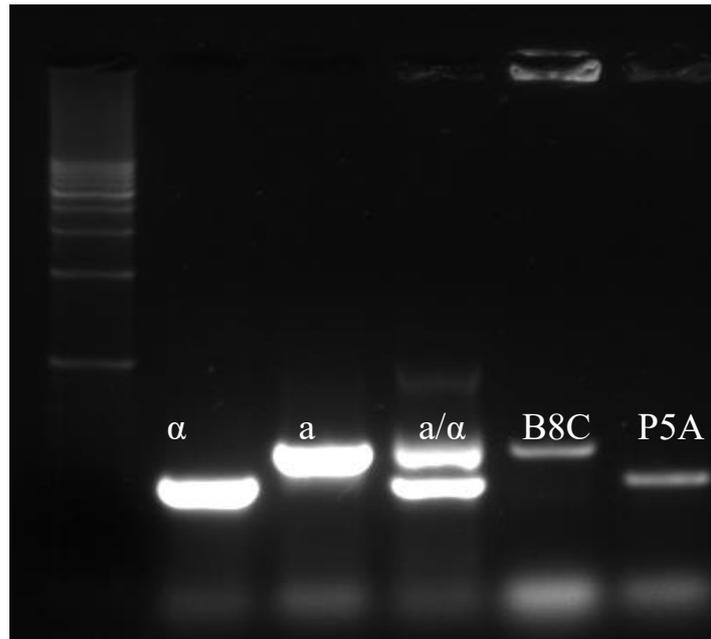


Figura 14: Gel de eletroforese de determinação do *mating type* do segregante da estirpe superior *Bruggeman fresh 8C*, demonstrando o *mating type* a, e do segregante da estirpe inferior PE-2 5A que tem o *mating type*  $\alpha$ .

Os segregantes de ambos os parentais apresentaram *mating type* estável, a ou  $\alpha$ , não tendo o gene HO ativo. Esses foram, então, submetidos aos testes fermentativos em tubos para selecionar os segregantes que apresentam o mesmo fenótipo de seus parentais diploides, ou seja, a mesma capacidade fermentativa de seus parentais em meio contendo sulfato de alumínio.

#### 4.5 – Cruzamento dos parentais

Após os testes fermentativos, foi selecionado como segregante superior o 8C (B8C); como segregantes inferiores da PE-2, foram selecionados P2A, P5A e P8C. Realizaram-se esses três cruzamentos com o intuito de avaliar a eficiência de esporulação de cada um dos cruzamentos, bem como avaliar a viabilidade dos esporos dessas estirpes como um critério de seleção para continuar os estudos.

O cruzamento foi realizado tomando-se uma pequena quantidade de células de cada estirpe e colocando-as em contato em uma placa de petri contendo meio sólido YPD 2%. Após 24 horas, eram isoladas colônias e, posteriormente, feitas a análise de PCR para verificar o *mating type* e a análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo para confirmar o cruzamento entre as estirpes. Na Figura 15, observa-se que todas as colônias testadas para os cruzamentos B8CxP5A apresentaram *mating type a/ α*.

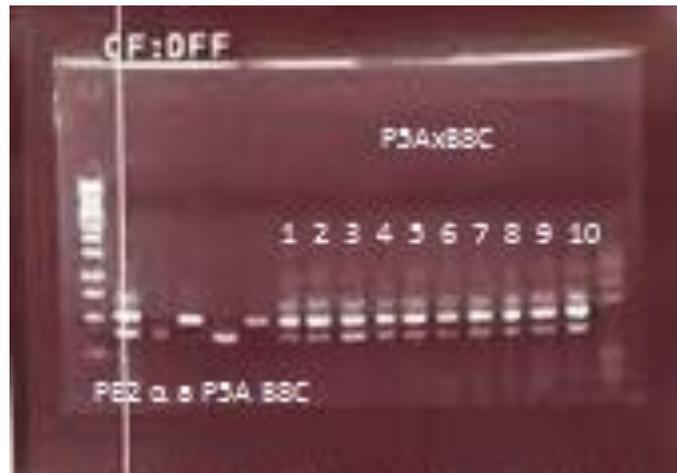


Figura 15: Gel de eletroforese das colônias do cruzamento P5AxB8C para análise do *mating type*.

Na Figura 16 é possível observar que todas as colônias testadas para os cruzamentos B8CxP5A apresentaram *mating type a/ α*. Na Figura 16, observa-se que para B8CxP2A também todas as colônias testadas apresentavam *mating type a/ α*, enquanto que, das cinco colônias testadas para o cruzamento B8CxP8C, apenas uma colônia apresentou-se tendo *mating type a/ α*. Por esta razão, esse cruzamento foi descartado.

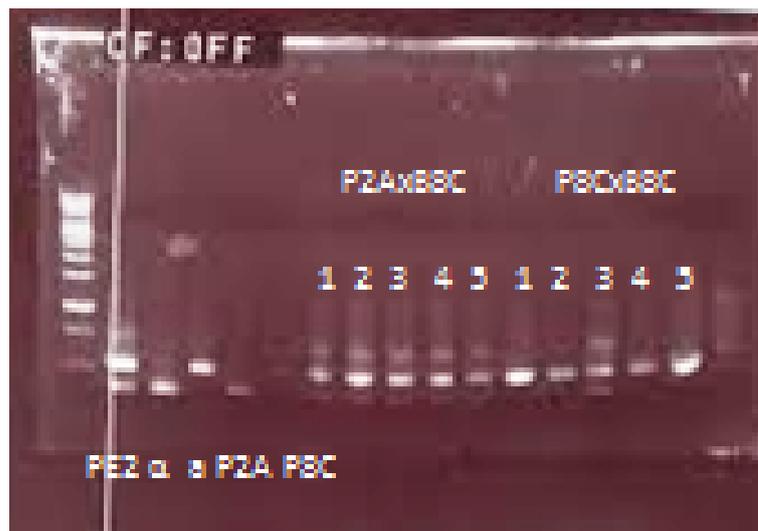


Figura 16: Gel de eletroforese das colônias dos cruzamentos P2Ax8C e P8Cx8C, para análise do *mating type*.

Foi realizada a esporulação dos cruzamentos P2Ax8C e P8Cx8C em placas contendo meio de esporulação acetato de potássio 1% pH 6.0 (acetato de potássio 1%, extrato de levedura 0,1%, glicose 0,05% e ágar 2%), e incubada a 23°C por 5 dias, sendo a esporulação avaliada por microscopia óptica.

Ao avaliar a eficiência de esporulação, que é dada pela quantidade de tétrades, dividida pela quantidade total de estruturas encontradas após a esporulação (tétrades, tríades e díades), foram avaliadas três colônias de cada cruzamento, além dos estipes superior e inferior, sendo essa eficiência demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1: Estirpes e percentuais de eficiência de esporulação.

Estirpe	Eficiência de esporulação
PE2	7,75%
<i>Bruggeman</i>	8,69%
P2AX8C.1	7,0%
P2AX8C.2	11,34%
P2AX8C.3	19,23%

P5AX8C.1	14,15%
P5AX8C.2	16,66%
P5AX8C.3	20,16%

Após a dissecação das tétrades, foi verificada a viabilidade dos esporos. A única colônia que apresentou esporos viáveis foi a B8CxP5A.3, sendo, por isso, selecionada para dar continuidade aos estudos (Figura 17).



Figura 17: Análise do crescimento dos segregantes após dissecação das tétrades em micromanipulador.

#### 4.6 – Determinação do conteúdo de DNA

A determinação do conteúdo de DNA foi realizada pela técnica de citometria de fluxo combinada ao corante iodeto de propídio na concentração de 0.046mM. A partir dessa análise, utilizando estirpes de leveduras com ploidia conhecida, foi possível correlacionar esses resultados com o conteúdo de DNA da estirpe ou segregante analisado.

Na Figura 18 podemos observar que, quando a estirpe *Bruggeman Fresh* foi analisada, observou-se que seu conteúdo de DNA foi de uma estirpe triploide, enquanto que a estirpe PE-2 apresentou um perfil diploide. Ao analisar-se o segregante B8C, o conteúdo de DNA se encontrava entre uma estirpe haploide e uma estirpe diploide, indicando que se tratava de uma estirpe aneuploide. Para a estirpe P5A, o perfil encontrado foi de um segregante haploide.

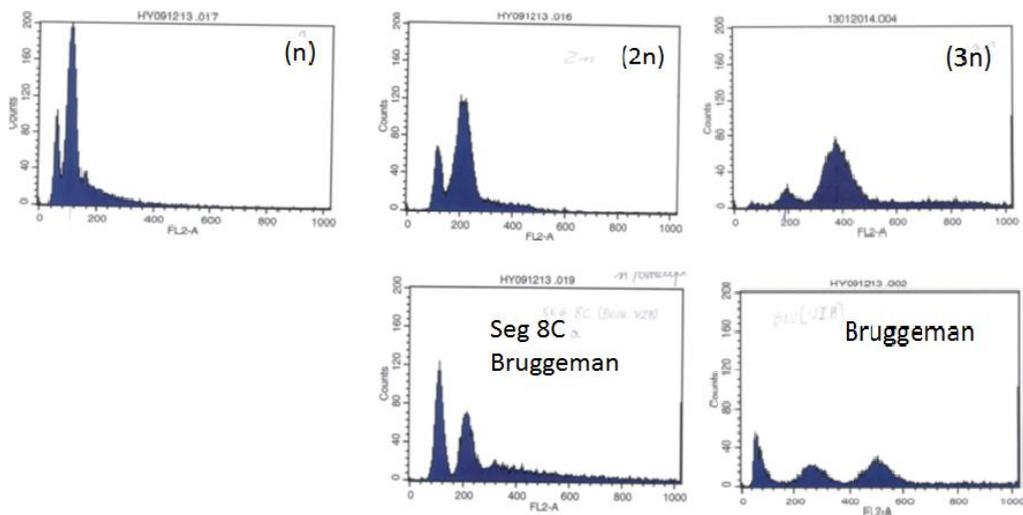


Figura 18: Análise de citometria de fluxo para determinação de conteúdo de DNA.

Quando se analisou o segregante B8C, o conteúdo de DNA se encontrava entre uma estirpe haploide e uma estirpe diploide, indicando que se tratava de uma estirpe aneuploide. Ao analisar a estirpe P5A, o perfil encontrado foi de um segregante haploide.

Devido ao fato de o cruzamento B8CxP5A ser aneuploide, foram realizadas sua segregação e esporulação, seguidas de seleção pelos testes fermentativos, obtendo-se o segregante 20D, que se apresentava como aneuploide. Para se conseguir um segregante que fosse haploide, foram realizadas a esporulação e a segregação novamente. A partir do comportamento dos segregantes deste, foi possível confirmar a aneuploidia, pois apenas 20% dos segregantes apresentaram crescimento, demonstrando que os demais tinham deficiência de algum cromossomo. (Figura 19).



Figura 19: Segregantes do aneuplóide 20D obtido do cruzamento entre B8CxP5A.

Foi realizada nova fermentação para garantir que o segregante selecionado teria o mesmo fenótipo da estirpe *Bruggeman fresh*. O segregante 8.20D haploide foi selecionado pelo teste fermentativo (dados não mostrados) e, quando analisado o

conteúdo de DNA do segregante 8.20D, este se apresentou como haploide (Figura 20), sendo novamente cruzado com o segregante P5A para dar origem ao diploide.

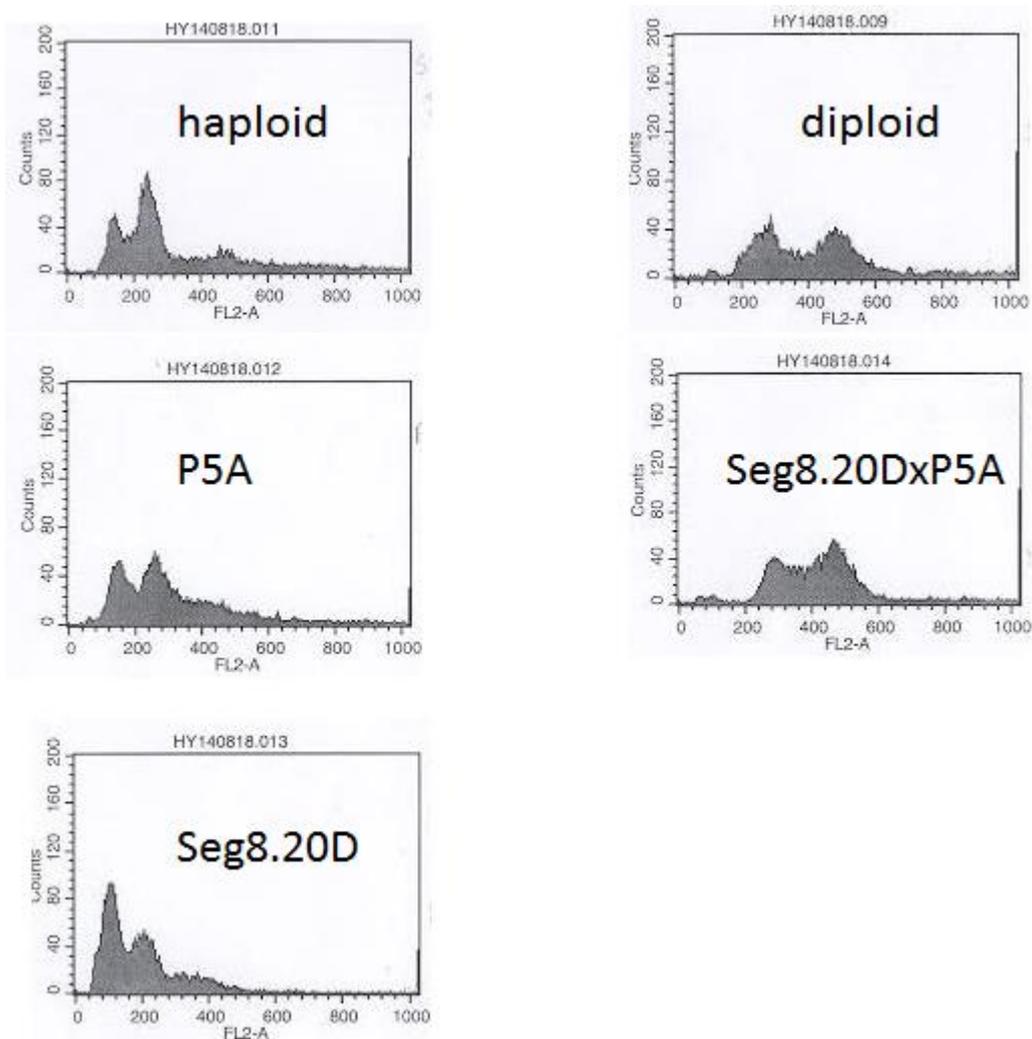


Figura 20: Análise do conteúdo de DNA dos segregantes superiores e inferiores e do cruzamento entre eles.

O diploide 8.20DxP5A, foi, então, esporulado, dissecado no micromanipulador e, ao analisar os segregantes, selecionados e não selecionados, todos apresentaram-se como haploides.

#### 4.7 – Seleção dos segregantes para o mapeamento por QTLs

Após realizar o cruzamento entre os segregantes haploides 8.20D e P5A, obteve-se um diploide que foi, então, submetido ao meio ágar acetato de potássio 1% pH 6,0 para a formação de esporos. As tétrades foram, então, dissecadas utilizando-se o micromanipulador e os segregantes foram crescidos em meio YPD 2% a 30° C. Foram realizadas a análise do *mating type* por técnica de PCR e a análise por citometria de fluxo para confirmar que os segregantes eram haploides.

Os segregantes foram, então, submetidos à seleção para determinar um grupo de 30 haploides que apresentam o fenótipo superior para a tolerância ao alumínio. Para isso, foi realizado um pré-teste para o crescimento desses haploides em meio YPS-ágar +  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  em uma concentração de 17 mM (Figura 21), como no *screening* inicial deste estudo.

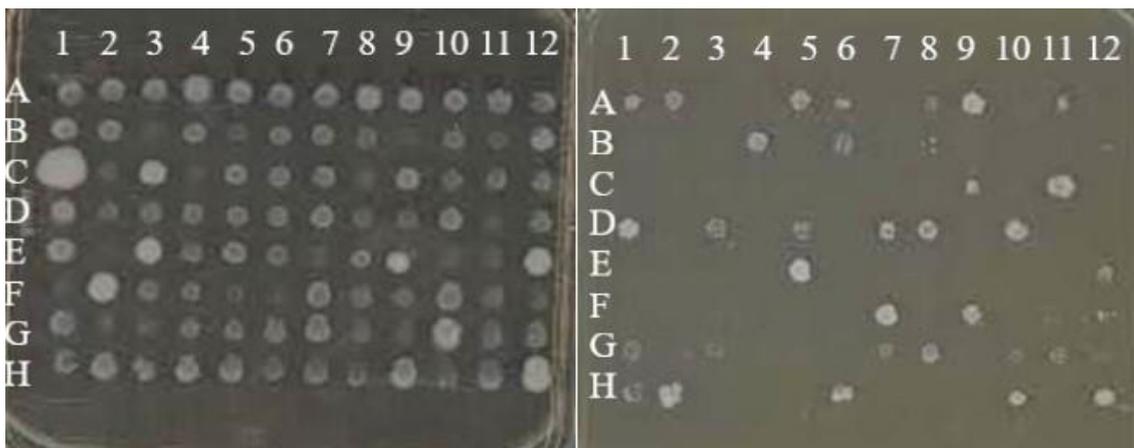


Figura 21: Placa meio YPS 2% ágar à esquerda e placa YPS 2% ágar + Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> em uma concentração de 17 mM à direita, mostrando os segregantes que apresentam tolerância ao alumínio para o crescimento.

Após esse *screening* inicial com 658 segregantes, foram encontrados 168 segregantes tolerantes ao alumínio para crescimento, os quais passaram para o teste fermentativo para determinar os segregantes haploides que apresentam tolerância ao alumínio para a produção de etanol.

Dos 168 segregantes submetidos ao teste fermentativo, 51 apresentaram melhor desempenho quando comparados ao do parental superior *Bruggeman fresh*, sendo que desses foram selecionados os 30 (Figura 22) que apresentaram melhor desempenho para o grupo selecionado de segregantes e foram aleatoriamente tomados 120 segregantes para o grupo não selecionado. Estes, juntamente com os parentais superior e inferior, tiveram seu DNA isolado para o sequenciamento.

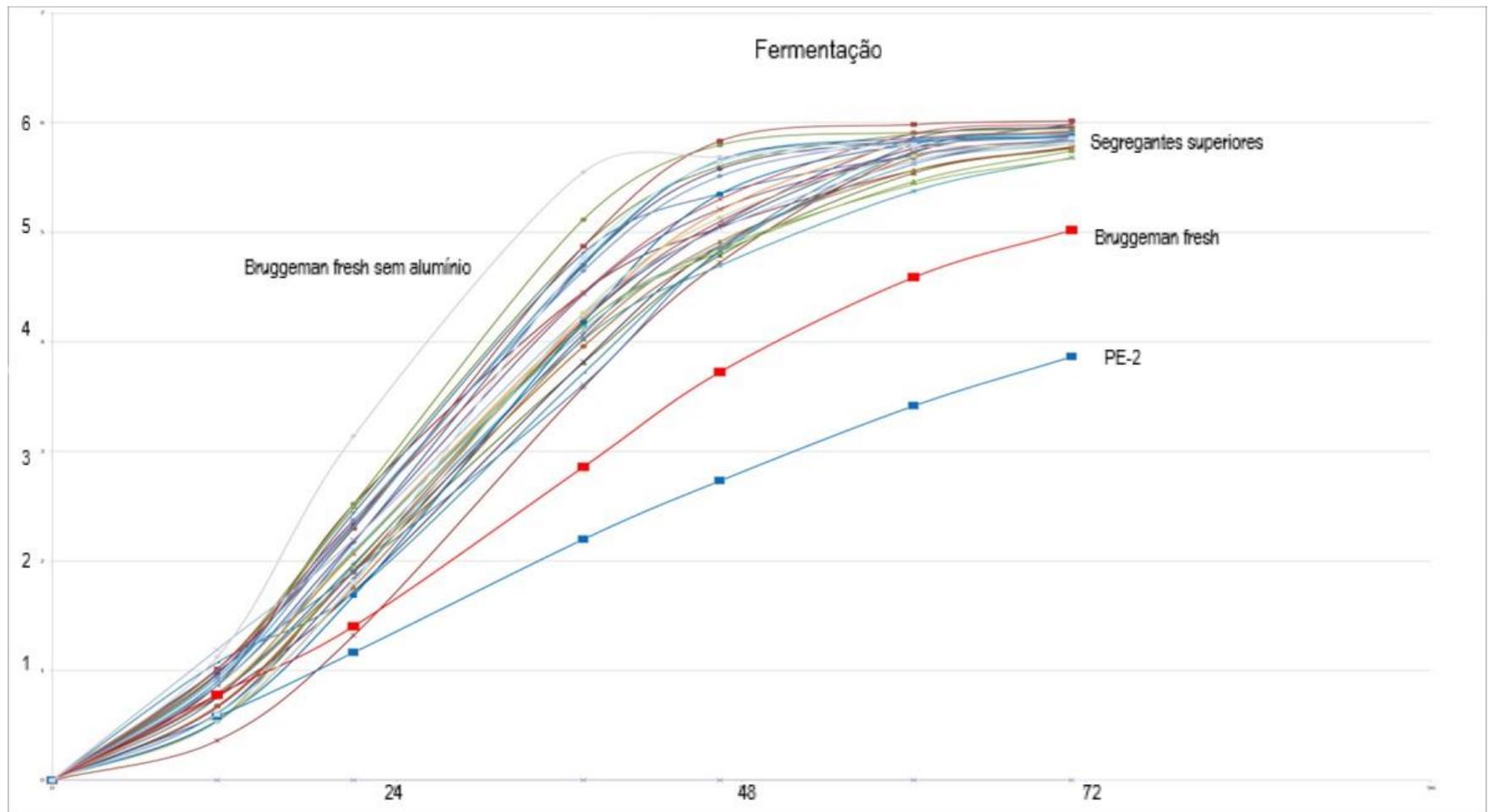


Figura 22: Perfil fermentativo dos 30 segregantes superiores para o fenótipo de tolerância ao alumínio.

#### 4.8 – Mapeamento de QTL por sequenciamento completo de segregantes agrupados (BSA)

No grupo superior, os 30 segregantes selecionados nos testes fermentativos foram agrupados para a realização do sequenciamento do genoma. Os segregantes foram incubados separadamente em meio YPD 2%, e, posteriormente, considerando a densidade óptica (DO), foram agrupados em quantidades equivalentes de células para que o DNA fosse extraído para o sequenciamento. O grupo randômico foi composto por 120 segregantes não selecionados que foram agrupados nas mesmas condições para a extração e sequenciamento do genoma. Tanto o segregante superior quanto o inferior foram incubados separadamente para posterior extração e sequenciamento de seu genoma. O DNA dos parentais, superior e inferior, bem como o DNA dos grupos, selecionado e randômico, foram enviados para a empresa BGI-Hong Kong (China) para o sequenciamento do genoma utilizando a plataforma Illumina (Tabela 2).

Tabela 2: Segregantes com DNA sequenciado.

Parental superior	8.20D	Segregante do cruzamento B8CXP5A
Parental inferior	P5A	Segregante da PE-2
Grupo selecionado	30 segregantes	Segregantes 8.20DXPE-2
Grupo randômico	120 segregantes	Segregantes 8.20DXPE-2

Na abordagem de mapeamento de QTL utilizada neste trabalho, segregantes que demonstram o mesmo fenótipo do parental superior são agrupados para o sequenciamento dos seus genomas. Todos os polimorfismos (SNPs) necessários para o mapeamento dos QTLs são predeterminados pelo sequenciamento do genoma do parental superior (B8C) em comparação com a estirpe controle (PE-2). Os polimorfismos identificados são

utilizados como marcadores naturais para diferenciar os alelos do parental inferior dos alelos do parental superior.

Para avaliar a correta segregação de todos os cromossomos, um grupo de segregantes randômicos (não selecionados) também é sequenciado. Nesse caso, é esperada uma frequência de SNP em torno de 50%. Por outro lado, o sequenciamento do grupo de segregantes que apresentam a característica de interesse (superiores) mostram desvio na frequência de 50% dos SNPs quando um determinado *locus* do genoma está envolvido na determinação dessa característica de interesse. O aumento da frequência de SNPs acima de 50% indica que essa característica está relacionada a uma região genômica ligada ao parental superior, da mesma forma que a diminuição da frequência dos SNPs abaixo de 50% indica ligação dessa região com o parental inferior. Para a determinação dos QTLs, a frequência dos SNPs realizada pelo sequenciamento do genoma dos grupos de segregantes são plotados em função de sua posição no cromossomo. Posteriormente, os dados de sequenciamento são aperfeiçoados utilizando um algoritmo de modelo linear misto para determinar o intervalo de confiança da variabilidade de frequência dos SNPs (Haldermans, Shkedy et al. 2007). A identificação dos QTLs utiliza como modelo o *Hidden Markov Model* (HMM). Para cada polimorfismo o HMM tem três possibilidades: correlação com o parental superior, correlação com o parental inferior e sem correlação. A frequência dos SNPs do grupo de segregantes analisados com o HMM recebem pontuações de probabilidade, que indicam a qual possibilidade esse SNP está relacionado, ou seja, se ele tem uma relação com a característica e com qual parental esse SNP está relacionado.

Utilizando o algoritmo para a análise da correlação entre os SNPs relacionados a cada parental, superior e inferior, com a frequência desses SNPs nos grupos selecionado e randômico, foram determinadas quais regiões do genoma estavam relacionadas com a característica em estudo. A linha vermelha representa a frequência de SNPs do grupo selecionado, enquanto a linha preta representa a frequência dos SNPs do grupo não selecionado. Após o mapeamento dos QTLs para a tolerância ao alumínio, onde valores de  $p$  menores que 0.05 são considerados como regiões estatisticamente correlacionadas com o fenótipo de interesse, apenas um QTL foi identificado, sendo localizado no cromossomo VI (Figura 23).

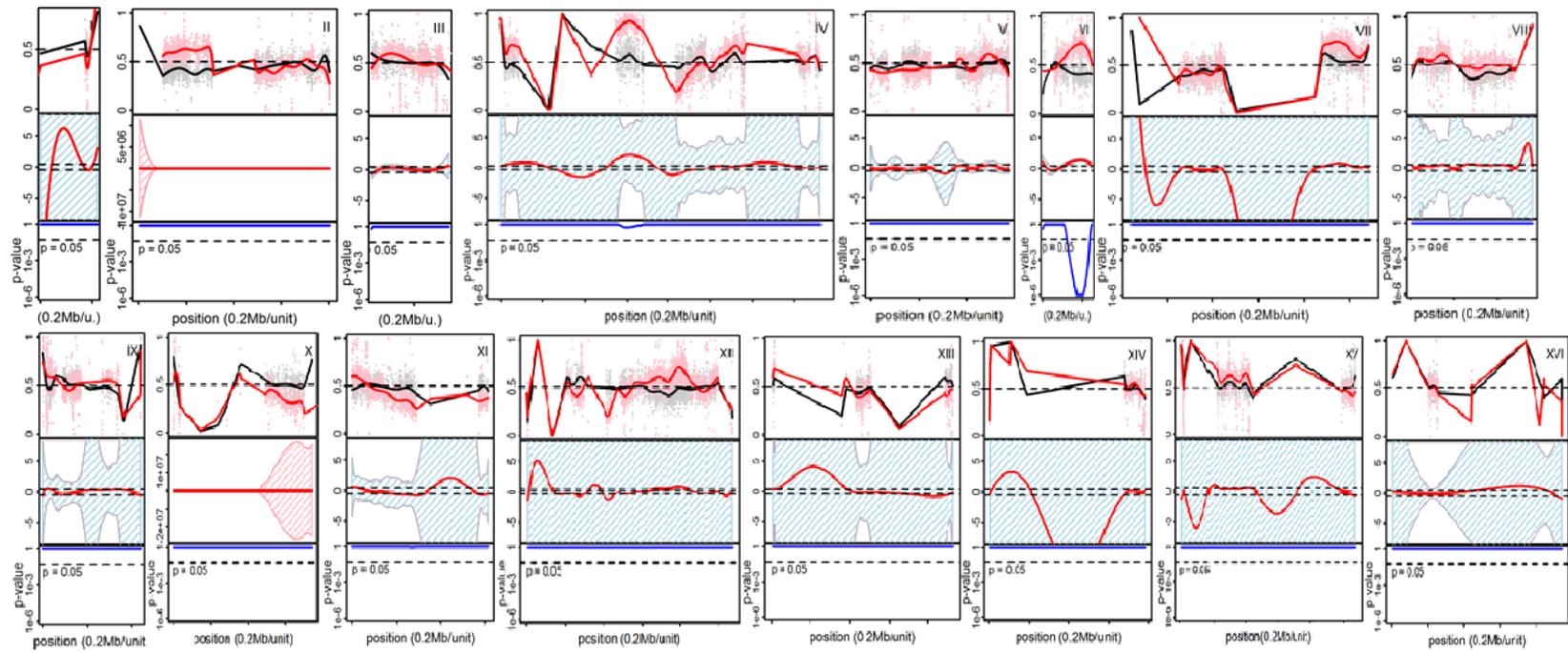


Figura 23: Mapeamento genético dos QTLs envolvidos com a tolerância ao alumínio.

Devido à forte ligação identificada no cromossomo VI, foi realizada uma busca no SGD (*Saccharomyces Genome Database*) para visualizar todos os genes presentes no QTL em questão. Os dados são mostrados na Figura 24.

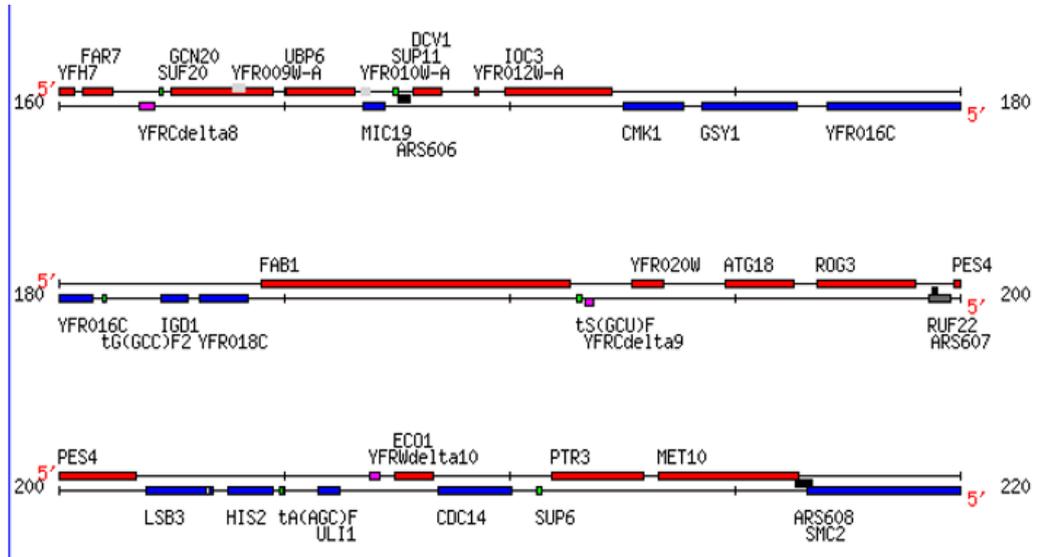


Figura 24: Genes identificados no QTL do cromossomo VI.

Optou-se pela deleção do gene a partir do ponto central do QTL, que se encontra próximo à posição 185000pb do cromossomo VI. O gene nesta região é o gene *FAB1*.

#### 4.9 – Análise de Reciprocidade Hemizigótica (ARH)

Ao analisar o mapa de QTL e os genes compreendidos nessa região do cromossomo VI, o gene *FAB1* foi escolhido para a Análise de Reciprocidade Hemizigótica, uma vez que se encontra na região central do QTL, sendo esse um forte indício de sua importância para o fenótipo em estudo. Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado a relação do gene *FAB1* com a resistência a metais, como cádmio, zinco,

cobalto, níquel e arsênio (Paumi, Menendez et al. 2007, Ruotolo, Marchini et al. 2008, Bleackley, Young et al. 2011, Jiang, Cao et al. 2014).

O gene *FAB1* codifica a fosfatidilinositol (3) fosfato 5-quinase, responsável pela síntese de fosfatidilinositol 3,5- bifosfato (PI (3,5) P2), a partir de fosfatidilinositol -3- fosfato (Cooke, Dove et al. 1998). O fosfatidilinositol-3-fosfato é produzido pela fosfatidil inositol-3-quinase (Schu, Takegawa et al. 1993). Fab1p localiza-se na membrana vacuolar, sendo a única quinase que sintetiza o fosfatidilinositol 3,5- bifosfato (Odorizzi, Babst et al. 1998), necessário ao adequado transporte de carga endocítica através do corpo do endossoma para o lúmen do vacúolo (Shaw, Hama et al. 2003), além de estar envolvido na resposta celular a alterações no ambiente osmótico (Bonangelino, Nau et al. 2002).

Então, foram realizados a deleção desse gene em cada um dos parentais (superior e inferior) e posterior cruzamento entre o parental deletado e o não deletado a fim de se obter indivíduos diploides, geneticamente idênticos, sendo a única diferença o alelo onde o gene *FAB1* foi deletado. Foram realizadas fermentações para confirmar a relação desse gene com a tolerância ao alumínio, além de confirmar qual alelo foi responsável por tal efeito.

A Figura 25 representa os resultados obtidos na fermentação da Análise de Reciprocidade Hemizigótica. É possível observar que, quando o gene *FAB1* está deletado no alelo do parental superior (8.20D), ocorre um prolongamento no tempo de fermentação, o que demonstra que ocorreu uma diminuição da tolerância ao alumínio quando comparado ao diploide não deletado. Ademais, quando o gene *FAB1* está deletado no alelo inferior, há um aumento da tolerância ao alumínio, pois ocorre uma melhora no perfil fermentativo desse diploide. Sendo assim, podemos concluir que o gene *FAB1* presente no alelo superior confere a tolerância ao alumínio.

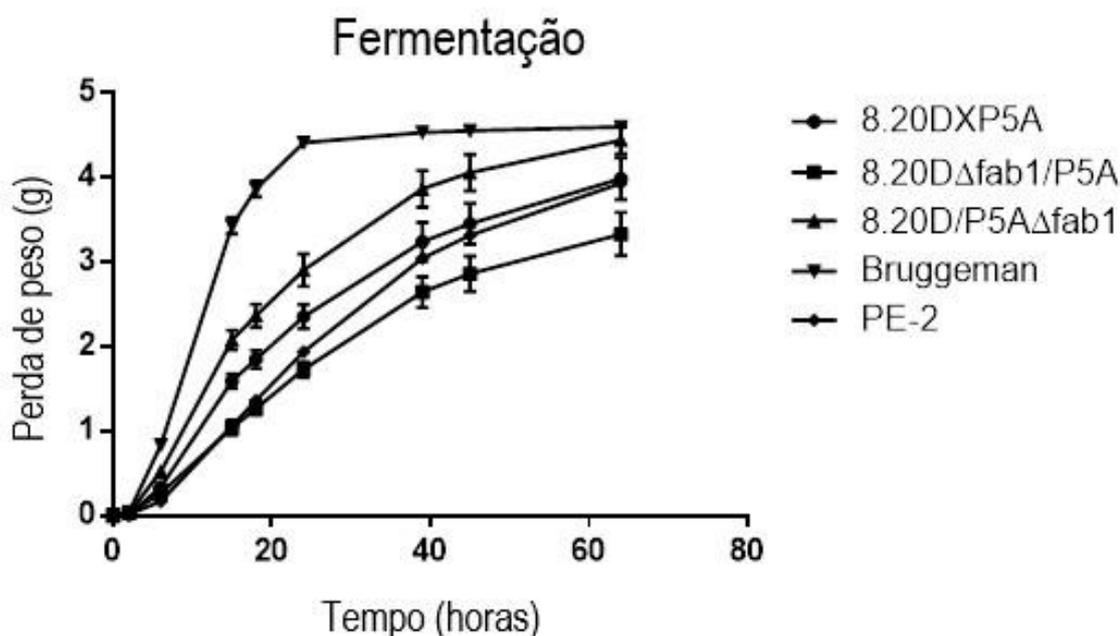


Figura 25: Análise de Reciprocidade Hemizigótica. Fermentação realizada em meio YPS 20% com 5mM de  $Al_2(SO_4)_3$ .

Como se sabe, os fosfatidilinositois (PtdIns) regulam muitos processos fundamentais na célula, incluindo o transporte de membrana, crescimento celular, remodelamento do citoesqueleto e eventos nucleares. Dove et al (1997) demonstraram que os níveis de PtdIns 3,5-bifosfato (PI(3,5)P2) aumentaram até 20 vezes em células de leveduras sob estresse hiperosmótico, exercendo papel importante no tamanho e na forma do vacúolo (Dove, Cooke et al. 1997).

PI(3,5)P2 promove a ativação de proteínas de canais (TPC1 e TPC2), que mediam a liberação de cálcio do endolisossoma para o citosol (Wang, Zhang et al. 2012). Além disso, a acidificação vacuolar é diminuída em leveduras *fab1 $\Delta$*  e *vac7 $\Delta$*  (Yamamoto, DeWald et al. 1995). Esses estudos sugerem que PI(3,5)P2 é crucial para a regulação de canais de íons específicos nos endossomas e lisossomas e, possivelmente, afeta a acidificação vacuolar. Efeitos no pH vacuolar podem estar relacionados à regulação direta da v-ATPase pela PI(3,5)P2 (Li, Diakov et al. 2014).

As etapas que iniciam a sinalização em resposta ao alumínio ainda não são bem compreendidas. Em plantas, foi demonstrado que o alumínio pode agir em vias de transdução de sinal, reduzindo a atividade da fosfolipase C (PLC) e provocando a redução da formação do inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) (Martinez-Estevez, Racagni-Di Palma et al. 2003). PLC está relacionado com processos como crescimento, desenvolvimento e diferenciação devido ao seu papel na liberação de cálcio, ativação de proteínas quinases e na regulação de canais iônicos. A diminuição dos níveis de IP<sub>3</sub> citosólico pode levar a uma diminuição de certos eventos de transdução de sinal importantes para a célula. A diminuição da atividade de PLC pode levar à diminuição de diacilglicerol (DAG), reduzindo a formação de ácido fosfatídico, outro importante segundo mensageiro celular (Quintal-Tun, Munoz-Sanchez et al. 2007). Além disso, tanto a atividade da fosfolipase C quanto os níveis de DAG são inibidos pela presença de alumínio em plantas (Quintal-Tun, Munoz-Sanchez et al. 2007, Pejchar and Martinec 2015), sugerindo que os efeitos tóxicos do alumínio podem estar relacionados a essa via de sinalização. Com a inibição da fosfolipase C ocorre a diminuição da concentração de IP<sub>3</sub>. Nesse contexto, foi ainda demonstrado que a toxicidade ao alumínio está relacionada à atividade da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana em diversas plantas, sendo que sua ativação aumenta a tolerância ao alumínio (Zhang, Wei et al. 2017).

Alguns trabalhos demonstraram a relação dos níveis de cálcio com o estresse ao alumínio. Zhang et al. (2017) demonstraram que sob condições de estresse ao alumínio há aumento dos níveis de Ca<sup>2+</sup> em células de levedura.

Uma hipótese para justificar a importância do gene *FABI* no mecanismo de tolerância ao alumínio em leveduras seria o fato de que a proteína Fab1p estando mais ativa levaria a uma maior liberação de cálcio. Coincidentemente, diversos trabalhos do nosso laboratório já demonstraram de forma inequívoca a relação entre disponibilidade de cálcio no citosol e uma maior atividade da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana citoplasmática (Brandao, de Magalhaes-Rocha et al. 1994, Tropa, Cardoso et al. 2006, Pereira, Tisi et al. 2008, Groppi, Belotti et al. 2011, Bouillet, Cardoso et al. 2012, Brandão 2014, Pereira, Castanheira et al. 2015, Santana, Faria-Oliveira et al. 2015).

Alternativamente, o IP<sub>3</sub> gerado, em células tolerantes ao alumínio, estaria desencadeando a mobilização de cálcio no citosol. O aumento da concentração de cálcio

citossólico, juntamente com a formação de DAG, poderia levar a um aumento da atividade da proteína quinase C, e, assim, a ativação da V-ATPase.

Foi realizado o alinhamento do genoma das estirpes 8.20D, P5A, LBCM47 e S288c (tabela 3). Observa-se mutações não sinônimas em 7 posições da região do gene *FABI*, que podem estar relacionadas ao fenótipo de tolerância ao alumínio.

Tabela 3: Alinhamento dos SNPs das cepas 8.20D (superior), P5A (inferior), LBCM 47 e S288c. Aminoácido identificado nos parentais superior e inferior nas posições dos SNPs com a respectiva identidade nestas posições.

Posição	8.20D	P5A	LBCM47	S288c	Superior	Inferior	Identidade
186000	T	C	C	C	Valina	Alanina	75-89%
187146	C	A	A	A	Treonina	Asparagina	90-99%
187893	A	G	G	G	Glutamina	Arginina	90-99%
187912	T	G	G	G	Isoleucina	Metionina	90-99%
189156	T	G	T	G	Isoleucina	Arginina	90-99%
190218	G	C	C	C	Arginina	Treonina	100%
190376	A	G	G	G	Treonina	Alanina	90-99%

A posição 189156 do gene *FABI* apresenta para as estirpes 8.20D e LBCM47 uma timina (T), enquanto que para as estirpes P5A e S288c apresentam uma guanina (G). Esta modificação leva a substituição de um aminoácido de arginina no parental inferior, para um aminoácido de Isoleucina no parental superior. Esta posição apresenta grande potencial para o estudo de modificação de SNP para a determinação deste fenótipo, entretanto as outras posições devem ser igualmente estudadas para se determinar qual modificação é responsável pela característica de maior tolerância ao alumínio.

## 5 – CONCLUSÕES

A presença de alumínio no meio fermentativo apresenta-se como um fator de prolongamento do tempo de fermentação, um problema do ponto de vista industrial, que causa prejuízos à indústria sucroalcooleira.

A metodologia de mapeamento de QTL foi eficaz na análise da influência genética de características fenotípicas complexas em leveduras, sendo possível determinar não apenas a região de interesse, como também modificações genéticas que levam a um aumento de determinado fenótipo.

A estirpe *Bruggeman fresh* apresentou maior tolerância ao alumínio em meio fermentativo contendo alumínio.

A partir da análise de reciprocidade hemizigótica foi possível concluir que o gene *FAB1* exerce um importante papel no mecanismo de tolerância ao alumínio em células de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo os SNPs presentes no alelo do parental superior responsáveis pelo aumento dessa tolerância.

## **6 – PERSPECTIVAS**

- Avaliar outros genes candidatos localizados na região do QTL encontrado que possam estar envolvidos em sinergismo com o gene *FABI*;
- Verificar a influência do alelo superior para o parental inferior quanto à tolerância ao alumínio;

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABT, T. D.; SOUFFRIAUX, B.; FOULQUIE-MORENO, M. R.; DUITAMA, J.; THEVELEIN, J. M. (2016). "Genomic saturation mutagenesis and polygenic analysis identify novel yeast genes affecting ethyl acetate production, a non-selectable polygenic trait." Microb Cell **3** (4): 159-175.

Ahn, S. J., M. Sivaguru, H. Osawa, G. C. Chung and H. Matsumoto (2001). "Aluminum inhibits the H(+)-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots." Plant Physiol **126** (4): 1381-1390.

Alexandre, H., V. Ansanay-Galeote, S. Dequin and B. Blondin (2001). "Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS letters **498** (1): 98-103.

AMORIM, H. V. d. B., Luiz Carlos ; LIMA, Urgel de Almeida (2001). Produção de etanol. São Paulo.

Andrade, E. T. d., S. R. G. d. Carvalho and L. F. d. Souza (2010). "Programa do Proálcool e o etanol no Brasil." ENGEVISTA **11** (2).

Bai, F. W., W. A. Anderson and M. Moo-Young (2008). "Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks." Biotechnol Adv **26** (1): 89-105.

Basso, L. C., H. V. de Amorim, A. J. de Oliveira and M. L. Lopes (2008). "Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil." FEMS Yeast Res **8**: 1155-1163.

Basso, L. C., S. N. Rocha and T. O. Basso (2011). Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation, INTECH Open Access Publisher.

Bastos, V. D. (2007). "Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias." BNDES Setorial, Rio de Janeiro (25): 5-38.

Bleackley, M. R., B. P. Young, C. J. Loewen and R. T. MacGillivray (2011). "High density array screening to identify the genetic requirements for transition metal tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*." Metallomics **3** (2): 195-205.

Bonangelino, C. J., J. J. Nau, J. E. Duex, M. Brinkman, A. E. Wurmser, J. D. Gary, S. D. Emr and L. S. Weisman (2002). "Osmotic stress-induced increase of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate requires Vac14p, an activator of the lipid kinase Fab1p." J Cell Biol **156** (6): 1015-1028.

Bouillet, L. E., A. S. Cardoso, E. Perovano, R. R. Pereira, E. M. Ribeiro, M. J. Tropia, L. G. Fietto, R. Tisi, E. Martegani, I. M. Castro and R. L. Brandao (2012). "The involvement of calcium carriers and of the vacuole in the glucose-induced calcium signaling and activation of the plasma membrane H<sup>(+)</sup>-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells." Cell Calcium **51** (1): 72-81.

Boulton, C. and D. Quain (2008). Brewing yeast and fermentation, John Wiley & Sons.

Brandão, R. (2014). The Relationship between Glucose-Induced Calcium Signaling and Activation of the Plasma Membrane H<sup>(+)</sup>-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* Cells.

Brandao, R. L., N. M. de Magalhaes-Rocha, R. Alijo, J. Ramos and J. M. Thevelein (1994). "Possible involvement of a phosphatidylinositol-type signaling pathway in glucose-induced activation of plasma membrane H<sup>(+)</sup>-ATPase and cellular proton extrusion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Biochim Biophys Acta **1223** (1): 117-124.

Briza, P., M. Breitenbach, A. Ellinger and J. Segall (1990). "Isolation of two developmentally regulated genes involved in spore wall maturation in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Dev **4** (10): 1775-1789.

Casa, A. M., C. Brouwer, A. Nagel, L. Wang, Q. Zhang, S. Kresovich and S. R. Wessler (2000). "The MITE family heartbreaker (Hbr): molecular markers in maize." Proc Natl Acad Sci U S A **97** (18): 10083-10089.

Claesen, J., L. Clement, Z. Shkedy, M. R. Foulquie-Moreno and T. Burzykowski (2013). "Simultaneous mapping of multiple gene loci with pooled segregants." PLoS One **8** (2): e55133.

Clancy, M. J., M. E. Shambaugh, C. S. Timpte and J. A. Bokar (2002). "Induction of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* leads to the formation of N6-methyladenosine in mRNA: a potential mechanism for the activity of the IME4 gene." Nucleic Acids Res **30** (20): 4509-4518.

Coluccio, A., E. Bogengruber, M. N. Conrad, M. E. Dresser, P. Briza and A. M. Neiman (2004). "Morphogenetic pathway of spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*." Eukaryot Cell **3** (6): 1464-1475.

Cooke, F. T., S. K. Dove, R. K. McEwen, G. Painter, A. B. Holmes, M. N. Hall, R. H. Michell and P. J. Parker (1998). "The stress-activated phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase Fab1p is essential for vacuole function in *S. cerevisiae*." Curr Biol **8** (22): 1219-1222.

Demirbaşı, A. (2005). "Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass." Energy Sources **27** (4): 327-337.

Deutschbauer, A. M. and R. W. Davis (2005). "Quantitative trait loci mapped to single-nucleotide resolution in yeast." Nat Genet **37** (12): 1333-1340.

Dove, S. K., F. T. Cooke, M. R. Douglas, L. G. Sayers, P. J. Parker and R. H. Michell (1997). "Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis." Nature **390** (6656): 187-192.

Duitama, J., J. C. Quintero, D. F. Cruz, C. Quintero, G. Hubmann, M. R. Foulquie-Moreno, K. J. Verstrepen, J. M. Thevelein and J. Tohme (2014). "An integrated framework for discovery and genotyping of genomic variants from high-throughput sequencing experiments." Nucleic Acids Res **42** (6): e44.

Duitama, J., A. Sanchez-Rodriguez, A. Goovaerts, S. Pulido-Tamayo, G. Hubmann, M. R. Foulquie-Moreno, J. M. Thevelein, K. J. Verstrepen and K. Marchal (2014). "Improved linkage analysis of Quantitative Trait Loci using bulk segregants unveils a novel determinant of high ethanol tolerance in yeast." BMC Genomics **15**: 207.

Duitama, J., A. Sánchez-Rodríguez, A. Goovaerts, S. Pulido-Tamayo, G. Hubmann, M. R. Foulquie-Moreno, J. M. Thevelein, K. J. Verstrepen and K. Marchal (2014). "Improved linkage analysis of Quantitative Trait Loci using bulk segregants unveils a novel determinant of high ethanol tolerance in yeast." BMC genomics **15** (1): 1.

Ekino, K., I. Kwon, M. Goto, S. Yoshino and K. Furukawa (1999). "Functional analysis of HO gene in delayed homothallism in *Saccharomyces cerevisiae* wy2." Yeast **15** (6): 451-458.

Ezov, T. K., S.-L. Chang, Z. E. Frenkel, A. V. Segre, M. Bahalul, A. W. Murray, J.-Y. Leu, A. Korol and Y. Kashi (2010). "Heterothallism in *Saccharomyces cerevisiae* isolates from nature: effect of HO locus on the mode of reproduction." Molecular ecology.

Ferreira, L. V., H. Amorim and L. Basso (1999). "Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*." Cienc Tecnol Aliment **19**: 29-32.

Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin and S. G. Oliver (1996). "Life with 6000 genes." Science **274** (5287): 546, 563-547.

Groppi, S., F. Belotti, R. L Brandão, E. Martegani and R. Tisi (2011). Glucose-induced calcium influx in budding yeast involves a novel calcium transport system and can activate calcineurin.

Gupta, P. K. and S. Rustgi (2004). "Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants." Funct Integr Genomics **4** (3): 139-162.

Haber, J. E. (2012). "Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **191** (1): 33-64.

Haldermans, P., Z. Shkedy, S. Van Sanden, T. Burzykowski and M. Aerts (2007). "Using linear mixed models for normalization of cDNA microarrays." Stat Appl Genet Mol Biol **6**: Article 19.

Hamilton, C. A., A. G. Good and G. J. Taylor (2001). "Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase, but not mitochondrial F1F0-ATPase, is required for aluminum resistance in *Saccharomyces cerevisiae*." FEMS Microbiol Lett **205** (2): 231-236.

Hill, W. G. and T. F. Mackay (2004). "D. S. Falconer and Introduction to quantitative genetics." Genetics **167** (4): 1529-1536.

Hohmann, S. and W. H. Mager (2003). Yeast stress responses. Berlin ; New York, Springer.

Hu, X., M. Wang, T. Tan, J. Li, H. Yang, L. Leach, R. Zhang and Z. Luo (2007). "Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **175** (3): 1479-1487.

Hubmann, G., L. Mathe, M. R. Foulquie-Moreno, J. Duitama, E. Nevoigt and J. M. Thevelein (2013). "Identification of multiple interacting alleles conferring low glycerol and high ethanol yield in *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation." Biotechnol Biofuels **6** (1): 87.

Huxley, C., E. D. Green and I. Dunham (1990). "Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR." Trends Genet **6** (8): 236.

Ibeto, C., A. Ofoefule and K. Agbo (2011). "A global overview of biomass potentials for bioethanol production: A renewable alternative fuel." Trends Appl Sci Res **6**: 410-425.

İçöz, E., K. M. Tuğrul, A. Saral and E. İçöz (2009). "Research on ethanol production and use from sugar beet in Turkey." Biomass and Bioenergy **33** (1): 1-7.

Jiang, L., C. Cao, L. Zhang, W. Lin, J. Xia, H. Xu and Y. Zhang (2014). "Cadmium-induced activation of high osmolarity glycerol pathway through its Sln1 branch is dependent on the MAP kinase kinase kinase Ssk2, but not its paralog Ssk22, in budding yeast." FEMS Yeast Research **14** (8): 1263-1272.

Kakimoto, M., A. Kobayashi, R. Fukuda, Y. Ono, A. Ohta and E. Yoshimura (2005). "Genome-wide screening of aluminum tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*." Biometals **18** (5): 467-474.

Kearsey, M. J. and A. G. Farquhar (1998). "QTL analysis in plants; where are we now?" Heredity (Edinb) **80** (Pt 2): 137-142.

Knauf, M. and K. Kraus (2006). "Specific yeasts developed for modern ethanol production." Sugar Industry/Zuckerindustrie **131** (11): 753-758.

Legras, J. L., D. Merdinoglu, J. M. Cornuet and F. Karst (2007). "Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history." Mol Ecol **16** (10): 2091-2102.

Li, S. C., T. T. Diakov, T. Xu, M. Tarsio, W. Zhu, S. Couoh-Cardel, L. S. Weisman and P. M. Kane (2014). "The signaling lipid PI(3,5)P(2) stabilizes V(1)–V(o) sector interactions and activates the V-ATPase." Mol Biol Cell **25** (8): 1251-1262.

MacDiarmid, C. W. and R. C. Gardner (1998). "Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion." Journal of Biological Chemistry **273** (3): 1727-1732.

Mackay, T. F. (2001). "Quantitative trait loci in *Drosophila*." Nat Rev Genet **2**(1): 11-20.

Mackay, T. F., E. A. Stone and J. F. Ayroles (2009). "The genetics of quantitative traits: challenges and prospects." Nat Rev Genet **10** (8): 565-577.

Martinez-Estevez, M., G. Racagni-Di Palma, J. A. Munoz-Sanchez, L. Brito-Argaez, V. M. Loyola-Vargas and S. M. Hernandez-Sotomayor (2003). "Aluminium differentially modifies lipid metabolism from the phosphoinositide pathway in *Coffea arabica* cells." J Plant Physiol **160** (11): 1297-1303.

McGovern, P. E., J. Zhang, J. Tang, Z. Zhang, G. R. Hall, R. A. Moreau, A. Nunez, E. D. Butrym, M. P. Richards, C. S. Wang, G. Cheng, Z. Zhao and C. Wang (2004). "Fermented beverages of pre- and proto-historic China." Proc Natl Acad Sci U S A **101** (51): 17593-17598.

Meijnen, J. P., P. Randazzo, M. R. Foulquie-Moreno, J. van den Brink, P. Vandecruys, M. Stojiljkovic, F. Dumortier, P. Zalar, T. Boekhout, N. Gunde-Cimerman, J. Kokosar, M. Stajdohar, T. Curk, U. Petrovic and J. M. Thevelein (2016). "Polygenic analysis and targeted improvement of the complex trait of high acetic acid tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Biotechnol Biofuels **9**: 5.

Menezes, T. J. (1980). Etanol, o combustível do Brasil. Etanol, o combustível do Brasil, Ed. Agronomica Ceres.

Mitchell, A. P. (1994). "Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol Rev **58** (1): 56-70.

Montelone, B. A. (2002). "Yeast mating type." eLS.

Mussatto, S. I., G. Dragone, P. M. Guimaraes, J. P. Silva, L. M. Carneiro, I. C. Roberto, A. Vicente, L. Domingues and J. A. Teixeira (2010). "Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production." Biotechnol Adv **28** (6): 817-830.

Neiman, A. M. (2011). "Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **189** (3): 737-765.

Odorizzi, G., M. Babst and S. D. Emr (1998). "Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body." Cell **95** (6): 847-858.

Pais, T. M., M. R. Foulquie-Moreno, G. Hubmann, J. Duitama, S. Swinnen, A. Goovaerts, Y. Yang, F. Dumortier and J. M. Thevelein (2013). "Comparative polygenic analysis of maximal ethanol accumulation capacity and tolerance to high ethanol levels of cell proliferation in yeast." PLoS Genet **9** (6): e1003548.

Paumi, C. M., J. Menendez, A. Arnoldo, K. Engels, K. R. Iyer, S. Thaminy, O. Georgiev, Y. Barral, S. Michaelis and I. Stagljar (2007). "Mapping protein-protein interactions for the yeast ABC transporter Ycf1p by integrated split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid analysis." Mol Cell **26** (1): 15-25.

Pejchar, P. and J. Martinec (2015). "Aluminum ions alter the function of non-specific phospholipase C through the changes in plasma membrane physical properties." Plant Signal Behav **10** (6): e1031938.

Pereira, M. B., R. Tisi, L. G. Fietto, A. S. Cardoso, M. M. Franca, F. M. Carvalho, M. J. Tropaia, E. Martegani, I. M. Castro and R. L. Brandao (2008). "Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone induced calcium signaling and activation of plasma membrane H(+)-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." FEMS Yeast Res **8** (4): 622-630.

Pereira, R. R., D. Castanheira, J. A. Teixeira, L. E. Bouillet, E. M. Ribeiro, M. M. Tropic, F. Alvarez, L. F. Correa, B. E. Mota, L. E. Conceicao, I. M. Castro and R. L. Brandao (2015). "Detailed search for protein kinase(s) involved in plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity regulation of yeast cells." FEMS Yeast Res **15** (2).

Piekarska, I., J. Rytka and B. Rempola (2010). "Regulation of sporulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Acta Biochim Pol **57** (3): 241-250.

Pretorius, I. S. (2000). "Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking." Yeast **16** (8): 675-729.

Quintal-Tun, F., J. A. Munoz-Sanchez, A. Ramos-Diaz, A. Escamilla-Bencomo, M. Martinez-Estevez, C. Exley and S. M. Hernandez-Sotomayor (2007). "Aluminium-induced phospholipid signal transduction pathway in *Coffea arabica* suspension cells and its amelioration by silicic acid." J Inorg Biochem **101** (2): 362-369.

Remington, D. L., M. C. Ungerer and M. D. Purugganan (2001). "Map-based cloning of quantitative trait loci: progress and prospects." Genet Res **78** (3): 213-218.

Roeder, A. D. and J. M. Shaw (1996). "Vacuole partitioning during meiotic division in yeast." Genetics **144** (2): 445-458.

Roff, D. A. (2007). "A centennial celebration for quantitative genetics." Evolution **61**(5): 1017-1032.

Ruotolo, R., G. Marchini and S. Ottonello (2008). "Membrane transporters and protein traffic networks differentially affecting metal tolerance: a genomic phenotyping study in yeast." Genome Biol **9** (4): R67.

Santana, E. P., F. Faria-Oliveira, D. Castanheira, R. R. Pereira, F. S. Siqueira, M. J. Trópia, R. Tisi, E. Martegani, I. M. Castro and R. L. Brandão (2015). How calcium

signalling is connected to glucose – induced plasma membrane ATPase activation in Saccharomyces cerevisiae cells.

Schott, E. J. and R. C. Gardner (1997). "Aluminum-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Gen Genet **254** (1): 63-72.

Schu, P. V., K. Takegawa, M. J. Fry, J. H. Stack, M. D. Waterfield and S. D. Emr (1993). "Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting." Science **260** (5104): 88-91.

Segre, A. V., A. W. Murray and J. Y. Leu (2006). "High-resolution mutation mapping reveals parallel experimental evolution in yeast." PLoS Biol **4** (8): e256.

Shaw, J. D., H. Hama, F. Sohrabi, D. B. DeWald and B. Wendland (2003). "PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> is required for delivery of endocytic cargo into the multivesicular body." Traffic **4** (7): 479-490.

Sherman, F. (2002). "Getting started with yeast." Methods Enzymol **350**: 3-41.

Sherman, F. and J. Hicks (1991). "Micromanipulation and dissection of asci." Methods Enzymol **194**: 21-37.

Shuster, E. O. and B. Byers (1989). "Pachytene arrest and other meiotic effects of the start mutations in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **123** (1): 29-43.

Steinmetz, L. M., H. Sinha, D. R. Richards, J. I. Spiegelman, P. J. Oefner, J. H. McCusker and R. W. Davis (2002). "Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast." Nature **416** (6878): 326-330.

Suda, Y., H. Nakanishi, E. M. Mathieson and A. M. Neiman (2007). "Alternative modes of organellar segregation during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*." Eukaryot Cell **6** (11): 2009-2017.

Swinnen, S., K. Schaerlaekens, T. Pais, J. Claesen, G. Hubmann, Y. Yang, M. Demeke, M. R. Foulquie-Moreno, A. Goovaerts, K. Souvereyns, L. Clement, F. Dumortier and J. M. Thevelein (2012). "Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis." Genome Res **22** (5): 975-984.

Trindade de Carvalho, B., S. Holt, B. Souffriau, R. Lopes Brandao, M. R. Foulquie-Moreno and J. M. Thevelein (2017). "Identification of Novel Alleles Conferring Superior Production of Rose Flavor Phenylethyl Acetate Using Polygenic Analysis in Yeast." MBio **8** (6).

Tropia, M. J., A. S. Cardoso, R. Tisi, L. G. Fietto, J. L. Fietto, E. Martegani, I. M. Castro and R. L. Brandao (2006). "Calcium signaling and sugar-induced activation of plasma membrane H(+)-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells." Biochem Biophys Res Commun **343** (4): 1234-1243.

Vignal, A., D. Milan, M. SanCristobal and A. Eggen (2002). "A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics." Genet Sel Evol **34** (3): 275-305.

Wang, X., X. Zhang, X. P. Dong, M. Samie, X. Li, X. Cheng, A. Goschka, D. Shen, Y. Zhou, J. Harlow, M. X. Zhu, D. E. Clapham, D. Ren and H. Xu (2012). "TPC proteins are phosphoinositide- activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes." Cell **151** (2): 372-383.

Yamamoto, A., D. B. DeWald, I. V. Boronenkov, R. A. Anderson, S. D. Emr and D. Koshland (1995). "Novel PI(4)P 5-kinase homologue, Fab1p, essential for normal vacuole function and morphology in yeast." Mol Biol Cell **6** (5): 525-539.

Zhang, J., J. Wei, D. Li, X. Kong, Z. Rengel, L. Chen, Y. Yang, X. Cui and Q. Chen (2017). "The Role of the Plasma Membrane H(+)-ATPase in Plant Responses to Aluminum Toxicity." Front Plant Sci **8**: 1757.

Zimmer, A., C. Durand, N. Loira, P. Durrens, D. J. Sherman and P. Marullo (2014). "QTL dissection of Lag phase in wine fermentation reveals a new translocation responsible for *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to sulfite." PLoS One **9**(1): e86298.