



# ANÁLISE DA VARIAÇÃO CARIOTÍPICA EM LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* UTILIZADAS NA INDÚSTRIA DE ETANOL

DUARTE, F.M.<sup>1</sup>; MISSAWA, S.K.<sup>1</sup>; GALZERANI, F.<sup>1</sup>; CARVALHO NETTO, O.V.<sup>1</sup>; CARAZZOLLE, M.F.<sup>1</sup>; GOMES, L.H.<sup>2</sup>; TAVARES, F.C.A.<sup>2</sup>; ANDRIETTA, M.G.S.<sup>3</sup>; MIECZKOWSKI, P.<sup>4</sup>; PETES, T.D.<sup>4</sup>; PEREIRA, G.A.G.<sup>1</sup>; ARGUESO, J.L.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Expressão - Departamento de Genética e Evolução - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas;  
<sup>2</sup>Laboratório de Leveduras - Departamento de Genética - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo;  
<sup>3</sup>Divisão de Biotecnologia e Processos - Centro PluriDisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - Universidade Estadual de Campinas;  
<sup>4</sup>Department of Molecular Genetics and Microbiology - Duke University  
 Email: [fmelo@tge.ibi.unicamp.br](mailto:fmelo@tge.ibi.unicamp.br)

Palavras-chave: Etanol - *Saccharomyces cerevisiae* - linhagem industrial



## RESUMO

Apesar do interesse global na produção de etanol combustível, existem poucos estudos sobre as linhagens industriais da levedura *Saccharomyces cerevisiae* responsáveis pela conversão de sacarose a etanol nas usinas. Neste projeto foi analisada a estrutura de organização do genoma na linhagem industrial de *S. cerevisiae* JAY270, derivada de uma linhagem selvagem de alto rendimento isolada de processos fermentativos no Brasil. As análises de genômica comparativa foram realizadas aproveitando a vasta disponibilidade de informações sobre linhagens laboratoriais dessa levedura. Análises meióticas (Fig. 1 e 2) e de cariotipagem molecular (Fig. 6) demonstraram que JAY270 é uma linhagem diplóide, naturalmente heterotálica. Além disso, cruzamentos entre JAY270 e a linhagem laboratorial padrão de *S. cerevisiae* (S288c) produziram híbridos viáveis e férteis (Fig. 3), confirmando que JAY270 de fato pertence a essa espécie. Análises do perfil cariotípico através de PFGE (Fig. 6) demonstraram que existem variações de tamanho em muitos dos cromossomos de JAY270 em relação ao perfil de S288c. Esse perfil também demonstrou que alguns cromossomos de JAY270 apresentam polimorfismo entre homólogos. Experimentos de sub-cultivo (Fig. 5) demonstraram que o cariótipo desta linhagem é estável sob condições de laboratório. A linhagem JAY270 também foi analisada através de CGH-array (Fig. 8), que demonstrou que a maior parte dos rearranjos cromossômicos existentes entre JAY270 e S288c está localizada nas regiões sub-teloméricas, além de pequenas deleções em regiões de sítios de DNA repetido em tandem. O CGH-array forneceu um esboço geral da organização genômica de JAY270 e confirmou que a mesma apresenta uma quantidade significativa de rearranjos cromossômicos, que foram explorados mais detalhadamente através de Band-arrays (Fig. 11) e Southern blot (Fig. 9). A caracterização da organização genômica nessa linhagem representa uma etapa importante para o desenvolvimento de estratégias de manipulação genética das linhagens industriais visando o melhoramento de características ligadas à produção de etanol.

## EXPERIMENTOS REALIZADOS:

### Linhagem JAY270:

- 1) Ploidia
- 2) Análise fenotípica
- 3) Experimento de sub-cultivo
- 4) Análises moleculares
  - A) Análise do cariótipo (PFGE)
  - B) CGH-arrays
  - C) Southern blot
  - D) Band-arrays

### 1) Ploidia

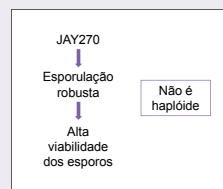


Fig. 1 Teste de Esporulação

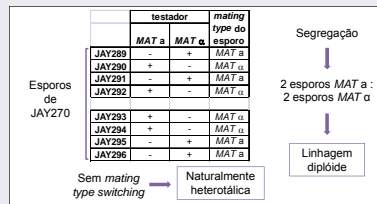


Fig. 2 Análise do mating type

Esporos de S288c (JAY300 x JAY289)	Esporos de JAY270 (JAY298 x JAY290)	Esporos viáveis por tétrade					
		Viabilidade	4	3	2	1	0
JAY300 x JAY289	JAY298 x JAY290	95%	9	-	1	-	-
JAY300 x JAY291	JAY298 x JAY291	77.5%	3	5	2	-	-
JAY300 x JAY292	JAY298 x JAY292	90%	7	2	1	-	-
JAY300 x JAY293	JAY298 x JAY293	75%	4	3	2	1	-

Compatibilidade cromossômica → Pertence à espécie *S. cerevisiae*

Fig. 3 Meiose nos híbridos S288c x JAY270

### 2) Análise fenotípica da produção de etanol

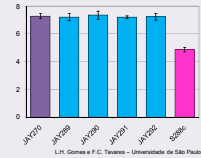


Fig. 4 Etanol (g/100mL) após 15 horas no caldo de cana-de-açúcar

- O rendimento de S288c é baixo se comparado ao de JAY270
- Fenótipo de produção de etanol não se segrega na meiose

### 3) Experimento de sub-cultivo

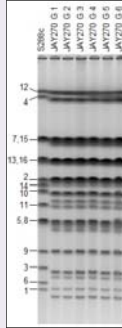


Fig. 5 PFGE para monitoramento da estabilidade cariotípica de JAY270 após seis sub-cultivos, isolando colônias a cada geração, totalizando cerca de 200 divisões celulares consecutivas

- O cariótipo de JAY270 é estável sob condições de laboratório

### 4) A- PFGE

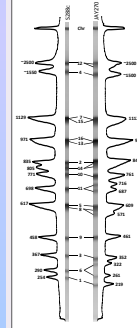


Fig. 6 Análise densitométrica de um perfil de PFGE comparando S288c e JAY270

- JAY270 apresenta diferença de tamanho em muitos cromossomos em relação a S288c
- Em JAY270 existe polimorfismo de homólogos nos cromossomos 3, 6, 8, 11, 12 e 14

### 4) B- Análise por CGH-array

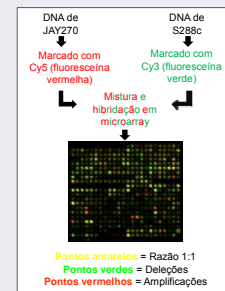


Fig. 7 Representação esquemática



Fig. 8 CGH-array entre as linhagens JAY270 e S288c

- A maior parte dos rearranjos cromossômicos existentes entre JAY270 e S288c está localizada nas regiões sub-teloméricas, além de pequenas deleções em regiões de sítios de DNA repetido em tandem

### 4) C- Southern blot

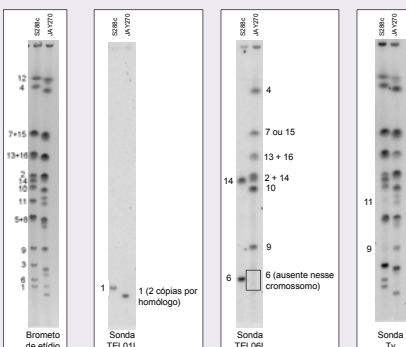


Fig. 9 Southern blot do cariótipo das linhagens S288c e JAY270

- A cópia extra da região telomérica esquerda do cromossomo 1 em JAY270 está localizada nesse mesmo cromossomo
- As cópias extras das regiões teloméricas esquerdas dos cromossomos 6 e 14 estão distribuídas em vários cromossomos em JAY270, embora tenha sido deletada do cromossomo 6
- A frequência/distribuição de Ty em JAY270 é similar a de S288c

### 4) D- Band-arrays

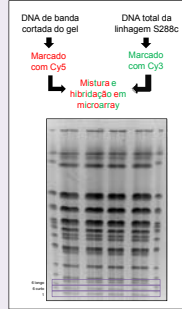


Fig. 10 Representação esquemática e indicação das bandas que foram recortadas do gel

- Existem aproximadamente 60 Kb de diferença entre os cromossomos 6 curto e longo. Essa diferença não pode ser evidenciada pelo Band-array e nem por uma diferença na ocorrência do transposon Ty nos dois cromossomos, o que mostra que trata-se de um DNA que é único de JAY270

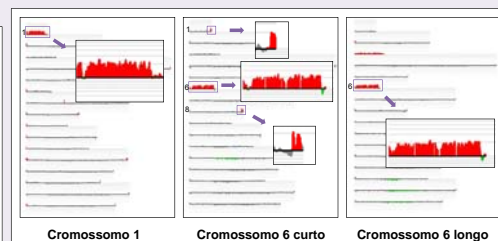


Fig. 11 Band-arrays de cromossomos de JAY270

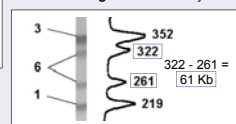


Fig. 12 Diferença de tamanho entre os cromossomos 6 curto e longo



Fig. 13 Detalhe representando a diferença entre os cromossomos 6 longo e curto no Band-array

## CONCLUSÕES

- JAY270 é uma linhagem diplóide, naturalmente heterotálica e pertence à espécie *S. cerevisiae*
- O fenótipo de alta produção de etanol não segrega na meiose: genes importantes devem estar em homocigose em JAY270
- O cariótipo de JAY270 é estável sob condições de laboratório
- A maioria dos rearranjos está localizada perto dos telômeros
- A frequência/distribuição de Ty em JAY270 é similar a de S288c
- JAY270 possui DNA que está ausente em S288c e S288c possui DNA que está ausente em JAY270