ESTABILIDADE GENÉTICA E HETEROSE EM HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE LEVEDURAS

SÉRGIO ECHEVERRIGARAY LAGUNA

Orientador: FLÁVIO C. A. TAVARES

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoria-mento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
1983

À minha esposa,
Ao meu filho,
Aos meus pais.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Manifestamos agradecimentos sinceros a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

- Prof. Dr. Flávio César Almeida Tavares
- Prof.^a Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner
- Prof. Dr. Ernesto Paterniani
- Isaías Olívio Geraldi
- Professores do Departamento de Genética, da ESALQ-USP
- Funcionários do Departamento de Genética, da ESALQ-USP
- Funcionários e Estagiários do Setor de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da ESALQ-USP: Antônio Rocha Campos, Luiz Próspero, Paulo Ortolan, André Luiz Ferraz, Ana Maria Brancalion, Francisco Pelissari, Denis Razera, Dair Bicudo Piaí, Marcos Pupin, Marco Aurélio de Castro Ribeiro e Marco Aurélio T. Ferraz
- Sr. José Broglio e Sr.^a Tekla Eunice Klar
- Colegas do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética da ESALQ-USP
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)
- Fundação de Incentivo à Pesquisa Técnico - Científica (FIPEC).

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Hibridização clássica	4
2.2. Protoplastos	9
2.2.1. Esferoplastização	9
2.2.2. Fusão	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Linhagens	28
3.2. Meios seletivos	32
3.3. Meios de cultura	33
3.3.1. Meio completo (YEPD)	34
3.3.2. Meio mínimo de Wickerham (MM).....	34
3.3.3. Meio de assimilação	35
3.3.4. Meio para determinação de atividade lipolítica	35
3.3.5. Meios de fermentação para caracteriza ção de linhagens	36
3.3.6. Meio de esporulação (Rafinose-Acetato)	36
3.3.7. Meio para detecção de "petites".....	37
3.3.8. Meio de amido	37

3.3.9. Meio mínimo com glicerol (MM glicero- rol)	37
3.3.10. Meios seletivos de regeneração....	38
3.3.11. Meio completo de regeneração.....	38
3.3.12. Meio de cobertura (OSA).....	39
3.3.13. Meio de multiplicação.....	39
3.3.14. Meio de melaço de cana para fermen- tação	39
3.3.15. Meio de amido para fermentação....	40
3.4. Soluções e tampões.....	40
3.4.1. Solução salina	40
3.4.2. Solução de cloreto de cálcio 1,2 M	40
3.4.3. Solução fusogênica (PEG 40%).....	40
3.4.4. Solução de EDTA 10 mM.....	41
3.4.5. Tampão sorbitol-fosfato (TSP).....	41
3.4.6. Solução de vitaminas (Wickerman)..	41
3.4.7. Solução de caseína hidrolisada....	42
3.4.8. Soluções de aminoácidos.....	43
3.4.9. Solução de ácidos nucleicos de le- veduras	43
3.4.10. Solução de extrato de leveduras...	43
3.4.11. Soluções de nucleotídeos.....	43
3.4.12. Solução de nistatina	43
3.4.13. Solução de lugol.....	44
3.4.14. Solução de sais para fermentações.	44

3.4.15. Reativo de Somogyi	44
3.4.16. Reativo de Nelson.....	45
3.4.17. Solução de amido dextrinizado.....	45
3.5. Esterilização e incubação.....	46
3.6. Caracterização das linhagens selvagens.....	46
3.7. Determinação das deficiências nutricionais..	47
3.8. Indução e enriquecimento de mutantes auxotró- ficos.....	48
3.9. Método para obtenção de conjugantes.....	49
3.9.1. Micromanipulação.....	49
3.9.2. Isolamento massivo.....	50
3.10. Indução e seleção de mutantes "petites" mi- tocondriais.....	50
3.11. Contagem do número total e dos tipos de as- cos.....	51
3.12. Isolamento de segregantes.....	52
3.13. Esferoplastização e fusão de protoplastos...	53
3.14. Isolamento de híbridos e testes adicionais em placas	55
3.15. Avaliação da estabilidade mitótica.....	55
3.16. Avaliação da capacidade fermentativa das li- nhagens	56
3.16.1. Preparo do inóculo.....	56
3.16.2. Fermentações	57
3.16.3. Destilação do vinho.....	57

3.16.4. Determinação do teor alcoólico do destilado	58
3.16.5. Análise dos componentes leves e alcoóis superiores do destilado.....	58
3.16.6. Determinação do açúcar redutor total do mosto	59
3.17. Cálculo da heterose.....	60
3.18. Determinação do volume celular.....	61
3.19. Análises de variância	61
3.20. Comparação das médias com o controle (Teste de Dunnett).....	62
4. RESULTADOS	63
4.1. Fusão de protoplastos com seleção de conjugantes baseada em caracteres naturais.....	63
4.2. Fusão de protoplastos com seleção de híbridos baseada em marcas auxotróficas	78
4.2.1. Fusões intraespecíficas em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
4.2.2. Fusões interespecíficas e intergenéricas	80
4.3. Híbridos interespecíficos obtidos por cruzamentos naturais.....	89
4.3.1. Avaliação da estabilidade genética em híbridos de <i>S. cerevisiae</i> <i>S. diastaticus</i>	89

4.3.2. Avaliação da heterose em híbridos naturais de <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. diastaticus</i>	96
4.3.3. Efeito da ploidia e dose gênica no comportamento fermentativo de híbridos entre <i>S. diastaticus</i> e <i>S. uvarum</i>	101
5. DISCUSSÃO	122
5.1. Recuperação e caracterização de híbridos.....	122
5.1.1. Fusões com marcas naturais.....	122
5.1.2. Fusões com marcadores genéticos	126
5.1.3. Cruzamentos naturais.....	130
5.2. Comportamento fermentativo e heterose.....	134
5.3. Estabilidade genética em híbridos interespecíficos	143
6. CONCLUSÕES	149
7. LITERATURA CITADA	153

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 3.1 - Linhagens de leveduras utilizadas com as respectivas características e procedências	29
Tabela 3.2 - Caracterização das linhagens selvagens de leveduras através dos comportamentos fermentativos, assimilação e outras (MM - Meio Mínimo).....	30
Tabela 3.3 - Determinação das deficiências nutricionais, das linhagens selvagens e com marcas auxotróficas.....	31
Tabela 4.1 - Caracterização dos isolados do cruzamento 2 por fusão de protoplastos, entre <i>Saccharomyces diastaticus</i> (57-5) e <i>S. baillii</i> (C-4) quanto ao crescimento em placas.....	66
Tabela 4.2 - Crescimento e floculação em meio de amido 2% sem inositol dos híbridos com morfologia <i>Diastaticus</i> do cruzamento 2 entre <i>S. diastaticus</i> (57-5) e <i>S. baillii</i> (C-4).....	68
Tabela 4.3 - Caracterização das colonias isoladas do cruzamento 3, entre <i>Candida utilis</i> (Ca-1) e <i>Kluyveromyces fragilis</i> (IZ.610) em meios seletivos com várias fontes de carbono e quanto à sua morfologia	70

Tabela 4.4 - Redução de Brix em fermentações em amido liquefeito dos híbridos isolados do cruzamento 1, por fusão de protoplastos, entre <i>S. cerevisiae</i> (C-74) e <i>S. diastaticus</i> (57-5)..	72
Tabela 4.5 - Avaliação da produção de etanol a partir de amido liquefeito dos híbridos selecionados obtidos do cruzamento por fusão de protoplastos entre <i>S. cerevisiae</i> (C-74) e <i>S. diastaticus</i> (57-5) Médias de 4 fermentações de 23 horas em amido dextrinizado, 15% em temperatura de 30°C (d' = 0,38 g/100 ml).....	74
Tabela 4.6 - Análise de variância para os dados da Tabela 4.5. Experimento inteiramente casualizado.....	74
Tabela 4.7 - Avaliação da fermentação em melaço de cana dos híbridos selecionados do cruzamentos 1 obtidos por fusão de protoplastos entre <i>S. cerevisiae</i> (C-74) e <i>S. diastaticus</i> (57-5). Média de 5 fermentações de 15 horas em meio com 21,5% de ART a 35°C (d' = 0,28 /100 ml).....	75
Tabela 4.8 - Análise de variância para os dados da Tabela 4.7. Experimento inteiramente casualizado.....	75

Tabela 4.9 - Avaliação da fermentação de amido dos híbridos com morfologia <i>Diastaticus</i> do cruzamento entre <i>S. diastaticus</i> (57-5) e <i>S. baillii</i> (C-4) através de redução de densidade - Valores médios de 4 fermentações de 48 horas com amido	76
Tabela 4.10- Estimativa da estabilidade meiótica dos híbridos entre <i>S. diastaticus</i> (57-5) e <i>S. cerevisiae</i> (C-74) obtidos por fusão de protoplastos, através da frequência de esporulação e dos ascos com 2, 3 e 4 esporos.....	77
Tabela 4.11- Determinação do volume celular de parentais e híbridos de <i>S. cerevisiae</i> obtidos por fusão de protoplastos	79
Tabela 4.12- Caracterização dos setores isolados dos híbridos entre <i>E. fibuligera</i> (CBS 2527) e <i>cerevisiae</i> (55RS-3C/1) quanto à formação de halo em amido, crescimento em meio mínimo e morfologia em meio completo (S) Morf. <i>Saccharomyces</i> , (E) Morf. <i>Endomycopsis</i>	88
Tabela 4.13- Caracterização dos híbridos naturais obtidos dos cruzamentos entre linhagens marcadas de <i>S. diastaticus</i> e <i>S. cerevisiae</i>	92
Tabela 4.14- Avaliação da estabilidade mitótica dos híbridos interespecíficos obtidos por cruzamentos naturais entre <i>S. diastaticus</i> (J132b) e <i>S. cerevisiae</i> (IL108-8-D, IL-198-7A e IL-166-5B)	

através da técnica descrita no item 3.15 e análise estatística dos dados (Testes de χ^2)	94
Tabela 4.15 - Estimativa da estabilidade meiótica para os híbridos obtidos dos cruzamentos natu- rais 1, 2 e 3, sendo consideradas as fre- quências de esporulação e de ascos com 2, 3 e 4 esporos.....	95
Tabela 4.16 - Viabilidade de esporos de ascos completos para híbridos do cruzamentos J132b _{ade} x IL 102-8D	96
Tabela 4.17 - Estimativa da estabilidade meiótica dos híbridos entre F1-A (S.c) e J132b (S.d) através da frequência da esporulação e dos ascos como 2, 3 e 4 esporos.....	98
Tabela 4.18 - Avaliação da produção de etanol a partir de amido liquefeito das linhagens híbri- das entre F-1A (S.c) e J132b (S.d) obtidas por cruzamentos naturais - Valores médios de 4 fermentações consecutivas de 23 h a 30°C em meio de amido 15% com 3 repetições para cada linhagem	99
Tabela 4.19 - Análise de variância dos dados da Tabela 4.18. Experimento inteiramente casualiza- do	100

Tabela 4.20 - Avaliação da produção de etanol a partir de melaço de cana das linhagens híbridas entre F-1A (S.c) e J132b (S.d), obtidas por cruzamentos naturais - Valores médios de 5 fermentações consecutivas de 15 h a 30°C em meio de melaço de cana com 140, de ART, com 3 repetições para cada linhagem	100
Tabela 4.21 - Análise de variância dos dados da tabela 4.20. Experimento inteiramente casuali- zado	100
Tabela 4.22 - Determinação de componentes leves e al- coóis superiores no destilado de fermen- tações em melaço de cana dos híbridos en- tre <i>S. cerevisiae</i> (F1-A) e <i>S. diastati- cus</i> (J132b). Análise cromatográfica em fase gasosa, dados em ppm.....	102
Tabela 4.23 - Determinação do volume celular dos paren- tais e híbridos naturais de <i>S. diastati- cus</i> e <i>S. uvarum</i> com diferentes graus de ploidia	104
Tabela 4.24 - Estimativa da estabilidade meiótica dos híbridos naturais com ploidia variada en- tre linhagens de <i>S. diastaticus</i> (J132b) e <i>S. uvarum</i> através da frequência de es-	

porulação e de ascos com 2, 3 e 4 esporos	106
Tabela 4.25 - Avaliação da produção de etanol a partir de amido liquefeito dos parentais e linhagens híbridas entre <i>S. diastaticus</i> e <i>S. uvarum</i> . Valores médios de 4 fermentações consecutivas de 23 h, a 30°C em meio de amido 15% com 3 repetições para cada linhagem	107
Tabela 4.26 - Análise de variância dos dados da Tabela 4.25. Experimento inteiramente casualizado	107
Tabela 4.27 - Avaliação da produção de etanol a partir de melaço de cana das linhagens híbridas entre <i>S. diastaticus</i> (J132b) e <i>S. uvarum</i> (ATCC 28098), obtidos de cruzamentos naturais - Valores médios de 5 fermentações consecutivas em melaço 22,55% de ART a 35°C por 15 h com 3 repetições....	109
Tabela 4.28 - Análise de variância dos dados da Tabela 4.27. Experimento inteiramente casualizado.....	109

Tabela 4.29 - Avaliação da produção de etanol a partir de melaço de cana das linhagens híbridas entre <i>S. diastaticus</i> (J132b) e <i>S. uvarum</i> (28100 e 28104) - Valores médios de 5 fermentações consecutivas em melaço de cana com 14 ^o de ART a 35 ^o C por 15 h com 3 repetições	110
Tabela 4.30 - Análise de variância dos dados da Tabela 4.29. Experimento inteiramente casualizado	110
Tabela 4.31 - Determinação de componentes leves e alcoóis superiores no destilado de fermentações em melaço de cana dos híbridos naturais entre <i>S. uvarum</i> (28098) e <i>S. diastaticus</i> (J132b) - Análise cromatográfica em fase gasosa, dados em ppm	111
Tabela 4.32 - Determinação dos componentes leves e alcoóis superiores no destilado de fermentações em melaço de cana dos híbridos entre <i>S. uvarum</i> (28100 e 28104) e <i>S. diastaticus</i> (J132b) - Análise cromatográfica em fase gasosa, dados em ppm.....	
Tabela 4.33 - Estimativa da estabilidade meiótica dos produtos do cruzamento entre híbridos (<i>S. diastaticus</i> e <i>S. uvarum</i>) e o paren-	

	tal <i>S. diastaticus</i> e <i>S. uvarum</i>) e o paren-	
	tal <i>S. diastaticus</i> através da frequência	
	de esporulação e de ascos com 2, 3 e 4 es-	
	poros.....	116
Tabela 4.34 -	Avaliação da produção de etanol a partir	
	do melão de cana das linhagens origina-	
	das dos retrocruzamentos entre híbridos	
	(<i>S. diastaticus</i> e <i>S. uvarum</i>) e o parental	
	<i>S. diastaticus</i> (J132b) - Valores médios	
	de 5 fermentações consecutivas em melão	
	de cana com 15% de ART a 35°C por 15 h,	
	com 3 repetições	117
Tabela 4.35 -	Análise de variância dos dados da Tabela	
	4.34. Experimentos inteiramente casuali-	
	zados	117
Tabela 3.36 -	Avaliação da produção de etanol a partir	
	de amido liquefeito das linhagens origi-	
	nadas dos retrocruzamentos entre híbridos	
	(<i>S. diastaticus</i> e <i>S. uvarum</i>) e o paren-	
	tal <i>S. diastaticus</i> (J132b) - Valores mē-	
	dios de 5 fermentações consecutivas em	
	amido liquefeito a 15% a 35°C por 48 ho-	
	ras em 3 repetições	118

Tabela 4.37 - Análise de variância dos dados da Tabela 4.36. Experimento inteiramente casualizado	118
Tabela 4.38 - Determinação de componentes leves e alcoóis superiores no destilado de fermentações em melaço de cana dos retrocruzamentos entre os híbridos e o parental <i>S. diastaticus</i> (J132b) - Análise cromatográfica em fase aquosa, dados em ppm....	119

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 - Células e pseudomicélio de <i>Endomycopsis fibuligera</i> (CBS 2527) após crescimento em meio completo com agitação (1000 x).....	82
Figura 2 - Protoplastos de <i>Endomycopsis fibuligera</i> (CBS 2527) obtidos por tratamento enzimático com helicase (1000 x).....	82
Figura 3 - Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 55R5-3C/1) após crescimento em meio completo líquido com agitação (1000 x).....	83
Figura 4 - Protoplastos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (55R5-3C/1) obtidos por tratamento enzimático com helicase (1000 x).....	83
Figura 5 - Aglutinação de protoplastos de <i>Endomycopsis fibuligera</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> provocada pelo polietilenoglicol (600 x)...	84
Figura 6 - Morfologia das colônias híbridas entre <i>Endomycopsis fibuligera</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com detalhe de uma colônia com setores em meio completo.....	84

Figuras 7 e 8 - Morfologia das 62 colônias híbridas isoladas da fusão de protoplastos entre <i>Endomycopsis fibuligera</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85
Figuras 9 e 10- Formação de halo com coloração de lugol das colônias híbridas das Figuras 7 e 8, respectivamente, após crescimento em meio de amido por 72 horas.....	86
Figura 11 - Células de <i>Saccharomyces diastaticus</i> (J132b _{ade} ⁻) após crescimento em meio completo com agitação (1000 x).....	90
Figura 12 - Protoplastos de <i>Saccharomyces diastaticus</i> (J132b _{ade} ⁻) após crescimento em meio completo com agitação (1000 x).....	90
Figura 13 - Morfologia irregular das colônias híbridas obtidas por cruzamentos naturais entre <i>Saccharomyces diastaticus</i> (J132b) e <i>S. cerevisiae</i> (IL 102-8D) em meio completo.....	93
Figura 14 - Floculação em YEPD após 48 horas de crescimento dos parentais J132b (S.d); ATCC 28098 (S.u); e os híbridos E104 e E120.....	120

Figura 15 - Flocculação em YEPD após 48 horas de crescimento dos parentais J132b (S.d); ATCC 28100 (S.u); e os híbridos E106 e E140.....	120
Figura 16 - Flocculação em YEPD após 48 horas de crescimento dos parentais J132b (S.d); ATCC 28104 (S.u); e os híbridos E107 e E150.....	121

ESTABILIDADE GENÉTICA E HETEROSE EM HÍBRIDOS
INTERESPECÍFICOS DE LEVEDURAS

Autor: Sérgio Echeverrigaray

Orientador: Flávio C. A. Tavares

R E S U M O

O presente trabalho teve como principais objetivos comparar os sistemas seletivos de recuperação de híbridos obtidos por cruzamentos naturais e fusão de protoplastos, avaliar o comportamento fermentativo e a estabilidade genética em híbridos interespecíficos. Ao mesmo tempo, foi também determinada a expressão de diferentes caracteres relativos a assimilação, fermentação e floculação nos diversos híbridos.

A seleção de linhagens híbridas com base em caracteres naturais mostrou-se eficiente, com enriquecimento significativo dos conjugantes o que facilita o isolamento. Esta técnica pode ser de grande aplicação quando são utilizadas linhagens selvagens com ploidia desconhecida ou não é desejada a indução de mutações. Do contrário, a utili

zação de marcadores genéticos permite o isolamento mais preciso sem a desvantagem do crescimento residual.

As micromanipulações e as técnicas de cruzamentos raros tem se mostrado eficientes no isolamento de híbridos entre *S. diastaticus* e *S. cerevisiae*, sendo uma técnica importante na seleção de híbridos interespecíficos entre estas espécies.

Os híbridos obtidos entre *S. diastaticus*, *S. cerevisiae*, *S. uvarum* e *S. bailli* exibiram capacidade de fermentação de amido, a qual foi igual ou inferior a do parental *S. diastaticus* independente da forma de obtenção ou os parentais. Por outro lado, os híbridos exibiram heterose positiva para a fermentação de melaço de cana quando as linhagens parentais foram boas fermentadoras. Esta observação era esperada devido as diferenças genéticas entre as linhagens parentais e podem ser usadas em cruzamentos de leveduras para produção de etanol. Adicionalmente, foram detectadas diferenças nas concentrações de alcoóis superiores e compostos leves entre os híbridos e as linhagens parentais, o que tem interesse no melhoramento ou na caracterização do estado híbrido.

Os híbridos entre *S. diastaticus* e *S. uvarum* mostraram maior floculação do que a linhagem parental flocu

lante (*S. uvarum*), o que pode ser de interesse em estudos bioquímicos e genéticos.

Os híbridos de *S. diastaticus* com *S. cerevisiae* e *S. uvarum* mostraram-se mitoticamente estáveis, no entanto, as frequências de ascos com 2, 3 e 4 esporos denotam instabilidade meiótica. A elevada ploidia das linhagens pode ser a causa desta instabilidade.

Híbridos entre *S. cerevisiae* e *E. fibuligera* produziram colônias setoradas o que é uma indicação da instabilidade mitótica. O efeito da dosagem gênica foi estudado considerando que altas ploidias com genomas de *S. diastaticus* foram obtidas. O efeito na habilidade fermentativa de amido e sacarose foi estudada o que abre a possibilidade de futuras pesquisas na área acadêmica e aplicada.

GENETIC STABILITY AND HETEROSIS IN
INTERESPECIFIC HYBRIDS OF YEASTS

Author: Sérgio Echeverrigaray

Adviser: Flávio C. A. Tavares

S U M M A R Y

This research work had as main objectives to evaluate different selection techniques for hybrid recovering from natural crosses and protoplast fusion, and analyse the fermentation ability and genetic stability of interespecific hybrids. It was also determined the expression of differential characters regarding assimilation and fermentation of various carbon sources as well as flocculence of different hybrids.

The selection of hybrid strains based on natural characters have shown to be efficient with significant enrichment of conjugants with easy recover of hybrids. Such technique is usefull when wild strains of unknown ploidy are used or when mutation is undesired. On the contrary genetic markers permit a precise recover without the disadvantages of residual growth.

The micromanipulation and rare mating techniques have shown to be efficient in the recovery of hybrids between *S. diastaticus*, *S. cerevisiae* and *S. uvarum*, being an important technique in the selection of interspecific hybrids between this species.

The hybrids obtained between *S. diastaticus*, *S. cerevisiae*, *S. uvarum* and *S. baillii* exhibited starch fermentation capability which was equal or lower compared to the parental strain *S. diastaticus* in all the hybrids analysed, independent of the technique of selection or the parental strains. On the other hand, the hybrids exhibited positive heterosis for the fermentation of cane molasses when the parental strains were good fermenters. This finding was suspected as a cause of genetic differences between the parental strains and can be used for yeast breeding for ethanol production. In addition differences were detected for fusel alcohols and light compounds concentrations in the hybrids when compared to parental strains which can be of interest in breeding or to characterize the hybrid state.

The hybrids between *S. diastaticus* and *S. uvarum* have shown stronger flocculation than the flocculent parental strain (*S. uvarum*), which can be of interest for biochemical and genetic studies.

The hybrids of *S. diastaticus* with *S. cerevisiae* and *S. uvarum* have shown mitotic stability, however as shown by the frequency of ascus with 2, 3 and 4 ~ spores they were meiotically unstable. High ploidy of the strains can be the major cause for such instability.

Hybrids between *S. cerevisiae* and *E. fibuligera* have produced sectored colonies which is an indication of mitotic instability. The gene dosage effect was studied considering that high ploidy numbers were obtained with *S. diastaticus* genomes. The effect on the fermentation ability for starch and sucrose was studied which open the possibility for future academic and applied research.

1. INTRODUÇÃO

A obtenção de híbridos é fundamental em estudos genéticos e projetos de melhoramento. Desta forma, além de qualidades existentes em diferentes leveduras poderem ser reunidas numa única linhagem, também são aproveitados os acréscimos devidos a efeitos heteróticos.

A incompatibilidade genética assim como o tipo de reação sexual criam uma barreira na formação natural de híbridos. Uma alternativa eficiente é a utilização das técnicas de fusão de protoplastos, que requer meios para a diferenciação dos conjugantes. Além dos vários problemas de obtenção dos híbridos, ainda nos restam os problemas decorrentes de instabilidade genética causada por perda cromossômica e incompatibilidade citoplasmática, especialmente quando as linhagens parentais pertencem a espécies diferentes. Quanto maior

sejam as diferenças entre as linhagens hibridizadas, correspondendo à distância filogenética, espera-se maior instabilidade dos conjugantes.

Muitas espécies de leveduras descritas até o momento, apresentam características vantajosas que poderiam ter grande importância acadêmica e aplicada. A transferência destas características para leveduras industriais ou leveduras bem conhecidas geneticamente permitiria seu melhor estudo contornando-se eventuais problemas de cruzamento natural, aplicando-se a técnica de fusão de protoplastos. Para qualquer fim é fundamental que os conjugantes apresentem condições de estabilidade.

O presente trabalho tem como propósito a obtenção de híbridos interespecíficos de leveduras obtidas por cruzamentos naturais e por fusão de protoplastos, avaliando-se os ganhos que podem ser obtidos devido à heterose e também determinando-se a estabilidade genética destes híbridos. Para avaliar os efeitos heteróticos, os conjugantes foram ensaiados em condições que permitem determinar sua adequação ao uso industrial.

Adicionalmente, procurou-se estimar o efeito da ploidia na estabilidade e na heterose, assim como, o efeito da dosagem gênica no comportamento fermentativo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A transferência de material genético necessariamente requer a hibridização como etapa inicial do processo. Várias técnicas envolvem cruzamentos naturais ou artificiais, sendo que estes últimos em leveduras podem ser feitos por fusão de protoplastos ou transformação genética por DNA extracelular. Estas técnicas artificiais permitem contornar problemas como incompatibilidade sexual e aqueles causados pela distância filogenética.

Adicionalmente à hibridização em leveduras e outros microrganismos é um fator de grande importância em qualquer projeto de melhoramento. Desta forma, além das qualidades existentes em diferentes linhagens poderem ser reunidas numa única levedura também são aproveitados os acréscimos devidos a efeitos heteróticos. Em leveduras industriais há dificuldades

na hibridização natural devido às suas condições aneuploides ou poliploides, em geral não exibindo reação sexual definida. Nestes casos, a aplicação de fusão de protoplastos tem proporcionado novas opções de melhoramento. Mas, além dos problemas de recuperação dos híbridos, ainda restam os problemas decorrentes de instabilidade genética causada por perdas cromossômicas, especialmente quando as linhagens pertencem a espécies ou gêneros diferentes.

2.1. Hibridização clássica

As leveduras utilizadas industrialmente em geral pertencem às espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *S. uvarum* já que estas apresentam características fermentativas superiores às outras espécies conhecidas.

Estas leveduras possuem sistema sexual bem conhecido química e geneticamente definindo-se dois tipos sexuais (α e a) que se cruzam naturalmente dando origem a híbridos diploides estáveis que podem esporular produzindo ascas com quatro esporos haploides o que tem permitido um amplo desenvolvimento da genética de leveduras, tornando estes organismos de grande relevância na pesquisa genética (MORTIMER e HAWTHORNE, 1969 e 1975; MORTIMER e TAVARES, 1976). Os híbridos resultantes de cruzamentos heterotáticos não exibem reação sexual definida e, portanto, não podem ser cruzados naturalmen

te com linhagens diploides ou haploides.

Porém, tem sido observado que leveduras diploides (a/α) apresentam habilidade rara de cruzamento, o que foi confirmado pelo aparecimento de colônias prototróficas em misturas de linhagens auxotróficas haploides e diploides de *S. cerevisiae* no experimento realizado por POMPER *et alii* (1954). Estas colônias apareceram em frequência menor a 10^{-6} e resultaram ser leveduras triplóides e tetraplóides dependendo do cruzamento. MORTIMER (1958) repetiu este tipo de técnica obtendo linhagens com várias ploidias. O mecanismo pelo qual ocorre este tipo de cruzamento foi discutido por GUNGE e NAKATOMI (1972), os quais através da análise genética dos híbridos obtidos por cruzamentos raros utilizando uma metodologia semelhante à anterior com uma linhagem auxotrófica e outra deficiente respiratória, concluíram que os cruzamentos raros são devidos ao aparecimento de células sexuadas no clone parental heterozigoto para o tipo de reação sexual. Estas células sexuadas surgem da conversão de heterozigose para homozigose dos alelos que determinam o tipo de reação sexual possivelmente devido à recombinação mitótica. Neste trabalho foram obtidas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* poliploides, desde triploides até octaploides, através do cruzamento sucessivo de clones heterozigotos. A dúvida levantada é como leveduras de ploidias tão elevadas podem ser mantidas de forma estável durante a proliferação vegetativa por um longo período de tempo.

Com linhagens industriais a utilização de hibridação natural é prejudicada pelo fato das linhagens serem de ploidia elevada ou desconhecida (SAKAI e TAKAHASHI, 1973; ANDERSON e MARTIN, 1975). A hibridação clássica de leveduras de cervejaria envolve o cruzamento de clones sexuais formados a partir de ascósporos isolados das linhagens industriais (GJERMANESEN e SIGSGAARD, 1981). Esta técnica tem levado a poucos ganhos genéticos e, portanto, tem escasso valor comercial. A aplicação desta metodologia se defronta com dois problemas: 1- as leveduras industriais em geral esporulam muito pouco e a viabilidade de esporos é extremamente reduzida (ANDERSON e MARTIN, 1975); e 2- os esporos correspondem a segregantes das linhagens industriais cuja produção geralmente é inferior ao híbrido. A técnica de cruzamentos raros tem assim permitido maiores avanços no melhoramento. A metodologia descrita por GUNGE e NAKATOMI (1972) foi utilizada com sucesso por SPENCER e SPENCER (1977) na obtenção de híbridos entre linhagens diploides auxotróficas e linhagens industriais deficientes respiratórias. Os clones isolados foram tetraploides ou semelhantes a tetraploides, os quais foram analisados geneticamente e cujos segregantes permitiram hibridização convencional. Os cruzamentos com haploides deram origem a clones com baixa viabilidade de esporos possivelmente semelhantes a triploides.

Uma linhagem auxotrófica de *S. diastaticus* com capacidade de fermentação de dextrina foi cruzada pelo mē-

todo de GUNGE e NAKATOMI (1972) com uma linhagem de cerveja - ria deficiente respiratória por BROWN, SEARLE e TUBB (1980), obtendo híbridos capazes de fermentar dextrina e com fermentação semelhante ao parental industrial, produzindo assim cervejas de baixo teor de carboidratos. Porém, estas linhagens híbridas não são aplicáveis na indústria de bebidas devido ao gosto desagradável que produzem.

Estudos genéticos em *S. diastaticus* têm sido realizados através de cruzamentos com linhagens marcadas de *S. cerevisiae*, originando-se híbridos diploides estáveis, com esporulação elevada e boa viabilidade de esporos (TAMAKI, 1978).

Métodos clássicos de hibridização têm sido também utilizados no melhoramento de linhagens aplicadas na fermentação de vinho por CUMMINGS e FOGEL (1978). Neste foi mostrada a homologia existente entre linhagens industriais e de laboratório, o que permite estabelecer um melhor planejamento de projetos de melhoramento e estudos genéticos. A variabilidade entre as linhagens quanto à esporulação foi elevada, observando-se que duas não esporularam duas esporularam pouco e apresentaram baixa viabilidade destes e duas permitiram a análise de tetrades mostrando serem linhagens diploides homotáticas estáveis. Os cruzamentos com *S. cerevisiae* e *S. uvarum* evidenciaram a grande homologia entre estas espécies. Estes fatos permitem: 1 - a definição e análise genética das

características de linhagens industrialmente importantes; 2 - análise de outros fatores não diretamente relacionadas com a qualidade do produto; e 3 - o desenvolvimento de programas de melhoramento para características de importância industrial.

Recentemente híbridos para fermentação de malte para whisky tem sido obtidos por WATSON (1980). Nesta fermentação geralmente são utilizadas duas linhagens de leveduras primária e secundária. Estas últimas pertencem a *S. cerevisiae* e são obtidas como subproduto das cervejarias. A primeira é uma linhagem de fermentação rápida com capacidade de superatenuação sendo capazes de fermentar maltotriose e dextrinas de baixo peso molecular. Os híbridos destas com *S. diastaticus* foram capazes de fermentar dextrinas melhorando assim o processo e alguns destes podem ser usados sem a necessidade da linhagem secundária.

No Brasil, o desenvolvimento de leveduras com alto rendimento de fermentação de melaço de cana para produção de álcool carburante tem sido realizado por TAVARES (1980, 1981) com sucesso através de metodologia clássica de hibridação, obtendo-se linhagens com tolerância ao etanol e maior capacidade fermentativa em condições de elevada temperatura e concentração de açúcar.

A metodologia clássica tem grande significado

no melhoramento devido à grande variabilidade existente entre linhagens de *S. cerevisiae* e *S. uvarum*, porém, a hibridização por esta técnica limita-se a cruzamentos intraespecíficos e desde que as linhagens apresentem tipo de reação sexual oposta, o que muitas vezes não é possível em linhagens industriais.

A fusão de protoplastos tem surgido como uma opção importante em melhoramento de leveduras interespecíficas e intergenéricas que abrem novas perspectivas de aplicação das leveduras e estudos de genética.

2.2. Protoplastos

2.2.1. Esferoplastização

Em 1922 GIAJA observou a dissolução da parede de leveduras por enzimas do suco digestivo de *Helix pomatia*. Mas só em 1957 EDDY e WILLIANSOON descreveram uma técnica para a obtenção controlada de protoplastos de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) usando estas enzimas líticas. Tentativas anteriores de manutenção dos protoplastos utilizando-se a glicose como estabilizador osmótico foram infrutíferas, já que este carboidrato é metabolizável, e mesmo à temperatura de 4°C ocorre lise celular imediatamente após a perda da parede.

Além da enzima do suco digestivo de *Helix pomatia*, produzidas sob o nome de Helicase (L'Industrie Biologique Française) ou Glusulase (EndoLaboratories, Inc.), outras enzimas produzidas por outros organismos como *Arthrobacter luteus* são também disponíveis sob o nome de Zimoliase (Kirin Brewing Co., Japão) ou Yeast Glucanase (Kochi University, Japão), assim como a Mutanase (Novo ind.) produzida por *Trichoderma harziarum*. Outras enzimas têm surgido em trabalhos isolados com protoplastos de fungos e leveduras mas não são produzidas comercialmente como é o caso das enzimas líticas de *Streptomyces* utilizadas na obtenção de protoplastos de leveduras por SCHWENCKE, GONZALEZ e FARIAS (1969) e muitas outras produzidas por microrganismos como *Rhizopus*, *Flavobacterium*, *Basidiomyces*, *Myriococcum*, *Bacillus*, etc (em KUO e YAMAMOTO, 1975).

Todas as enzimas líticas citadas são basicamente endo- β - (1 $\rightarrow$ 3) glucanases, exo- β (1 $\rightarrow$ 3) glucanases; β (1 $\rightarrow$ 6) glucanase, mananases e proteases (KITAMURA e YAMAMOTO, 1973).

A Zimoliase é uma endo- β (1 $\rightarrow$ 3) glucanase produzida comercialmente em forma cristalizada, cuja ação lítica sobre leveduras de 8 gêneros e 18 espécies foram analisadas por KANEKO *et alii* (1973), incluindo-se que a susceptibilidade das células à ação lítica da enzima de *Arth. luteus* varia em diferentes gêneros e espécies. Por exemplo, *Saccharomyces*

é mais susceptível do que *Candida*, porém, esta última quando tratada com 2-mercaptoetanol torna-se tão susceptível quanto a anterior. Enquanto que *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* não são atacadas pela enzima devido a que suas paredes contêm quitina e não glucanos.

EDDY e WILLIANSO (1957) e MENDEZA e VILLAMEVA (1962) observaram que leveduras em fase exponencial de crescimento apresentam maior susceptibilidade à enzima do suco digestivo de caramujo, do que células em fase estacionária. Porém, KANEKO *et alii* (1973) observaram que este fato não se aplica exatamente aos tratamentos com zimoliase já que em algumas linhagens células em fase estacionária foram mais susceptíveis.

Vários mercaptanos são capazes de aumentar a frequência de esporoplastos, já que quebram as pontes dissulfeto das proteínas da parede facilitando a ação das enzimas líti- cas sobre os glucanos e mananos. Dentre estes os mais utiliza- dos têm sido a cisteína, o 2-mercaptoetanol e o dithiothreitol (KUO e YAMAMOTO, 1975).

Devido à retirada da parede às células de le- vedura tornam-se sensíveis osmoticamente, pelo que é de gran- de importância a utilização de estabilizadores osmóticos ade- quadas. Em leveduras os mais comumente utilizados têm sido ma- nitol, sorbitol ou cloreto de potássio em molaridades que

variam segundo a levedura entre 0,6 e 1,2M. Estas são adicionadas geralmente a tampões de pH 5,8 a 6,8 (KUO e YAMAMOTO, 1975).

A ação da Mutanase também foi avaliada em várias espécies de leveduras por STEPHEN e NASIM (1981) que observaram que a enzima produz alta frequência de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Trichosporon pullulans* e *Schwanniomyces alluvius*.

Já que cada espécie apresenta características próprias e portanto também diferenças em termos de composição de parede, muitos trabalhos sobre a produção de protoplastos em diferentes leveduras tem sido publicados, todas apresentando pequenas variações. As mais importantes das quais são a susceptibilidade das espécies à enzima lítica, o estabilizador osmótico e a utilização ou não de mercaptanos. EDDY e WILLIANSO (1957) descreveram o método para obtenção de protoplastos de *Saccharomyces carlsbergensis* e, em 1959, para *Saccharomyces cerevisiae* DAVIS e ELVIN (1964) para *Saccharomyces fragilis*, HAVELKOVA e MENSKE (1969) para *Lipomyces lipofer*; SVIHLA et alii (1961) e LOBYREVA (1975) para *Candida utilis*, e assim por diante têm sido descritos métodos para obtenção de protoplastos de quase todos os gêneros de leveduras que apresentam interesse industrial ou acadêmico.

A maior parte dos estudos com protopláastos têm sido microscópicos e fisiológicos, tendo estes contribuído significativamente para o conhecimento atual em muitas áreas da fisiologia e bioquímica de microrganismos como os de STREIBLOVA (1968); HAVELKOVA e MENSÍK (1969); BASTIDE *et alii* (1979); EDDY e WILLIANSÓN (1959); SHOCKMAN e LAMPEN (1962); HOUSSET *et alii* (1975) e BASTIDE *et alii* (1979), entre outros.

Uma das áreas na qual a esferoplastização tem desenvolvido papel fundamental, foram os estudos de composição e síntese da parede celular de leveduras. Os protoplastos de todas as espécies de leveduras estudadas até o momento são capazes de sintetizar a parede celular desde que as condições assim o permitam e, portanto, tornam-se novamente células completas capazes de se reproduzirem.

NECAS (1971) em sua revisão ressalta como de grande importância a síntese e regeneração da parede celular de leveduras, principalmente, nos estudos de fusão, já que somente os protoplastos regenerados são capazes de formar clones.

Na maior parte das espécies, em especial aquelas que se dividem por brotamento, é necessária a inclusão dos protoplastos em um suporte físico para que ocorra a completa regeneração da parede, o que tem sido feito por inclusão em

meio com concentrações elevadas de gelatina ou ágar (SVOBODA, 1966). Protoplastos destas mesmas espécies de leveduras quando cultivadas em meio líquido formam uma rede fibrilar de glucanos, mas não conseguem completar a estrutura normal da parede. Nestes casos os protoplastos aumentam de volume já que apresentam síntese protéica normal, mas morrem com o tempo, pois não conseguem refazer a parede e se dividirem. Na superfície do meio sólido a regeneração é geralmente muito baixa, sendo da ordem de 0,1 a 0,01%.

Esferoplastos de *Schizosaccharomyces*, *Nadsonia*, *Endomycopsis* e *Endomyces* são capazes de regenerar a parede celular em meio líquido ao contrário das outras espécies. Dentre todos os estudos com esferoplastos aqueles que têm tido maior repercussão são os de fusão de protoplastos, já que esta técnica abre novas perspectivas de estudos básicos e aplicados em todos os campos.

2.2.2. Fusão

Em 1925 MELLON observou pela primeira vez a fusão de protoplastos em bactérias, o que foi questionado por algum tempo até que SMITH (1944) e trabalhos posteriores comprovaram a veracidade das observações.

A descoberta da fusão espontânea de protoplas-

tos em bactérias foi seguida pelas observações em leveduras feitas por MULLER em 1966 e 1970 em *Saccharomyces* e *Candida*, respectivamente (FERENCZY, 1981).

Em 1974 FERENCZY, KEVEI e ZSOLT observaram a ocorrência de fusão espontânea em *Geotrichum candidum* após incubação a 20°C por 12 horas, porém, a frequência foi extremamente baixa, da ordem de $1,6 \times 10^{-6}$ a 6×10^{-7} complementações por par de protoplastos a pH 5,5 e 7,0, respectivamente.

Porém, somente após a introdução de polietilenoglicol como agente fusogênico por KAO e MICHAYLUKE (1974) que observaram a sua ação em protoplastos de plantas, foi possível o desenvolvimento de estudos e de técnicas de fusão controladas capazes de aumentar a frequência de híbridos a níveis relativamente elevados.

ANNE e PEBERDY em 1975 determinaram as melhores condições para a fusão de protoplastos com polietilenoglicol (PEG) utilizado como fusogênico, comprovando que a presença de ions de cálcio na mistura em concentração de 0,01M aumenta consideravelmente a frequência de fusão em protoplastos de *Penicillium chrysogenum*. Os ions de magnésio também estimulam a fusão porém em menor grau. Ions de sódio e potássio reduzem a fusão e o EDTA a 0,005N inibe-a completamente. Também foi estabelecido que a concentração de PEG deve

ser maior a 20%, sendo 30 a 40% as concentrações que oferecem melhores resultados.

FERENCZY *et alii* (1975 e 1976) confirmaram estas condições para *Aspergillus nidulans* estabelecendo adicionalmente que as melhores condições foram obtidas com 5 a 15 x 10⁶ protoplastos por mililitro e PEG 25% com 10 a 100 mM de CaCl₂.

Fusões intraespecíficas em vários fungos (*P. chrysogenum*, *P. patulum*, *P. roquefortii*, *A. nidulans*, *A. niger* e *Cephalosporium acremonium*) foram realizadas por ANNE e PEBERDY (1976) obtendo-se heterocarios em alta frequência. Também foram isolados híbridos entre *P. chrysogenum* e *P. notatum* provando a possibilidade de hibridização entre espécies diferentes, mesmo tendo-se em consideração que estas são duas espécies muito aparentadas.

Fusões interespecíficas entre *Aspergillus nidulans* e *A. angulosus* foram realizados por KEVEI e PEBERDY (1977). As colônias híbridas foram estáveis por 5 a 7 dias produzindo poucos conídiosporos com morfologia anormal e sendo os conídios analisados todos híbridos. Com o cultivo prolongado de 10 a 14 dias a estabilidade foi diminuindo e começaram a aparecer somente pequenos grupos de conídiosporos normais. A análise dos esporos nestas fase estabelecem a ocorrência de híbridos,

parentais e recombinantes. As evidências indicam que os híbridos são resultantes de fusão nuclear e, portanto, diploides.

Em quase todos os casos estudados de fusão interespecíficos em fungos, têm sido observada elevada instabilidade dos híbridos, em muitos casos, não mais repetindo as características híbridas após a passagem para meio completo ou não seletivo (PEBERDY, 1979).

No momento muitos são os exemplos de fusões intra e interespecíficas em fungos filamentosos, porém os problemas de estabilidade permanecem sem solução, impedindo a aplicação desta técnica em maior escala em projetos de melhoramento, se bem que várias tentativas com relativo sucesso tenham sido realizadas, sempre limitando-se a fungos da mesma espécie ou muito próximos filogeneticamente (FERENCZY, 1981).

A fusão de protoplastos tem tido grande interesse em leveduras já que além da sua aplicação industrial, as leveduras sofrem cariogamia rapidamente e o que é mais importante, suportam aneuploidias e poliploidias sem grandes prejuízos para a estabilidade mitótica.

O primeiro trabalho utilizando protoplastos de leveduras em experimentos controlados de fusão foi comunicado

por AHKONHG *et alii* (1975), no qual protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae*, foram fundidos com eritrócitos de galinha com o auxílio do PEG. Microscopicamente foi observado que em misturas de 1:1 e 1:10 (eritrócitos:protoplastos) houve aparecimento de 0,1% de fusão.

Em 1977 van SOLINGEN e van der PLAAT realizaram fusão entre protoplastos de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com o mesmo tipo de reação sexual e apresentando marcas auxotróficas. Os produtos foram isolados em meio sintético hipertônico que só permite o crescimento dos híbridos com complementação entre as marcas. Esta complementação foi observada em frequência de aproximadamente 10^{-5} . Os híbridos apresentaram reação sexual igual aos parentais. Conjugantes destes com uma linhagem α e posterior esporulação, permitiu estabelecer que realmente, além de fusão, existe em todos os casos cariogamia dando lugar a diplóides estáveis.

No mesmo ano, YAMAMOTO e FUKUI obtiveram dados semelhantes em fusão entre linhagens de *S. cerevisiae*. A diferença do anterior os produtos da fusão foram plaqueados em gelatina 30%, após 24 horas, quando a regeneração já devia ter ocorrido, esta foi dissolvida com gelatinase. Foram então diluídos e plaqueados no meio seletivo, obtendo frequência de hibridização da ordem de $3,0 \times 10^{-7}$. Sendo a condição híbrida confirmada através do conteúdo de DNA.

SVOBODA (1976) já tinha determinado que protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* mesmo possuindo rede fibrilar não exibem aglutinação sexual específica. No entanto, eles são capazes de induzir ativação sexual em células normais de leveduras de reação sexual oposta.

Fusões intraespecíficas têm sido realizadas em leveduras de outros gêneros e espécies, assim, protoplastos de *Schizosaccharomyces pombe* foram fundidos por um método semelhante ao anterior por SIPIŹSKI e FERENCZY (1977) obtendo-se frequência de 0,17% de complementação. Os exames citológicos e de haploidização dos híbridos estabeleceram a sua condição diplóide.

A levedura *Candida tropicalis* não apresenta ciclo sexual e a fusão de protoplastos torna-se uma técnica indispensável no seu estudo genético. FOURNIER *et alii* (1977) induziram com polietileno glicol (PEG) fusão de protoplastos obtidos com helicase, de linhagens de *C. tropicalis* com marcas auxotróficas. Os híbridos foram isolados em meio seletivo por complementação. A regeneração foi realizada em meio líquido hipertônico. A frequência de fusão foi de 3×10^{-5} . Os híbridos obtidos apresentaram grande instabilidade devida possivelmente ao estado heterocariótico destes. Somente 30% das colônias isoladas em meio seletivo repetiram o fenótipo após repicagem. Alguns híbridos uninucleados foram isolados sendo instáveis e

segregando em vários tipos de recombinantes auxotróficos e prototróficos.

Protoplastos preparados de linhagens auxotróficas de *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Hansenula wingii*, foram misturados para obter combinações complementares intraespecíficas (SVOBODA, 1978). As fusões induzidas por polietilenoglicol deram lugar a colonias híbridas em frequência menor a 1%. A análise genética destas estabelecem que são formados sincarions e as marcas genéticas das linhagens parentais são integradas.

FERENCZY e MARAZ (1977) comprovaram a transferência de mitocôndrias durante o processo de fusão, usando linhagens auxotróficas de *Saccharomyces cerevisiae* apresentando marcas mitocondriais de resistência a antibióticos.

Nos aglomerados formados com a adição de polietilenoglicol, além de ocorrerem fusões entre dois protoplastos podem ocorrer fusões múltiplas. ARIMA e TAKANO (1979) estudaram a ocorrência deste fenômeno em protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* fundidos com o auxílio de PEG. Produtos de fusão estáveis foram isolados por complementação de marcas. De 64 isolados derivados da fusão de duas linhagens haploides α , 35 foram diplóides, 13 triplóides e 16 tetraplóides. Em fusão entre 3 linhagens haplóides α , produtos de fusão de três proto-

plastos diferentes foram obtidos em menor frequência ($2,1 \times 10^{-6}$) do que entre dois protoplastos diferentes ($1,2 \times 10^{-5}$ e $1,4 \times 10^{-4}$).

Com a perda da parede, os protoplastos não exibem reação sexual como foi estabelecido por SVOBODA (1976), este dado foi confirmado por MARAZ e FERENCZY (1979), já que as frequências de complementação para fusões entre linhagens do mesmo tipo de reação sexual e entre tipos opostos de reação sexual foi muito semelhante.

Em *Candida albicans*, assim como em *Candida tropicalis* a fusão torna-se uma técnica essencial para o estudo genético já que estas não apresentam ciclo sexual. EVANS, ADENIJI e Mc CLARY (1982) realizaram fusão de protoplastos entre linhagens de *C. albicans* com marcas auxotróficas. A frequência de fusão foi da ordem de $5,7 \times 10^{-4}$. A estabilidade dos 25 híbridos foi avaliada resultando: 3 híbridos com marcas auxotróficas, 6 prototróficos e 16 com proporções variadas de prototróficos entre 0,5% e 21,5%.

A fusão de protoplastos pode ser considerada uma técnica importante no estudo genético de linhagens industriais e linhagens de laboratório, principalmente no estudo do comportamento genético de leveduras poliploides. CHRISTENSEN (1979) estudou através de análise genética os híbridos ob

tidos por fusão de protoplastos entre linhagens haplóides auxotróficas de *S. cerevisiae* com o mesmo tipo de reação sexual. Todos os híbridos obtidos foram capazes de cruzar naturalmente e incapazes de esporular. Produtos de fusão de duas linhagens α foram cruzadas com os produtos de fusão de linhagens a . Dois ciclos de esporulação e análise de tetrades dos "tetraploides" deram distribuição regular de todas as marcas mostrando que os híbridos somáticos eram na verdade diploides, homozigotos para o tipo de reação sexual. A fusão envolvendo marcas citoplasmáticas de resistência a eritromicina e clo-ranfenicol, mostrou que a progênie compreende as quatro combinações possíveis das duas marcas. Aproximadamente 10% da progênie foi recombinante para estas duas marcas, o que é observado em estudos de herança citoplasmática por cruzamentos clássicos (WILKIE, 1975).

Fusões intraespecíficas têm sido realizadas em várias espécies nestes últimos anos além das já apresentadas. *Rhodospiridium toruloides*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii* e *Saccharomycopsis lipolytica* têm sido alvo de estudos por vários autores (FERENCZY, 1981).

Fusões interespecíficas são interessantes já que através desta podem ser obtidas linhagens híbridas capazes de exibir as características vantajosas das duas espécies parentais.

Melhoramentos de linhagens industriais de leveduras de cervejaria por fusão interespecífica de protoplastos foi realizado por RUSSELL e STEWART (1979). Linhagens de cervejaria de *S. uvarum* com ploidia desconhecida foram fundidas com linhagens marcadas de *S. cerevisiae* haploides, resultando híbridos com as características genéticas de ambos parentais. Quando uma linhagem haploide auxotrófica com FL0-1 foi hibridizada com uma linhagem industrial não floculante, obtiveram-se híbridos floculantes com boas características fermentativas. Uma observação importante foi que os híbridos apresentaram boa esporulação, o que permite estudos genéticos das leveduras industriais.

A característica de fermentação de amido presente em linhagens de *S. diastaticus* (ANDREWS e GILLILAND, 1952) devido à produção de amiloglicosidase (SEARLE e TUBB, 1981 e SILLS e STEWART, 1982) é importante em indústrias de cervejaria a fim de obter bebidas com menor teor de carboidratos. SPENCER, LAND e SPENCER (1980) isolaram híbridos entre leveduras industriais de destilarias e cervejarias e uma linhagem haplóide de *S. diastaticus*. Por complementação entre marcas mitocondriais e entre marcas nucleares, foram isolados 8 híbridos do primeiro cruzamento, dos quais somente 4 formaram halo em amido. Em todos os cruzamentos realizados o número de colônias que exibiram formação de halo em amido foi menor ao total.

A alta capacidade de esporulação e viabilidade de esporos, permite estudos genéticos em híbridos interespecíficos obtidos por fusão de protoplastos:

Híbridos interespecíficos de *S. uvarum* e *S. diastaticus* foram obtidos por fusão de protoplastos por PANCHAL, RUSSELL e STEWART (1981). A linhagem de *S. diastaticus* foi capaz de fermentar maltose mesmo não produzindo maltase devido à ação da amiloglucosidase sobre as moléculas do dissacarídeo. A taxa de atenuação dos produtos de fusão foi maior do que o parental *S. diastaticus* é comparável com o da linhagem industrial. A atenuação total foi superior nos híbridos após 72 horas. O híbrido 1400 produziu 8% (w/u) de etanol a partir do mosto com 24,8ºP.

Fusões interespecíficas têm sido realizadas em outros gêneros de leveduras como por exemplo entre linhagens de *Kluymomyces lactis* e *K. fragilis* por WHITTAKER e LEACH, em 1978 (FERENCZY, 1981) que obtiveram híbridos prototróficos os quais apresentaram volume celular maior e conteúdo de DNA elevado. Houve indicações de perda de cromossomos e fusões múltiplas, ao mesmo tempo, foi observada a retenção seletiva do DNA mitocondrial de *K. fragilis* e a perda do de *K. lactis*.

Fusões entre espécies do gênero *Schizosaccharomyces* foram realizadas por SŁPICKI (1979) entre *S. pombe*

e *S. octosporus*, observando que o último é dominante nos produtos de fusão, já que só foram recuperados híbridos prototróficos do tipo *S. octosporus*.

Através de fusões entre as linhagens de *S. pombe* e *S. octosporus* SŁPICKI *et alii* (1982) estabeleceram que estas duas espécies são muito relacionadas, discutindo os resultados em conexão com as características do espectro a baixa temperatura dos citocromos.

Fusões intergenéricas também têm sido desenvolvidas em leveduras, obtendo-se resultados promissores em termos de melhoramentos, já que esta técnica possibilita a formação de novas combinações gênicas vantajosas para os processos industriais, além de permitirem através dos estudos genéticos estabelecer as relações entre leveduras de gêneros diferentes.

PROVOST *et alii* (1977) realizaram a primeira fusão intergenérica de protoplastos entre linhagens auxotróficas de *Candida tropicalis* e *Saccharomycopsis fibuligera*. Os híbridos obtidos em frequência de aproximadamente 10^{-5} , foram testados quanto à assimilação de fontes de carbono que têm diferenças nos parentais, resultando todos os tipos recombinantes e parentais. A produção de proteína unicelular por parte dos híbridos exibem grande variação, sendo que algumas apre-

sentam produtividade maior do que os parentais em amido solúvel. Observações microscópicas encontraram que os híbridos eram uninucleados. A instabilidade foi muito elevada, os autores sugeriram pelos dados obtidos que os híbridos devem, neste caso, ser formados por um genoma e alguns cromossomas do outro.

Fusão entre *Saccharomyces* e *Kluymomyces lactis* a fim de obter linhagens fermentadoras de lactose foi desenvolvida por STEWART (1981). Já que o mecanismo de entrada da maltose é semelhante ao da lactose utilizou-se uma linhagem de *Saccharomyces* capaz de fermentar maltose. Linhagens haploides auxotróficos das duas espécies sofreram fusão. Vários produtos foram obtidos com as características genéticas de ambos os pais. Rapidamente estes híbridos segregaram nas colônias apresentando semelhança aos parentais, perdendo as características híbridas quando cultivadas em meio não seletivo, não sendo possível recuperar após um curto período linhagens exibindo características híbridas.

Schizosaccharomyces pombe é capaz de decompor o ácido málico, pelo que é interessante na viticultura a obtenção de híbridos com linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*. CARRAU, AZEVEDO, SUDBERY e CAMPBELL (1982) obtiveram através de fusão de protoplastos e seleção em meios diferenciais híbridos que se mostraram instáveis, segregando

nas formas parentais, porém exibindo características recombinantes. Assim, formas *Schizosaccharomyces* capazes de crescer em galactose e *Saccharomyces* com habilidade de decompor ácido málico foram identificadas.

Como uma constante nestes e em outros experimentos de fusão interespecíficas e intergenéricas, os híbridos apresentam instabilidade genética em grau variado, o que prejudica a utilização da técnica no melhoramento e estudos genéticos.

Porém, não se têm dados de literatura no sentido de estudar alternativas ou técnicas que evitem o fenômeno ou pelo menos permitam a obtenção de culturas segregantes estáveis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens

Foram utilizadas as linhagens escolhidas segundo as suas características de interesse industrial ou marcas nutricionais que auxiliem a seleção de híbridos as quais são discriminadas na Tabela 3.1., onde são também apresentadas as respectivas características e procedências.

Tabela 3.1 - Linhagens de leveduras utilizadas com as respectivas características e procedências.

Linhagens	Características	Espécies	Procedências
IZ 610	Ferm. de lactose	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Instituto Zimotécnico (ESALQ)
IZ 300	Prod. de proteína	<i>Candida utilis</i>	Instituto Zimotécnico (ESALQ)
57-5	Ferm. de amido	<i>Saccharomyces diastaticus</i>	Lab. Herman Pfaff (Univ. Calif.)
C-4	Resist. osmótica	<i>Saccharomyces baillii</i>	Lab. Herman Pfaff (Univ. Calif.)
C-74	Ferm. de sacarose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lab. Herman Pfaff (Univ. Calif.)
J132b	α Ferm. de amido	<i>Saccharomyces diastaticus</i>	Labatt Brewing Co. (Canadá)
CBS 2527	Ferm. de amido	<i>Endomycopsis fibuligera</i>	C.B.S.
F1-A	Ferm. de sacarose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Departamento de Genética (ESALQ)
IL 187-7A	α his ¹ ρ ⁺ ω ⁺ C ₃₂ ^R E221 ^S	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Yeast Stock Center (USA)
IL 166-5B	α his ¹ trp ¹ ρ ⁺ ω ⁺ C ^S E ^S	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Yeast Stock Center (USA)
IL 102-8D	α his ¹ trp ¹ ρ ⁺ ω ⁺ C ^S E ^R 221	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Yeast Stock Center (USA)
55R5-3C/1	a ura ¹ ρ ⁺ ω ⁺ C ^S E ^S O1R	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Yeast Stock Center (USA)
55R5-3C/221	a ura ¹ ρ ⁺ ω ⁺ C ^S E ^R	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Yeast Stock Center (USA)
ATCC 28098	α bio ⁻ inos ⁻	<i>Saccharomyces uvarum</i>	ATCC
ATCC 28100	α bio ⁻ inos ⁻	<i>Saccharomyces uvarum</i>	ATCC
ATCC 28104	ααα bio ⁻ pant ⁻ met ⁻	<i>Saccharomyces uvarum</i>	ATCC
Z 136-1-13C	a arg 4-2 leu 1-1 ade 1 trp 1-1 gal 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Yeast Stock Center (USA)

ATCC - American Type Culture Collection

CBS - Centralbureau vor Schimmelcultures

Tabela 3.2 - Caracterização das linhagens selvagens de leveduras através dos comportamentos fermentativos, assimilação e outras (MM - Meio mínimo).

FERMENTAÇÃO						ASSIMILAÇÃO						OUTROS		
Gli- cose	Mal- tose	Ami- do	Lac- tose	Galaç- tose	Gli- cose	Mal- tose	Ami- do	Lac- tose	Galaç- tose	Xilo- se	Eta- nol	37°C	Ativi- dade lipo- lítica	Resist. Cresc. ciclo MM
<i>Candida utilis</i> (IZ 300)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>S. diastatius</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
<i>S. baillii</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Endomycopsis fibuligera</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-

Tabela 3.3 - Determinação das deficiências nutricionais, das linhagens selvagens e com marcas auxotróficas.

	MM	MM+T	MM+V	MM+A	his	trp	ura	met	pant	piro	PABA	nic	inos	ribo	tia	bio
IZ 610 (K.F)	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
C-74 (S.C)	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
57-5 (S.D)	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
IZ 300 (C.U)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CBS2527(E.F)	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
IL 187-7A (S.C)	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
IL 102-8D (S.C)	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
IL 166-5B (S.C)	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
55R5-3C/1	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
55R5-3C/221	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Z 136-1-13C	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
C-4 (S.b)	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

his (histidina); trp(triptofano); ura (uracila); net (metionina); pant(pantotenato de cálcio); piro (piridoxina); PABA (ácido para-aurinobenzoico); nic (ácido nicotínico); inos (inositol); ribo (riboflavina); tia (tiamina); e bio (biotina).

MM - Meio mínimo; MM + T - Meio mínimo com aminoácidos, nucleotídeos e vitaminas; MM + V - Meio mínimo com vitaminas; MM + A - Meio mínimo com aminoácidos.

As linhagens selvagens foram tratadas quanto a características de fermentação e assimilação de fontes de carbono, resistência à cicloexamida, crescimento a 37°C, deficiências nutricionais e atividade lipolítica, a fim de obter parâmetros capazes de ser usados na seleção de híbridos por fusão de protoplastos. Estes testes com as linhagens selvagens são apresentados na Tabela 3.2.

As linhagens selvagens que não cresceram em meio mínimo e as linhagens com marcas genéticas foram testadas conjuntamente, para identificação ou comprovação dos requerimentos nutricionais. Os dados correspondentes a esta análise são apresentados na Tabela 3.3.

3.2. Meios Seletivos

Os meios seletivos para a recuperação de híbridos obtidos por fusão de protoplastos foram formulados em função dos requerimentos nutricionais e características de assimilação das linhagens parentais, conforme discriminado a seguir para os diferentes cruzamentos efetuados.

Os meios utilizados para seleção de híbridos entre linhagens selvagens foram:

CRUZAMENTO 1) *Saccharomyces cerevisiae* (C-74) x *S. diastaticus* (57-5)

* meio de regeneração com amido e sem inositol.

CRUZAMENTO 2) *Saccharomyces diastaticus* (57-5) x *S. bailii osmophilus* (C-4)

* meio mínimo de regeneração.

CRUZAMENTO 3) *Candida utilis* (IZ.300) x *Kluyveromyces fragilis* (IZ.610)

* meio mínimo de regeneração com lactose.

CRUZAMENTO 4) *Candida utilis* (IZ.300) x *Saccharomyces diastaticus* (57-5)

* meio mínimo de regeneração com galactose.

CRUZAMENTO 5) *Candida utilis* (IZ.300) x *Saccharomyces cerevisiae* (C-74)

* meio mínimo de regeneração com galactose.

Nas fusões com linhagens marcadas geneticamente, foi utilizado como meio seletivo o meio mínimo de Wickerham definido posteriormente.

3.3. Meios de cultura

Os seguintes meios foram utilizados neste tra-

balho na manutenção de culturas, crescimento, esporulação, seleção de híbridos e caracterização de linhagens.

3.3.1. Meio completo (YEPD)

Extrato de levedura.....	1%
Peptona	2%
Glicose ou Sacarose.....	2%
Ágar.....	2%

O valor de pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 10% ou HCl 1N. Este meio foi usado para manutenção das linhagens em estoque, para crescimento das culturas, para contagens de colônias na determinação do número de células nas culturas líquidas, para conjugação e isolamento de segregantes e zigotos.

3.3.2. Meio mínimo de Wickerham (MM)

Dextrose	1%
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5%
KH_2PO_4	0,1%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05%
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01%
NaCl	0,01%

O valor de pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 10%. Este meio foi usado na determinação de mutantes, isolamento de clones prototróficos, seleção de conjugantes e manutenção de híbridos.

Este meio pode ser suplementado com 1ml/litro de solução de vitaminas de Wickerham, solução de ácidos nucleicos e/ou de aminoácidos.

3.3.3. Meio de assimilação

Yeast Nitrogen Base.....	0,67%
Açúcar	5%
Ágar	2%

O valor de pH foi ajustado para 5,6 com NaOH 10% ou HCl 1N. Este meio foi usado na caracterização de leveduras selvagens.

3.3.4. Meio para determinação de atividade lipolítica

Peptona	1,0%
NaCl	0,5%
CaCl ₂	0,01%
Tween 20 ou 80	1,0%
Ágar	2,0%

O valor de pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 10% ou HCl 1N. A atividade lipolítica foi identificada pela formação de halo esbranquiçado ao redor das colônias pela formação de composto de cálcio.

3.3.5. Meios de fermentação para caracterização de linhagens

Yeast Nitrogen Base	0,67%
Açúcar	2%

Este meio foi colocado em tubos de Durham, a após 7 a 10 dias foi determinada a formação de gás e o crescimento.

3.3.6. Meio de esporulação (Rafinose-Acetato)

Sol. A) Rafinose.....	2,2%
Sol. B) Acetato de potássio.....	30%
Ambas em água destilada.	

1 ml de solução A e 1 ml de solução B foram misturadas e o volume ajustado para 200 ml com água destilada. A este foi acrescentado 4 g de ágar.

3.3.7. Meio para detecção de "petites"

Extrato de levedura	1%
Peptona	2%
Glicerol.....	3%
Etanol.....	3%
Ágar	2%

O valor de pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 10% ou HCl 1N. Este meio foi utilizado na identificação de clones com deficiências respiratórias.

3.3.8. Meio de amido

Extrato de leveduras.....	1%
Peptona	2%
Amido solúvel.....	2%
Ágar	2%

O valor de pH foi ajustado para 5,5 com HCl 1 N. Este meio foi utilizado para a identificação de leveduras produtoras de enzimas amilolíticas e isolamento de clones com esta característica.

3.3.9. Meio mínimo com glicerol (MM glicerol)

Meio mínimo descrito no item 3.3.2 com 3% de

glicerol no lugar da glicose.

Este meio foi utilizado na recuperação de híbridos através do sistema "RD-auxotrofos" descrito por GUNGE e NAKATOMI (1972), entre linhagens deficientes respiratórias e outra auxotrófica.

3.3.10. Meios seletivos de regeneração

Os meios seletivos utilizados na fusão de protoplastos estão enumerados no item 3.2, com exceção do meio mínimo usado na recuperação de híbridos entre linhagens marcadas.

Todos os meios são preparados de acordo com o meio mínimo descrito no item 3.3.2, no qual a glicose é substituída por amido, lactose ou galactose nos meios especificados.

A estabilidade osmótica do meio é dada pela adição de 1,0 M de Sorbitol ou 1,2 M de KCl no caso da fusão entre *S. cerevisiae* e *Endomycopsis fibuligera*.

3.3.11. Meio completo de regeneração

O meio completo de regeneração foi utilizado na

determinação da frequência de reversão e frequência de fusão.

Este meio é composto de:

Extrato de levedura	1%
Peptona	1%
Ágar	2%
Glicose	2%

e Sorbitol 1,0 M ou KCl 1,2 M dependendo da fusão.

3.3.12. Meio de cobertura (OSA)

Este meio foi usado como suporte físico para a regeneração da parede dos protoplastos. Foi preparado com Sorbitol 1,0M ou KCl 1,2M e ágar 2%.

3.3.13. Meio de multiplicação

Na multiplicação de leveduras para produção de inóculo dos testes de fermentação, foi utilizado melaço de cana a 2% com 10 ml de solução de sais por litro. O pH deste meio foi ajustado para 6,8 com NaOH 10% ou HCl 1N.

3.3.14. Meio de melaço de cana para fermentação

O meio de fermentação foi composto por melaço de cana 15 a 20% ART em água destilada com 10 ml por litro

de solução de sais, e o pH ajustado para 4,0 com HCl 1N ou ácido sulfúrico concentrado.

3.3.15. Meio de amido para fermentação

A solução de amido liquefeito descrito no item 3.4.17 foi diluída 1:1 com água destilada e a esta foram acrescentados 10 ml de solução de sais por litro (item 3.4.11) e 1 ml de solução de vitaminas (item 3.4.6). O valor do pH do meio foi ajustado para 4,0 com HCl 1N.

3.4. Soluções e tampões

3.4.1. Solução salina

Solução de Cloreto de Sódio 0,89% em água destilada, sendo a seguir distribuída em frascos com 9 ml.

3.4.2. Solução de Cloreto de Cálcio 1,2M

CaCl₂ 6,6528 g
 Água destilada 50 ml (vol.final).

3.4.3. Solução fusogênica (PEG 40%)

Polietilenoglicol 4.000..... 2 g
 CaCl₂ 5,5 mg
 em Tampão sorbitol-fosfato (TSP) (5ml total).

3.4.4. Solução de EDTA 10 mM

EDTA.Na₂ - Etileno tiamina tetra acetato de
sódio.

EDTA.Na₂ 3,7225 g
Água 1000 ml.

3.4.5. Tampão sorbitol-fosfato (TSP)

Solução A-0,2M Na₂HPO₄..... 217,5 ml
Solução B-0,2M NaH₂PO₄..... .. 32,5 ml
Sorbitol..... 1M ou 1,2M

A molaridade variável depende das linhagens também sendo usado 1,2M KCl para o caso particular de *E. fibuligera* (TKP).
O volume é então completado para 500 ml com água destilada.

Solução A) - 0,2 M Na₂HPO₄
28,39 g de Na₂HPO₄ em 1 litro de
água
Solução B) - 0,2 M NaH₂PO₄
5,52 g de NaH₂PO₄ em 200 ml de
água

3.4.6. Solução de vitaminas (Wickerhan)

Ácido fólico..... 0,2 mg

Biotina	0,2 mg
Pantotenato de cálcio	40 mg
Inositol	200 mg
Nicotinamida	40 mg
PABA	20 mg
Piridoxina	40 mg
Tiamina	40 mg
Riboflavina	20 mg
Água destilada	100 mg

Soluções de cada vitamina isoladamente na mesma concentração acima especificada foram utilizadas nos casos necessários.

3.4.7. Solução de caseína hidrolisada

Dissolveu-se 1 g de caseína hidrolisada em 100 ml de água destilada.

3.4.8. Soluções de aminoácidos

Soluções de cada um dos seguintes aminoácidos foram preparadas para o uso na caracterização de deficiências nutricionais, na suplementação do meio mínimo.

Prolina, arginina, lisina, triptofano, metionina, histidina, isoleucina, glutamina e homoserina (10 µg/ml);

treonina (20 $\mu\text{g/ml}$) e cistina (50 $\mu\text{g/ml}$) no meio de cultura foram as concentrações usadas.

3.4.9. Solução de ácidos nucleicos de leveduras

Dissolveram-se 2 g de ácido nucleicos de leveduras em 15 ml de HCl 1N e 2 g em 15 ml de NaOH 1N. As duas soluções foram colocadas em banho-maria por 20 minutos e misturadas em seguida, acertando-se o pH para 6,0. O volume foi então completado para 40 ml.

3.4.10. Solução de extrato de leveduras

Dissolveu-se 1 g de extrato de leveduras em 100 ml de água.

3.4.11. Soluções de pirimidinas e purinas

Soluções adenina, uracila, guanina, citosina e timina para atingir 20 $\mu\text{g/ml}$ final no meio de cultura foram preparadas em solução aquosa e esterilizadas em banho-maria por 20 minutos.

3.4.12. Solução de nistatina

1 mg de nistatina foi dissolvida em 1 ml de etanol 95%. 1 ml desta solução foi diluída em 10 ml de salina, sendo a concentração final de 100 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.13. Solução de Iugol

Iodeto de potássio	2g
Iodo resublimado	1g
Água destilada	300 ml

3.3.14. Solução de sais para fermentações

Sulfato de amônio	5%
Fosfato monobásico de potássio...	2%
Sulfato de magnésio	1%
Sulfato de zinco	0,1%
Sulfato de manganês	0,1%

Estes compostos são dissolvidos em água e a solução esterilizada por autoclavagem.

3.3.15. Reativo de Somogyi

28 g de Na_2HPO_4 ; 40 g de tartarato duplo de sódio e potássio ($\text{KNa C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e dissolveu-se em 700 ml de água destilada. Adicionaram-se 100 ml de NaOH 1N. Em seguida gotejaram-se 80 ml de sulfato de cobre a 10% sob agitação constante. Acrescentaram-se 180 g de Na_2SO_4 e completou-se o volume para 1 litro. Foi deixado em repouso e posteriormente filtrado e conservado em recipiente escuro à temperatura ambiente.

3.4.16. Reativo de Nelson

25 g de molibdato de amônio foram dissolvidos em 450 ml de água destilada. Cuidadosamente foram adicionados 26 ml de ácido sulfúrico gota a gota com agitação constante. Foram acrescentados 3 g de arseniato de sódio dissolvidos em 25 ml de água. O reativo é mantido a 35°C no escuro por 48 horas.

3.4.17. Solução de amido dextrinizado

Foram suspendidas 195 g de amido em 213 g de água destilada, e o valor de pH ajustado para 6,4 com NaOH 0,1N. A esta suspensão foram adicionadas 0,24 g de alfa-amilase (GETEC).

Foram colocadas 210 g de água destilada em balão de 3 bocas e aquecida até 92-96°C. A esta foram adicionados 6 ml por minuto da suspensão de amido, mantendo agitação constante e observando-se a manutenção da temperatura.

A comprovação da dextrinização do amido pela enzima é feita pelo teste de iodo:

Após 15 minutos o término do procedimento anterior, 1 ml da solução do balão foi colocada num tubo de ensaio com 9 ml de água destilada e em seguida foram adicionadas 3 gotas de iodo 0,1N. A coloração avermelhada confirma a hidrólise.

3.5. Esterilização e incubação

Os meios sólidos foram esterilizados por autoclavagem por 15 minutos a 1 atm de pressão.

Os meios líquidos e tampões foram esterilizados em autoclave a meia atm por 30 minutos.

As soluções de vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos e antibióticos foram esterilizados em banho-maria por 30 minutos e mantidas em refrigerador.

A temperatura de incubação foi de 30°C para o crescimento das linhagens; 37°C para teste de crescimento a esta temperatura e 35°C nos ensaios de fermentação. As estufas usadas foram B.O.D. (Fanem).

3.6. Caracterização das linhagens selvagens

A caracterização das linhagens selvagens foi feita pelo método descrito por Lodder (1971) com algumas modificações.

As linhagens foram crescidas em YEPD sólido a 30°C por 48 horas na forma de estrias. Foram então transferidas por réplica (LEDERBERG e LEDERBERG, 1952) para os vários

meios seletivos discriminados na Tabela 3.2. e cuja composição foi descrita anteriormente. Foram incubadas 3 repetições de cada tratamento por 48 a 72 horas. Placas de YEPD foram também incubadas a 37°C para verificação do crescimento a esta temperatura.

As características de fermentação foram avaliadas em tubos de ensaio com 10 ml de meios de fermentação e contendo tubos de Durham. Estes foram inoculados com uma alçada das linhagens crescidas em YEPD por 48 horas. Os tubos foram então incubados a 30°C por 5 a 7 dias, e observada a formação de gás e crescimento.

3.7. Determinação das deficiências nutricionais

As linhagens selvagens que exibiram deficiências nutricionais e as linhagens com marcadores genéticos foram testadas, a fim de determinar quais as características das deficiências.

As leveduras foram crescidas em YEPD em estrias por 48 horas a 30°C. Transferidas por réplica para MM e incubadas por 6 horas. Só então foi feita réplica destas últimas para meios contendo aminoácidos, vitaminas ou ácidos nucleicos.

Após este primeiro teste, as linhagens foram crescidas novamente em YEPD, transferidas para MM e posteriormente para meios com os vários aminoácidos, nucleotídeos ou vitaminas, dependendo dos dados obtidos anteriormente.

Em ambos os casos as placas foram incubadas a 30°C por 72 a 96 horas.

3.8. Indução e enriquecimento de mutantes auxotróficos

A técnica de isolamento de mutantes auxotróficos, usando a luz ultravioleta (2537 Å) como mutagênico e a nistatina como agente selecionador consistiu em se fazer uma suspensão de células de *Saccharomyces diastaticus* (J132b) a partir de uma cultura em YEPD com 12 horas, em salina (5 ml), com 1×10^8 células por mililitro.

A suspensão foi colocada em placa de petri e irradiada com luz ultravioleta a 15 centímetros de distância por um tempo correspondente a 5% de sobrevivência (60 segundos).

As células foram então colocadas em 20 ml de meio completo líquido a 30°C por 12 horas, centrifugadas e lavadas.

Um mililitro da suspensão foi adicionado a 9 ml de MM sem nitrogênio e incubadas por 5 horas. Adicionou-se 0,1 ml de solução de nistatina (100 µg/ml) e incubou-se por 90 minutos.

Foram semeadas em meio completo e incubadas a 30°C por 48 horas e posteriormente foi feita réplica para meio mínimo, a fim de confirmar a obtenção de auxotróficos.

Estes foram então testados pelo método descrito no item anterior. A metodologia descrita corresponde à proposta por SNOW (1966) com algumas modificações.

3.9. Método para obtenção de conjugantes

As linhagens a serem cruzadas de reação sexual diferente foram cultivadas em YEPD por 24 horas a 30°C em estrias.

Uma pequena quantidade de células das duas linhagens foi misturada e espalhada sobre o meio YEPD, de tal forma, que uma pequena película de células seja formada. A placa foi então incubada por 4 horas a 30°C.

3.9.1. Micromanipulação

Uma estria com número reduzido de células foi

feita sobre placa de YEPD e esta colocada sob o microscópio ao qual já foi adaptado um micromanipulador com agulha de vidro. Os zigotos identificados pela sua morfologia peculiar foram isolados e colocados a uma certa distância na mesma placa.

3.9.2. Isolamento massivo

No caso de linhagens com marcas auxotróficas complementares foi feito plaqueamento em meio mínimo ou réplica para este mesmo meio a partir da placa na qual foi feita a mistura, no caso de serem esperadas frequências muito baixas de hibridização.

No caso de cruzamentos entre linhagem com marcas e outra deficiente respiratória, o método usado foi a réplica a partir da placa de mistura para meio mínimo com glicerol, isto porque, as linhagens "petites" apresentavam ploidias elevadas e não exibiram reação sexual definida, esperando-se, portanto, frequência muito baixa de zigotos. Este método corresponde a modificação do apresentado por GUNGE e NAKATOMI (1972).

3.10. Indução e seleção de mutantes "petites" mitocondriais

As linhagens foram crescidas em YEPD por 24 horas a 30°C. Com estas células foram inoculados 5 ml de meio

sintético (0,67% Yeast Nitrogen Base com 2% de glicose) contendo 10 µg de brometo de etídio (1×10^7 cels/ml), e incubadas a 30°C no escuro com agitação por 24 horas.

Foram então feitas as diluições correspondentes ($=10^{-4}$) e plaqueadas em YPDG (Extrato de levedura, 1%, peptona 2%, dextrose 0,1%, glicerol 3% e 2% de ágar). Após incubação por 3 dias a 30°C as placas foram observadas e as colônias menores foram transferidas para YEPD.

A confirmação da característica de deficiência respiratória foi feita mediante réplica em YPGE, meio no qual as colônias pequenas não crescem.

3.11. Contagem do número total e dos tipos de ascos

A contagem de ascos permite a estimativa da estabilidade meiótica já que somente os ascos com 4 esporos correspondem a meioses normais.

Placas de meio de esporulação foram inoculadas por réplica a partir de placas de YEPD com estrias das linhagens a serem testadas crescidas por 24 horas. Estas foram incubadas a 30°C por 2 a 3 dias período suficiente para ocorrer esporulação.

Foram feitas lâminas das linhagens e observadas ao microscópio, onde foram contados os números de ascos com 2, 3 e 4 esporos. Na consideração do número total de células analisadas para estimar a frequência de esporulação, os ascos foram considerados como sendo uma célula, já que derivam somente de uma.

As contagens foram feitas em Microscópio WILD M 20 (Heerburg), com ocular para contagem e 600 aumentos. Foram contados o número de campos suficientes para termos no total aproximadamente 1000 células analisadas.

3.12. Isolamento de segregantes

As linhagens foram crescidas a 30°C por 24 horas em YEPD sólido na forma de estrias e replicadas após este tempo para placas de meio de esporulação rafinose-acetato. Estas foram incubadas a 30°C por 2 a 3 dias.

Uma gota de glusulase de acordo com JOHNSTON e MORTIMER (1959) (150-200 mg/ml) foi colocada sobre Parafilm e uma alçada de células da placa de esporulação foi misturada cuidadosamente. Após 40 minutos a temperatura ambiente foi feita uma estria em placa de YEPD de tal sorte que as células na estria permaneceram separadas.

Esta placa foi colocada invertida sob o microscópio com o micromanipular e os esporos de ascos completos (4 esporos) foram transferidos com o auxílio de agulha para posições determinadas na placa.

O isolamento por micromanipulação foi feito em microscópio Olympus adaptado para esta técnica.

3.13. Esferoplastização e fusão de protoplastos

A esferoplastização e posterior fusão de protoplastos foi feita seguindo o seguinte protocolo:

As linhagens foram cultivadas em 100 ml de UEPD líquido até o fim da fase exponencial de crescimento ($1-5 \times 10^7$ cels/ml em 0,4 a 0,8 de D.O. a 610 nm).

As células foram coletadas por centrifugação a 5000 RPM e lavadas duas vezes em EDTA 10 mM. A densidade de células foi ajustada para 1×10^8 /ml (4 a 5 ml).

Obs: 0,1 ml desta suspensão foi plaqueada em meio seletivo e 0,1 ml de uma diluição 10^{-5} foi plaqueada em YEPD, ambos tratamentos com 3 repetições; a fim de determinar a frequência de reversão ou o aparecimento de crescimento residual.

A suspensão de células foi adicionado 2-mercaptoetanol até 1% e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram então coletadas por centrifugação a 2000 RPM (5 min), lavadas 2 vezes com o tampão estabilizador apropriado (TSP ou TKP) e finalmente resuspendidas em 3 ml do tampão. A esta suspensão foi adicionado 1 ml de solução de Helicase 4%, sendo a concentração final 1%.

Obs: Neste ponto também foram tratadas *Zimolia* se 60.000 em concentração de 250 μ m/ml concentração final, e suco digestivo de *Megalobolinus paranaguensis* a 1% concentração final, sendo que ambos foram eficientes na produção de esferoplastos.

A suspensão foi incubada a 39°C e observada microscopicamente em tempos periódicos a partir de 1 hora até obter 95 a 100% de esferoplastos.

Os esferoplastos foram recuperados por centrifugação a 1.000 rpm e lavados 3 vezes em tampão estabilizador (TSP ou TKP) e resuspendidos em 4 ml do tampão e 1 ml de CaCl_2 1,2M. Quantidades iguais de protoplastos das linhagens foram misturadas e centrifugadas a 1.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e os protoplastos resuspendidos no resto de tampão. A esta mistura foi adicionada 1 ml de PEG 40%.

Após incubação a 30°C, foram feitas as diluições apropriadas 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} e plaqueados 0,1 ml em meio seletivo de regeneração colocando por cima meio de cobertura (OSA). Para estimar a frequência de fusão também foram plaqueadas 3 repetições em YEPD de regeneração (10^{-5}). As placas foram incubadas por 5 dias a 30°C.

3.14. Isolamento de híbridos e testes adicionais em placas

As colônias crescidas no meio seletivo foram consideradas como híbridas, e a fim de confirmar esta condição e estudar outras características, as colônias foram transferidas para placas de YEPD e de meio seletivo. Estas foram incubadas a 30°C por 4 a 5 dias. Aquelas colônias que mantiveram a característica híbrida e, portanto, cresceram no meio seletivo foram transferidas por réplica para outros meios dependendo do cruzamento, os quais serão especificados nos resultados, para cada caso.

3.15. Avaliação da estabilidade mitótica

As colônias híbridas foram inoculadas em meio YEPD e meio seletivo líquidos e crescidas por 48 horas. Foram então lavadas as células com solução salina e feitas as diluições até 10^3 células/ml e 0,1 ml destas diluições foram plaqueadas em YEPD e meio seletivo. As placas foram incubadas a 30°C por 3 dias e o número de colônias em cada caso contadas. Desta forma, foi avaliado o n° de colônias deficientes.

tes que surgem decorrentes da instabilidade mitótica durante o crescimento em meio não seletivo e meio seletivo.

Foram feitos testes estatísticos de χ^2 de contingência e homogeneidade a fim de comprovar a significância ou não dos desvios entre os dados.

3.16. Avaliação da capacidade fermentativa das linhagens

A heterose dos híbridos obtidos foi determinada através de comparação das características de produção de etanol e outros compostos a partir de melaço de cana e amido liquefeito.

3.16.1. Preparo do inóculo

As linhagens foram crescidas em 10 ml de YEPD líquido a 30°C por 24 horas. Estes tubos foram usados para inocular erlenmeyers de 2000 ml contendo meio de crescimento de melaço de cana 2%. Estes foram colocados em banho - maria a 30°C com aeração constante durante 24 horas, após este tempo foram adicionados 50 ml de melaço de cana 30% com solução de sais. Este procedimento foi repetido tantas vezes quando necessário para se obter a quantidade de células a serem utilizadas como inóculo na fermentação. As células obtidas foram coletadas por centrifugação a 2000 rpm em tubos de cen-

trífuga de 100 ml.

3.16.2. Fermentações

Foram realizadas fermentações em melaço de cana 15% ART e em amido liquefeito 15%, a fim de estimar a heterose dos híbridos.

As fermentações foram realizadas em tubos de ensaio de 100 ml com: 10% de inóculo (4 g de peso fresco) e 36 ml de meio de fermentação de melaço ou amido.

As fermentações com melaço foram de 15 horas a 35°C. O vinho foi então separado por centrifugação a 2000 rpm e transferido para frascos limpos.

No caso de fermentações com amido, foram incubados por 23 horas a 35°C, as coletas foram feitas por centrifugação e as células foram imediatamente ressuspensas em 36 ml de meio de amido liquefeito para a fermentação seguinte.

3.16.3. Destilação do vinho

Foi feita destilação fracionada com arrastre por vapor, de 25 ml do vinho em Destilador Kjeldhal adaptado, e foram coletados 50 ml de amostra. Este destilado contém,

portanto, a quantidade de etanol da amostra diluída 1:1 com água, o que deve ser tido em conta no cálculo da concentração de álcool.

3.16.4. Determinação do teor alcoólico do destilado

O teor alcoólico do destilado foi determinado em densímetro AP PAAR DMA 46. Os valores de densidade foram transformados para concentração de etanol através da tabela já preparada com este propósito.

3.16.5. Análise dos componentes leves e alcoóis superiores do destilado

O conteúdo de outros componentes do destilado foi determinado através de cromatografia gasosa em Cromatógrafo a gás GC. Modelo 97-D com sistema de ionização de chama. As características da cromatografia são apresentadas a seguir:

Coluna PAC 26-26 com 2,8 m de comprimento e 3 mm de diâmetro interno.

Vazão N_2 - 68,57 ml/min.

Vazão H_2 - 60,00 ml/min

Vazão O_2 - 300,00 ml/min

Temperatura da Coluna - 92°C

Temperatura do detector - 174°C

Temperatura do vaporizador - 130°C

Atenuação 100×4

Gás de arrastre - Nitrogênio.

O cálculo da concentração dos componentes foi feita por Integrador Processador Modelo CG-100.

Através deste método foram determinadas as concentrações de: acetaldeído, acetona, acetato de etila, n-propanol, iso-butanol e álcool iso-amílico.

3.16.6. Determinação do açúcar redutor total do mosto

Foram pipetadas 5 ml do mosto e transferidos para balão volumétrico de 250 ml e o volume completado com água destilado. Após agitação adicionaram-se 0,2 g de oxalato de sódio e a mistura foi agitada novamente. A esta acrescentaram-se 0,5 a 1,0 g de Celite ou Kieselgur. Após agitação por 3 minutos a mistura foi filtrada em papel de filtro desprezando-se os primeiros 20-25 ml.

Foram transferidos 5 ml do filtrado para balão volumétrico de 200 ml, e adicionados 10 ml de HCl 0,75N gota a gota com agitação constante. Foi então colocado em banho a 60°C por 30 minutos. A mistura foi esfriada até a temperatura ambiente e adicionados 10 ml de NaOH 0,75N. O volume foi completado com água destilada.

Tubos de ensaio foram numerados de 1 a 6 e em cada tubo foi adicionado.

Tubos 1 e 2: 1 ml de água destilada (Branco).

Tubos 3 e 4: 1 ml de padrão de açúcar invertido

Tubos 5 e 6: 1 ml da solução obtida pelo processo anterior.

A cada tubo foi adicionado 1 ml de Reativo de Somogyi e estes aquecidos durante 15 minutos em água fervente. Após esfriamento adicionaram-se a cada tubo 1 ml de Reativo de Nelson e 7 ml de água destilada. Os tubos foram agitados e mantidos à temperatura ambiente antes de ser feita a leitura em colorímetro Klett-Summerson com filtro nº 54 (verde - 535 nm).

O cálculo do ART% foi feito da seguinte forma:

$$\% \text{ ART} = 10 \cdot \frac{(\text{Absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco})}{(\text{Absorbância do padrão} - \text{absorbância do branco})}$$

O valor obtido é dado em gramas de açúcar redutor em 100 ml do mosto.

3.17. Cálculo da heterose

A heterose dos híbridos foi calculada em rela-

ção à média das três repetições da linhagem parental com maior produção.

O cálculo foi feito segundo a fórmula:

$$h(\%) = 100 - \frac{\text{Híbrido}}{\text{P Superior}} \times 100$$

3.18. Determinação do volume celular

Células das linhagens a serem testadas foram crescidas por 48 horas a 30°C em YEPD líquido e então colocadas em lâmina tendo o seu comprimento maior (b) e menor (a) medido com o auxílio de ocular micrométrica Eleitz Wetzlar. Cada unidade da lente corresponde a 0,54 µm, valor calculado comparando-se a escala com a de uma lâmina micrométrica (usando-se objetiva de 100 x).

O cálculo do volume foi feito pela fórmula:

$$\text{vol. celular} = \frac{4}{3} \pi a^2 b$$

3.19. Análises de variância

Os ensaios de produção de etanol, foram analisados conforme o procedimento para Blocos ao Acaso e Inteiramente Casualizados com três repetições. O procedimento geral seguiu os esquemas propostos por PIMENTEL GOMES (1963).

3.20. Comparação das médias com o controle (Teste de Dunnett)

O objetivo do teste é localizar tratamentos (linhagens) diferentes ou melhores do que o parental com maior produção. O procedimento seguiu o esquema proposto por R.G.D. Steel e J.H. Torrie (1960). Sendo d' obtido pela fórmula:

$$d' = t \sqrt{2 (QM_{res})/n^{\circ} \text{ rept.}}$$

t = foi obtido da tabela de Dunnett para comparações bilaterais.

Mesmo quando detectadas diferenças significativas entre fermentações foi feita a comparação entre médias de produção de cada levedura para efeito de seleção.

4. RESULTADOS

Os resultados são apresentados de acordo com a ordem de obtenção, que corresponde à formação e recuperação de híbridos obtidos por fusão de protoplastos entre linhagens industriais sem marcadores genéticos e linhagens de laboratório marcadas, e análise de híbridos obtidos por cruzamentos interespecíficos naturais. Em todos os casos é feita a avaliação da heterose e da estabilidade genética.

4.1. Fusão de protoplastos com seleção de conjugantes baseada em caracteres naturais

Conforme descrito no item 3.2. foram efetuados vários cruzamentos entre linhagens de leveduras selvagens de interesse industrial através da técnica de fusão de protoplastos. Nestas fusões foram determinados o número de híbridos e

sua frequência, avaliado o seu potencial fermentativo em tipos diferentes de açúcares e também a sua estabilidade genética mitótica e meiótica, como descrito a seguir:

No cruzamento 1 entre *Saccharomyces cerevisiae* (C-74) e *Saccharomyces diastaticus* (57-5) foram isoladas 1.000 colônias em meio mínimo com amido como única fonte de carbono, as quais foram novamente testadas em meio de amido para observação de produção de halo com lugol, e em meio mínimo com vitaminas e sem inositol. Os resultados relativos a estes testes foram considerados desnecessários de apresentação individual pelo que sumarizamos estes resultados a seguir:

Nº de colônias	MM	MM-inos	Amido
608	-	-	+
357	-	+	-
35	-	+	+

Dentre estas foram selecionadas 35 colônias que mantiveram as duas características, o que representa 3,5% das colônias isoladas inicialmente consideradas como híbridos. Este valor muito baixo denota a inconsistência deste sistema seletivo.

Apesar destes inconvenientes 23 colônias foram confirmadas como híbridos apresentando formação de halo em

amido e crescimento em meio sem inositol cujas características de estabilidade e heterose serão vista posteriormente.

No cruzamento 2 entre *Saccharomyces diastaticus* (57-5) e *Saccharomyces baillii* vr. *osmophilus* (C-4) foram isoladas em meio mínimo 64 colonias, selecionadas contra os tipos parentais. *Saccharomyces diastaticus* apresenta deficiência para pantotenato de cálcio e inositol, e o outro tipo parental é deficiente para tiamina. Estas características permitem crescimento residual, mas pelo tamanho das colonias foram isolados os possíveis híbridos, que foram em seguida testados em amido para a formação de halo, em meio mínimo, meio mínimo com vitaminas e sem inositol, em manitol, em glicerol e em melezitose (Tabela 4.1).

Somente 7 colonias apresentaram morfologia semelhante a *S. diastaticus* e o seu comportamento nos diferentes meios seletivos testados as coloca em 2 grupos: DBI-11, DBI-31, DBI-32 e DBII-4 não cresceram em meio mínimo e em meio com melezitose, enquanto DBI-14, DBI-27 e DBII-5 apresentaram coloração mais clara, cresceram em meio mínimo e em melezitose. Para confirmar os dados obtidos quanto ao comportamento destas colonias, efetuou-se um teste em meio líquido com amido e sem inositol cujos resultados são apresentados na Tabela 4.2. Nesta tabela podem ser observados os diferentes níveis de crescimento dos isolados assim como o aparecimento

Tabela 4.1 - Caracterização dos isolados do cruzamento 2 por fusão de protoplastos, entre *Saccharomyces diastaticus* (57-5) e *S. baillii* (C-4) quanto ao crescimento em placas

Linhagem	MM	MM-inos	Amido	Manitol	Glicerol	Mele- zitose	Morfo- fia
DBI-1	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-2	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-3	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-4	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-5	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-6	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-7	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-8	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-9	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-10	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-11	-	+	++	+/-	+	-	D
DBI-12	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-13	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-14	+	+	++	+/-	+/-	+	D
DBI-15	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-16	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-17	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-18	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-19	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-20	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-21	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-22	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-23	-	+	+/-	+	++	+	B
DBI-24	-	+	+/-	+	++	+	B
DBI-25	-	+	+/-	+	++	+	B
DBI-26	-	+	+/-	+	++	+	B
DBI-27	+	+	+/-	+	+/-	+	B
DBI-28	-	+	+/-	+	+	+	B

(cont.)

(cont.)

Linagem	MM	MM-inos	Amido	Manitol	Glicerol	Mele- zitose	Morfo- logia
DBI-29	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-30	-	+	+/-	++	+	+	B
DBI-31	-	+	++	++	+	-	D
DBI-32	-	+	++	++	+	-	D
DBII-1	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-2	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-3	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-4	-	+	++	++	+	-	D
DBII-5	+	+	++	++	+	+	D
DBII-6	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-7	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-8	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-9	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-10	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-11	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-12	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-13	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-14	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-15	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-16	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-17	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-18	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-19	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-20	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-21	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-22	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-23	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-24	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-25	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-26	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-27	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-28	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-29	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-30	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-31	-	+	+/-	++	+	+	B
DBII-32	-	+	+/-	++	+	+	B

(-) crescimento; (+/-) crescimento escasso; (+) crescimento médio; (++) crescimento bom

Tabela 4.2 - Crescimento e floculação em meio de amido 2% sem inusitol dos híbridos com morfologia *Diastaticus* do cruzamento 2 entre *S. diastaticus* (57-5) e *S. baillii* (C-4). Referência: (-) não floculação; (+) floculação; (D) morf. *S. diastaticus*; (B) morf. *S. baillii*; (I) intermediária.

Linhagens	Crescimento	Floculação	Morfologia celular
DBI-11	bom	+	D
DBI-14	bom	-	I
DBI-27	bom	-	I
DBI-31	regular	+	D
DBI-32	regular	+	D
DBII-4	bom	+	D
DBII-5	bom	-	I
DBII-21	sem cresc.	.	.
57-5(S.d.)	regular	+/-	D
C-4(S.d.)	sem cresc.	.	B

da característica de floculação nos isolados pertencentes ao primeiro grupo, comparativamente aos tipos parentais e a um controle representativo das demais colonias com morfologia de *S. baillii*.

O terceiro cruzamento foi realizado entre *Candida utilis* (Ca-1) e *Kluyveromyces fragilis* (IZ.610), donde foram isoladas 46 colonias no meio mínimo com lactose como única fonte de carbono. Estas colonias foram novamente testadas em meios seletivos (Tabela 4.3). Os dados obtidos com este teste mostraram que na verdade os isolados eram colonias parentais que tinham apresentado crescimento residual mostrando mais uma vez a ineficiência do meio seletivo utilizado.

No caso dos cruzamentos 4 e 5 de *Candida utilis* (IZ.300) com *Saccharomyces diastaticus* (57-5) e *S. cerevisiae* (C-74) respectivamente, não foi possível a seleção de conjugantes já que nos meios seletivos utilizados ocorreu crescimento residual impedindo o isolamento de colonias supostamente híbridas.

Dando continuação à análise dos conjugantes, os híbridos obtidos no cruzamento 1 foram avaliados quanto à sua capacidade fermentativa em amido liquefeito (Tabela 4.4). As linhagens isoladas apresentam variação na queda de Brix, sendo algumas semelhantes ou superiores ao parental fermenta-

Tabela 4.3 - Caracterização das colônias isoladas do cruzamento 3, entre *Candida utilis* (Ca-1) e *Kluyderomyces fragilis* (IZ.610) em meios seletivos com várias fontes de carbono e quanto à sua morfologia.

Linhagem	Morfo- logia	Galactose	Melezitose	Meio mínimo	Lactose
CK-1	K	+	-	-	+
CK-2	K	+	-	-	+
CK-3	K	+	-	-	+
CK-4	K	+	-	-	+
CK-5	K	+	-	-	+
CK-6	K	+	-	-	+
CK-7	K	+	-	-	+
CK-8	K	+	-	-	+
CK-9	K	+	-	-	+
CK-10	K	+	-	-	+
CK-11	K	+	-	-	+
CK-12	K	+	-	-	+
CK-13	K	+	-	-	+
CK-14	K	+	-	-	+
CK-15	K	+	-	-	+
CK-16	C	+	+	+	+/-
CK-17	K	+	-	-	+
CK-18	C	+	+	+	+/-
CK-19	K	+	-	-	++
CK-20	K	+	-	-	+
CK-21	K	+	-	-	+
CK-22	C	+	+	+	+/-
CK-23	K	+	-	-	+
CK-24	K	+	-	-	+
CK-25	K	+	-	-	+
CK-26	K	+	-	-	+
CK-27	K	+	-	-	+

(cont.)

(cont.)

Linhagens	Morfo- logia	Galactose	Melezitose	Meio mínimo	Lactose
CK-28	K	+	-	-	+
CK-29	K	+	-	-	+
CK-30	K	+	-	-	+
CK-31	I	+	-	-	+
CK-32	K	+	-	-	+
CK-33	K	+	-	-	+
CK-34	K	+	-	-	+
CK-35	K	+	-	-	+
CK-36	C	-	+	+	+/-
CK-37	K	+	-	-	++
CK-38	C	-	+	+	+/-
CK-39	C	-	+	+	+/-
CK-40	K	+	-	-	+
CK-41	K	+	-	-	+
CK-42	K	+	-	-	+
CK-43	K	+	-	-	+
CK-44	I	-	+	+	+/-
CK-45	K	+	-	-	+
CK-46	K	+	-	-	+
Ca-1	C	-	+	+	+/-
IZ.610	K	+	-	-	+

Tabela 4.4 - Redução de Brix em fermentações em amido liquefeito dos híbridos isolados do cruzamento I por fusão de protoplastos, entre *S. cerevisiae* (C-74) e *S. diastaticus* (57-5).

Linhagens	Fermentações				$\bar{x}$
	I	II	III	IV	
57-5	14,3	10,7	12,7	13,0	12,675
J	15,7	15,0	14,2	13,4	14,575
P	15,7	15,0	14,1	13,3	14,525
140	14,5	11,6	12,5	13,5	13,025
208	15,8	14,9	14,5	14,0	14,800
368	15,8	15,1	14,6	14,2	14,925
487	15,5	14,1	13,2	12,5	13,825
665	15,6	14,7	14,0	13,8	14,525
693	16,0	15,3	15,3	15,2	15,450
794	14,4	11,1	11,9	13,2	12,650
808	15,2	12,6	13,4	14,5	13,900
837	15,2	12,3	13,4	13,9	13,700
840	14,4	11,2	11,1	13,0	12,425
886	15,1	12,5	13,4	14,4	13,850
931	15,1	13,2	14,5	14,7	14,375
Brix inicial - 16,6					
575	16,3	13,9	13,5	13,5	14,300
336	14,6	13,2	12,2	13,2	13,300
342	13,8	11,9	12,1	12,5	12,575
343	16,6	16,0	15,1	14,7	15,600
357	16,5	14,1	13,7	14,1	14,500
489	16,3	16,8	16,1	16,3	16,400
581	16,6	14,9	14,6	15,1	15,300
607	16,1	14,5	13,4	14,5	14,666
653	16,7	16,8	16,8	15,2	16,375
682	13,8	13,3	12,5	12,2	12,950
Brix inicial - 17,8					

dor *S. diastaticus*, e outras apresentando valores intermediários entre os dois parentais. Os híbridos CD-301, CD-336, CD-342, CD-487, CD-682 e CD-840 que tiveram valores elevados foram avaliados quanto à produção de etanol a partir de amido liquefeito (Tabela 4.5) e de melaço de cana (Tabela 4.7). Estes experimentos foram analisados estatisticamente através de análises de variância (Tabelas 4.6 e 4.8, respectivamente), as quais mostram as diferenças entre tratamentos e entre linhagens são significativas, e no segundo caso as diferenças entre fermentações são significativas, porém o valor é muito inferior ao encontrado entre tratamentos e linhagens. Os dados de fermentação em amido mostram que nenhum dos híbridos apresentou produção maior do que o parental fermentador *S. diastaticus* (57-5). Porém, as diferenças dos híbridos CD-301, CD-336, CD-342 e CD-487 não foram significativas estatisticamente em relação ao parental *S. diastaticus*, o que foi comprovado pelo teste de Dunnett.

A avaliação em melaço de cana mostra que os híbridos apresentam alta produção de álcool, semelhantes ao parental 57-5 (*S. diastaticus*), sendo que CD-342 e CD-682 foram superiores a este, se bem as diferenças não foram significativas.

A heterose também foi avaliada em híbridos obtidos do cruzamento 2 entre *S. diastaticus* (57-5) e *S. baillii*(C-4)

Tabela 4.5 - Avaliação da produção de etanol a partir de amido liquefeito dos híbridos obtidos do cruzamento por fusão de protoplastos entre *S. cerevisiae* (C-74) e *S. diastaticus* (57-5). Médias de 4 fermentações de 23 horas em amido dextrinizado 15% em temperatura de 30°C (d' = 0,38 g/100 ml).

Linhagens	Cruzamentos	Etanol (g/100 ml)	D	h (%)
57-5(s.d.)	P ₁	4,45	-	-
C-74(s.d.)	P ₂	1,00	-	-
CD -301	P ₁ x P ₂	4,15	n.s.	-6,74
CD-336	P ₁ x P ₂	4,35	n.s.	-2,25
CD-342	P ₁ x P ₂	4,41	n.s.	-0,90
CD-487	P ₁ x P ₂	4,13	n.s.	-7,19
CD-682	P ₁ x P ₂	3,68	*	-17,30
CD-840	P ₁ x P ₂	2,43	*	-45,39

Tabela 4.6 - Análise de variância para os dados da Tabela 4.5. Experimento inteiramente casualizado.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamentos	23	98,4045	4,2784	50,39 ^{**}
Linhagens (L)	7	96,1247	13,7321	161,74 ^{**}
Fermentações (F)	2	0,0873	0,0436	0,51 n.s.
L x F	14	2,1925	0,1566	1,84 n.s.
Resíduos	48	4,0758	0,0849	
Totais	71	102,4803	1,4434	

Tabela 4.7 - Avaliação da fermentação em melaço de cana dos híbridos do cruzamento 1 obtidos por fusão de protoplastos entre *S. cerevisiae* (C-74) e *S. diastaticus* (57-5). Média de 5 fermentações de 15 horas em meio com 21,5% de ART a 35°C ($d' = 0,28$ /100ml).

Linhagens	Cruzamentos	Etanol (g/100 ml)	D	h(%)
C-74	P ₂	2,76	-	-
57-5	P ₁	7,76	-	-
CD-301	P ₁ x P ₂	7,74	n.s.	-0,26
CD-336	P ₁ x P ₂	7,43	*	-4,25
CD-342	P ₁ x P ₂	7,85	n.s.	1,16
CD-487	P ₁ x P ₂	7,16	*	-7,73
CD-682	P ₁ x P ₂	7,93	n.s.	2,19
CD-840	P ₁ x P ₂	7,69	n.s.	-0,90

Tabela 4.8 - Análise de variância para os dados da Tabela 4.7. Experimento inteiramente casualizado (n.s. / não significativo; ** - altamente significativo(%)).

F.V.	G.L	S.Q.	S.Q.	F.
Tratamento	31	265,5783	8,5670	135,34**
Linhagens (L)	7	256,7853	36,6836	579,52**
Fermentações (F)	3	0,9975	0,3325	5,25**
L x F	14	7,7955	0,5568	8,79**
Resíduos	64	4,0493	0,0633	
Totais	95	269,6276	2,8382	

em amido liquefeito, cujos dados são apresentados na Tabela 4.9. Nesta pode-se observar que os isolados DBI-11, DBI-31, DBI-32 e DBII-4 possuem valores semelhantes ao parental *S. diastaticus*, porém sem superar seus valores. Os híbridos DBI-14, DBI-27 e DBII-5 exibiram valores intermediários entre os dois parentais.

Tabela 4.9 - Avaliação da fermentação de amido dos híbridos com morfologia *diastaticus* do cruzamento entre *S. diastaticus* (57-5) e *S. baillii* (C-4) através do valor de Briz - Valores médios de 4 fermentações de 48 horas com amido (Dens. inicial-1,0702)

Linhagens	Cruzamento	Densidade
57,5	P ₁	1,0459
C-74	-	1,0622
C-4	P ₁ x P ₂	1,0648
DBI-11	P ₁ x P ₂	1,0476
DBI-14	P ₁ x P ₂	1,0584
DBI-27	P ₁ x P ₂	1,0585
DBI-31	P ₁ x P ₂	1,0482
DBI-32	P ₁ x P ₂	1,0497
DBII-4	P ₁ x P ₂	1,0476
DBII-5	P ₁ x P ₂	1,0581

Devido à não utilização de genes marcadores e à impossibilidade de análise da morfologia de setores não foi possível avaliar a estabilidade mitótica dos híbridos. Os da-

Tabela 4.10 - Estimativa da estabilidade meiôtica dos híbridos entre *S. diastatius* (57-5) e *S. cerevisiae* (C-74) obtidos por fusão de protoplastos, através da frequência de esporulação e de ascos com 2, 3 e 4 esporos.

Linhagens	Não analisado	Nº de ascos	Nº de ascos com 2 ascosporos		Nº de ascos com 3 ascosporos		Nº de ascos com 4 ascosporos	
			%	%	%	%	%	%
57-5	981	13	1,4	100	0	0	0	0
C-74	929	72	7,7	45,85	30	41,65	9	12,5
CD-140	962	0	0	0	0	0	0	0
CD-301	1084	26	2,4	100	0	0	0	0
CD-336	1001	12	1,2	100	0	0	0	0
CD-342	1013	21	2,07	100	0	0	0	0
CD-487	1253	96	7,6	16,6	50	52,1	30	31,3
CD-682	976	35	3,5	97,1	1	2,9	0	0
CD-840	1058	12	1,13	100	0	0	0	0
CD-935	1113	0	0	0	0	0	0	0

dos obtidos, a seguir apresentados, relativos à frequência de esporulação e contagem de ascos com 2, 3 e 4 esporos representam uma estimativa de estabilidade meiótica das linhagens.

Os híbridos do cruzamento 1 foram avaliados quanto à esporulação, cujos dados são apresentados na Tabela 4-10. Nestes pode-se observar que somente a linhagens CD-487 mostra frequência de esporulação semelhante à linhagem parental *S. cerevisiae*, contudo verifica-se que o híbrido apresenta valores mais elevados de ascos com 3 a 4 esporos do que C-74, possivelmente um indicativo de sua maior estabilidade. As outras linhagens apresentam frequências muito reduzidas de esporulação semelhantes a de *S. diastaticus*, e não formam ascos completos.

4.2. Fusão de protoplastos com seleção de híbridos baseada em marcas auxotróficas

Os dados apresentados no item anterior mostram que a utilização de marcas naturais no isolamento de híbridos obtidos por fusão de protoplastos é um método de eficiência reduzida, causada principalmente pelo crescimento residual, o que prejudica a recuperação de híbridos. Por esta razão foram utilizadas linhagens com marcas auxotróficas nos experimentos de fusão de protoplastos intra e interespecíficas, a seguir apresentados.

4.2.1. Fusões intraespecíficas em *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens haplóides de laboratório de *S. cerevisiae* 55R5-3C/1 (a ura 1) e Z 136-1-13c (a arg 4-2 leu 1-1 ade 1 trp 1 gal 1). Foram cruzadas por fusão de protoplastos obtendo-se altas frequências de esporoplastização, como também foi obtida alta frequência de híbridos ($3,4 \times 10^{-3}$ por par de protoplastos). Sendo a frequência de aparecimento de prototróficos nas linhagens parentais menor a 10^{-8} , as colônias isoladas podem ser consideradas como híbridas.

Foi também determinado o tamanho das células, cujos dados são apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 - Determinação do volume celular de parentais e híbridos de *S. cerevisiae* obtidos por fusão de protoplastos

Linhagens		Comprimento (μm)	Largura (μm)	Volume (μm^3)
P ₁) 55R5-3C/1	P _{1a}	5,108	4,008	42,980
P ₂) Z 136-1-13c	P _{2a}	4,748	3,969	39,182
P ₃) IL 102-80	P _{3a}	4,459	3,739	32,650
E 501	(P ₁ ×P ₂)	5,915	4,228	55,354
E 502	(P ₁ ×P ₂)	6,464	4,827	78,877
E 503	(P ₁ ×P ₂)	6,404	5,043	85,302
E 511	(P ₁ ×P ₃)	7,155	5,092	97,145
E 512	(P ₁ ×P ₃)	7,191	5,175	100,834
E 513	(P ₁ ×P ₃)	7,317	4,660	83,196

Os valores de comprimento, largura e, especialmente volume são muito maiores nos híbridos do que nas linhagens haplóides, confirmando indiretamente a diploidia dos mesmos.

Para confirmar a independência entre a frequência de fusão e o tipo de reação sexual das linhagens foi realizada a fusão entre 55R5-3C/1 (a ura 1) e IL 102-8D (α his 1 trp 1). Neste caso a frequência de fusão foi da ordem de $9,2 \times 10^{-4}$ híbridos por par de protoplastos. Esta frequência indica que realmente foram formados híbridos já que a frequência de reversão foi menor a 10^{-8} . Adicionalmente por replica em meio seletivo confirmou-se o estado híbrido destas colônias. Em meio de esporulação as linhagens híbridas esporularam formando ascas com 2,3 e 4 esporos em frequência variando entre 23,5 e 52%.

Os dados referentes a volume são apresentados na Tabela 4.11, sendo que os valores elevados dos híbridos com respeito as linhagens parentais confirmam a diploidia.

4.2.2. Fusões interespecíficas e intergenéricas

As linhagens CBS 2527 de *Endomycopsis fibuligera* apresenta deficiência para piridoxina e metionina e foi

cruzada através de fusão de protoplastos com a linhagens 55R5-3C/1 (a ura 1) de *Saccharomyces cerevisiae*.

A frequência de esferoplastização foi de 95 e 98%, respectivamente, e nas Figuras 1 a 4 é possível observar o aspecto das células e dos esferoplastos das duas linhagens, destacando-se principalmente no caso de CBS 2527 (Fig. 1 e 2), a grande diferença morfológica entre os dois estados.

A adição de polietileno glicol à mistura provoca a aglutinação dos mesmos, o que pode ser observado na Fig. 5, que exhibe um aglomerado composto por número elevado de protoplastos.

Deste cruzamento foram isolados 49 clones com morfologia semelhante a ambos os tipos parentais, que foram transferidos para meio mínimo e para meio completo (não seletivo), a fim de confirmar o seu crescimento no meio seletivo e observar a formação de possíveis setores no meio não seletivo. Todas as colônias cresceram em meio mínimo e algumas produziram setores com morfologia intermediária ou semelhante ao parental *S. cerevisiae* (Figuras 6-8).

Como pode ser observado nas Figuras 6-8 há grande predominância de colônias com morfologia *Endomycopsis* (E)

Fig. 1 - Células e pseudomicélio de *Endomycopsis fibuligera* (CSB 2527) após crescimento em meio completo com agitação (1000 x)

Fig. 2 - Protoplastos de *Endomycopsis fibuligera* (CBS 2527) obtidos por tratamento enzimático com helicase (1000 x)

Fig. 3 - Células de *Saccharomyces cerevisiae*(55R5-3C/1) após crescimento em meio líquido completo com agitação (1000 x)

Fig. 4 - Protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* (55R5-3C/1) obtidos por tratamento enzimático com helicase(1000 x)

Fig. 5 - Aglutinação de protoplastos de *Endomycopsis fibuligera* e *Saccharomyces cerevisiae* provocada pelo polietilenoglicol (600 x)

Fig. 6 - Morfologia das colônias híbridas entre *Endomycopsis fibuligera* e *Saccharomyces cerevisiae* com detalhe de uma colônia com setores em meio completo

Fig. 7 e 8 - Morfologia das 49 colonias híbridas isoladas da fusão de protoplastos entre *Endomycopsis fibuligera* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Fig. 9 e 10 - Formação de halo com coloração de lugol das colônias híbridas das Figuras 7 e 8, respectivamente, após crescimento em meio de amido por 72 horas.

dentre os isolados, sendo que somente 4 colonias exibiram morfologia *Saccharomyces* (S). Comparando com as Figura 9 e 10, podemos ver que as colonias com setores e aquelas de morfologia *Endomycopsis* degradam o amido, enquanto que as de morfologia *Saccharomyces* não formam halo quando coradas com lugol.

Os setores de morfologia S isolados foram também testados quanto à formação de novos setores, morfologia, crescimento em meio seletivo e degradação de amido (Tabela 4-12). Nesta verifica-se que somente o setor D formou halo em amido e manteve a morfologia S. Os setores restantes cresceram em meio seletivo, mas não degradaram amido.

Estes híbridos foram também avaliados quanto à estabilidade após crescimento em meio seletivo e não seletivo e contagem após plaqueamento (Item 3-15). Porém, a elevada instabilidade destes, não permitiu o bom desenvolvimento da técnica, aparecendo crescimento semelhante nos dois meios e muitas vezes perdendo a morfologia original, como no caso das colonias com setores que passaram a exibir somente colonias com morfologia S.

Também foi desenvolvido experimento de fusão entre as linhagens J 132 b ade⁻ de *Saccharomyces diastaticus* e 55R5-3C/221 de *Saccharomyces cerevisiae*. Neste foram obtidas frequências elevadas de esferoplastização das duas linha-

Tabela 4-12 - Caracterização dos setores isolados dos híbridos entre *E. fibuligera* (CBS 2527) e *S. cerevisiae* (55R5-3C/1) quanto à formação de halo em amido, crescimento em meio mínimo e morfologia em meio completo - (S) Morf. *Saccharomyces*, (E) Morf. *Endomycopsis*.

Setores	Amido	MM + vit	YEPD
SE-A	-	+	S
SE-B	-	+	S
SE-C	-	+	S
SE-D	+	+	S
SE-E	-	+	S e E
SE-F	-	+	S
SE-G	-	+	S
SE-H	-	+	S

gens. As Figuras 11 e 12 mostram diferenças morfológicas entre células e esferoplastos de *S. diastaticus*.

Foram isoladas em meio seletivo 22 colônias supostamente híbridas que foram testadas novamente em meio seletivo, além de meio de amido. Dentre estes somente 4 apresentaram formação de halo e crescimento em meio mínimo.

4.3. Híbridos interespecíficos obtidos por cruzamentos naturais

A hibridização natural aproveitando a reação sexual das leveduras é uma forma importante e muito utilizada em melhoramento, pelo que é de interesse também o estudo da estabilidade e heterose dos híbridos interespecíficos obtidos por este método.

4.3.1. Avaliação da estabilidade genética em híbridos de *S. cerevisiae* e *S. diastaticus*

A avaliação da estabilidade genética de híbridos interespecíficos de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces diastaticus* foi analisada nos conjugantes obtidos dos seguintes cruzamentos:

Fig. 11 - Células de *Saccharomyces diastaticus* (J132b)_{ade⁻} após crescimento em meio completo com agitação (1000 x)

Fig. 12 - Protoplastos de *Saccharomyces diastaticus* (J132b)_{ade⁻} após crescimento meio completo com agitação (1000 x)

- 1) J132b_{ade}-(S.d) x 1L102-8D (S.c)
Híbridos = E21, E22 e E23
- 2) J132b_{ade}-(S.d) x 1L187-7A (S.c)
Híbridos = E71, E72 e E73
- 3) J132b_{ade}-(S.d) x 1L166-5B (S.c)
Híbridos = E61, E62 e E63

Estes híbridos isolados por micro manipulação foram caracterizados em meio de amido, meio completo, meio mínimo com vitaminas, e meio com cloranfenicol ou eritromicina. Os dados mostraram que ocorre complementação das marcas, comprovando-se devido ao crescimento em meio mínimo, transferência do caráter assimilação de amido e dos caracteres de resistência mitocondrial a antibióticos (Tabela 4.13).

A estabilidade mitótica foi estudada realizando o crescimento dos híbridos em meio seletivo e não seletivo líquidos, até a fase estacionária e plaqueando estes em YEPDe meio mínimo para comparação do número de colônias crescidas em cada caso. Os resultados obtidos constam na Tabela 4-14. Os testes de χ^2 para estes resultados mostraram que as diferenças em termo de número de colônias nos dois meios não são estatisticamente significativas.

Porém, a observação das colônias em placas de

Tabela 4.13 - Caracterização dos híbridos naturais obtidos dos cruzamentos entre linhagens marcadas de *S. diastaticus* e *S. cerevisiae*

Linhagens	YPGE	Amido	MM+vit	YPGE+cloranfenicol	YPGE+eritromicina
J132bade ⁻	+	+	-	-	-
IL102-80	+	-	-	-	+
IL187-7A	+	-	-	+	-
IL166-5B	+	-	-	-	-
E21	+	+	+	-	+
E22	+	+	+	-	+
E23	+	+	+	-	+
E71	+	+	+	+	-
E72	+	+	+	+	-
E73	+	+	+	+	-
E61	+	+	+	-	-
E62	+	+	+	-	-
E63	+	+	+	-	-

YEPD dos híbridos do primeiro cruzamento levam a pensar em instabilidade, já que as colônias não apresentam bordos regulares como pode ser visto na Figura 13 da linhagem E21.

Conforme efetuado nos outros casos, foi avaliada a frequência de esporulação e de ascos com 2, 3 e 4 esporos cujos dados constam na Tabela 4.15, na qual verifica-se valores relativamente elevados de esporulação, porém, com baixa frequência de ascos completos e taxa muito elevada de ascos com dois esporos. Estes resultados levam a pensar em instabilidade meiótica já que ascos com 2 e 3 esporos são originados de meiose

Fig. 13 - Morfologia irregular das colonias híbridas obtidas por cruzamentos naturais entre *Saccharomyces dastaticus* (J132b) e *S. cerevisiae* (IL102-8D) em meio completo.

Tabela 4.14 - Avaliação da estabilidade mitótica dos híbridos interespecíficos obtidos por cruzamentos naturais entre *S. diastaticus* (J132b) e *S. cerevisiae* (IL 108-8D, IL-187-7A e IL-166-5B) através da técnica descrita no item 3.15 e análise estatística dos dados (Testes de χ^2)

Linhagens	YEPD ¹			MM + vit ¹		
	YEPD ²	MM+vit ²	χ^2	YEPD ²	MM+vit ²	χ^2
IL 102-8D	351	0	-	-	-	-
J132bade ⁻	352	0	-	-	-	-
IL 187-7A	251	0	-	-	-	-
IL 166-5B	303	0	-	-	-	-
E21	250	220	1,914 ^{ns}	78	56	3,612 ⁿ
E22	207	207	0 ^{ns}	55	39	2,724 ⁿ
E23	479	521	1,764 ^{ns}	204	165	4,120 [*]
E71	670	622	1,780 ^{ns}	217	238	0,9692 ⁿ
E72	492	460	1,0756 ^{ns}	140	134	0,1214 ⁿ
E73	379	362	0,390 ^{ns}	231	208	1,2050 ⁿ
E61	691	711	0,2853 ^{ns}	263	262	1,2050 ⁿ
E62	402	435	1,300 ^{ns}	133	136	0,0234 ⁿ
63	511	474	1,290 ^{ns}	354	378	0,7868 ⁿ

¹ Crescimento 24 h em YEPD e MM+vit, respectivamente.

² Plaqueamento em YEPD (não seletivo) e Meio Mínimo com Vitaminas (seletivo) a partir da cultura em meio não seletivo (YEPD).

TEXTE χ^2 - Plaqueamento a partir do YEPD

	Obs. YEPD	d ² /1	Obs. MM+vit	d ² /1	Total
E21	260	0,71267	220	0,72490	470
E22	207	0,01490	207	0,01517	414
E23	479	1,26560	521	1,28740	1000
E71	670	0,52488	622	0,53390	1292
E72	492	0,29705	460	0,30210	952
E73	379	0,07634	362	0,07760	741
E61	691	0,62050	711	0,17340	1412
E62	402	0,95417	435	0,97060	837
E63	511	0,41175	474	0,41880	985
Total	4081	4,87786	4012	4,50387	8093

GL = 8; $\chi^2 = 9,38173$

anormal. Adicionalmente foi observado que dentro dos ascos completos existia variação no tamanho de ascosporos, em geral, aparecendo um ou dois maiores. Para confirmar a instabilidade genética na meiose foram isolados por micromanipulação esporos dos ascos pertencentes aos híbridos do primeiro cruzamento. A Tabela 4.16 mostra os dados obtidos para 100 esporos isolados de 25 ascos, onde podemos observar que a viabilidade de esporos foi muito baixa e não houve aparecimento de tetrades completas.

Tabela 4.16 - Viabilidade de esporos de ascos completos para híbridos do cruzamento J132b_{ade⁻} x IL102-8D.

Linhagens	% de viabilidade	Nº de ascos com esporos germinados					Nº total de ascos
		0	1	2	3	4	
E21	31	10	4	8	3	0	25
E22	17	12	10	2	1	0	25
E23	14	15	6	4	0	0	25

4.3.2. Avaliação da heterose em híbridos naturais de *S. cerevisiae* e *S. diastaticus*

A avaliação da heterose foi realizada em híbridos do cruzamento entre a linhagem Fl-Aα de *Saccharomyces cerevisiae* obtida por segregação da levedura industrial Fleishmann e J132b de *Saccharomyces diastaticus*. Em ambos os casos devido

a serem leveduras industriais, não pode ser garantida a condição haplóide.

Todos os híbridos isolados deste cruzamento exibiram formação de halo em meio de amido com a coloração de lugol. Não foi observado o aparecimento de colônias irregulares ou com setores e apoiados nos dados do item anterior consideramos que são estáveis mitoticamente. A análise da estabilidade meiótica através da contagem de ascos com 2, 3 e 4 esporos e frequência de esporulação apresentada na Tabela 4.17 mostra resultados muito semelhantes aos obtidos com as linhagens de laboratório, confirmando a instabilidade meiótica observada anteriormente.

Os dados de fermentação em amido liquefeito da Tabela 4.18 evidenciam que as linhagens híbridas E201, E202 e E203 tem capacidade menor de fermentação de amido do que o parental *S. diastaticus*, com valores intermediários entre os dois parentais, o que pode ser observado nos dados correspondentes à heterose e cuja significância foi comprovada pelo teste de Dunnett. Os dados deste ensaio foram analisados estatisticamente (Tabela 4.19), onde pode ser observada a significância das diferenças entre linhagens e entre fermentações.

A produção de etanol da fermentação destes conjugantes em melaço de cana apresentada na Tabela 4.20 mostra

Tabela 4.17 - Estimativa da estabilidade meiótica dos híbridos entre F1-A (S.c) e J132b (S.d) através da frequência da esporulação e dos ascospores 2, 3 e 4 esporos.

	Nº total analisado	Nº total de ascos	Nº de ascos com dois ascosporos		Nº de ascos com três ascosporos		Nº de ascos com quatro ascosporos	
			%	%	%	%	%	%
J132(S.d)	1115	0	0	0	0	0	0	0
F1-A (S.c)	986	0	0	0	0	0	0	0
E201 (H)	1103	599	54,3	375	62,6	166	58	9,68
E202 (H)	860	382	44,42	265	69,37	92	25	6,54
E203 (H)	1173	448	38,19	309	68,47	120	19	4,24

Tabela 4.18 - Avaliação da produção de etanol a partir de amido liquefeito das linhagens híbridas entre F-1A (S.c) e J132b (S.d) obtidos por cruzamentos naturais. Valores médios de 4 fermentações consecutivas de 23 h a 30°C em meio de amido 15% com 3 repetições para cada linhagem.

Linhagens	Cruzamento	Etanol (g/100 ml)	D	h(F-P)
57-5	-	6,11	-	-
J132b	P ₁	5,43	-	-
F1-A	P ₂	1,65	-	-
E201	P ₁ x P ₂	3,21	*	-40,88
E202	P ₁ x P ₂	2,58	*	-52,48
E203	P ₁ x P ₂	2,08	*	-61,69

Tabela 4.19 - Análise de variância dos dados da Tabela 4.18.

Experimento inteiramente casualizado.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	17	154,5678	9,0922	348,36**
Linhagens (L)	5	152,0286	30,4057	1164,97**
Fermentações(F)	2	1,3704	0,6852	26,25**
L x F	10	1,1688	0,1169	4,48**
Resíduos	36	0,9392	0,0261	
Total	53	155,5070	2,9341	

Tabela 4.20 - Avaliação da produção de etanol a partir de melaço de cana das linhagens híbridas entre F-1A (S.c) e J132b (S.d) obtidos por cruzamentos naturais. Valores médios de 5 fermentações consecutivas de 15 h a 30°C em meio de melaço de cana com 14, de ART, com 3 repetições para cada linhagem.

Linhagens	Cruzamento	Etanol (g/100 ml)	D	$h(F_i-P)$
J132b	P ₁	6,59	-	-
F1-A	P ₂	6,66	-	-
E201	P ₁ x P ₂	6,88	*	3,30
E202	P ₁ x P ₂	6,92	*	3,90
E203	P ₁ x P ₂	6,75	*	1,35

Tabela 4.21 - Análise de variância dos dados da tabela 4.20.

Experimento inteiramente casualizado.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	24	1,7857	0,0744	12,19**
Linhagens (L)	4	1,1390	0,2845	46,64**
Fermentações(F)	4	0,1864	0,0466	7,64**
L x F	16	0,4613	0,0288	4,72**
Resíduos	50	0,3043	0,0061	
Total	74	2,0900	0,0282	

valores superiores aos parentais. Mesmo as diferenças sendo pequenas em relação ao parental Fl-A, os testes de Dunnett comprovam a sua significância. Os valores de heterose variaram entre 1,35 e 3,90%. As diferenças entre linhagens e entre fermentações foram significativas neste experimento o que pode ser observado na análise de variância apresentada na Tabela 4.21.

Além do etanol são produzidos na fermentação alcoólica outros compostos menores e alcoóis superiores, alguns dos quais estão associados ao catabolismo de aminoácidos e condições de nitrogênio disponível no meio de cultura. Dados de análise cromatográfica em fase gasosa são apresentados na Tabela 4.22, correspondentes às fermentações da Tabela 4.20 em melaço de cana. Nesta pode ser observado que as variações entre híbridos e parentais são muito reduzidas, existindo também pequenas diferenças entre os próprios híbridos. Os valores observados (ppm) para acetato de etila, n-propanole isobutanol são semelhantes ao parental *S. cerevisiae*. O único com valores superiores aos parentais foi o álcool isoamílico.

4.3.3. Efeito da ploidia e dose gênica no comportamento fermentativo de híbridos entre *S. diastaticus* e *S. uvarum*

A fim de estabelecer as relações existentes

Tabela 4.22.- Determinação de componentes leves e alcoóis superiores no destilado de fermentações em melão de cana dos híbridos entre *S. cerevisiae* (F 1-A) e *S. diastaticus* (J 132-b). Análise cromatográfica em fase gasosa, dados em ppm

Linhagens	Acetona	Acetal- deído	Acetato de etila	n- propanol	Iso- butanol	Iso- amílico
57-5	6,036	32,983	1,349	12,822	40,387	33,548
J132b	6,892	36,946	5,165	42,442	41,115	47,722
F1-A	6,922	24,731	-	26,121	54,097	48,529
E201	7,333	23,795	11,800	27,837	50,847	59,706
E202	6,784	28,561	8,906	30,669	48,978	60,202
E203	6,519	20,900	4,847	31,298	51,498	57,962

entre os níveis de ploidia, a expressão gênica e a estabilidade, foram realizados cruzamentos entre linhagens com ploidia variada de *Saccharomyces uvarum* e a linhagem industrial J132b de *Saccharomyces diastaticus*. Através de micromanipulação foram isolados híbridos dos cruzamentos:

1) ATCC 28098(α) x J132b

Híbridos: E101, E102, E103, E104

2) ATCC 28100 ($\alpha\alpha$) x J132b

Híbridos: E106

3) ATCC 28104 ($\alpha\alpha\alpha\alpha$) x J132b

Híbrido: E107, E108 e E109.

Os híbridos foram testados em placas para formação de halo em amido, comprovando-se a assimilação de amido em todos eles.

Os parentais e os híbridos foram medidos microscopicamente observando-se na Tabela 4.23, que o volume celular aumenta com o nível de ploidia, sendo que os haplóides (28098) tem $26,67 \mu\text{m}^3$ e o parental tetraplóide (28104) tem $149,59 \mu\text{m}^3$. Assim sendo, podemos relacionando os dados dos parentais com híbridos, estimar o seu grau de ploidia. O volume celular de J132b foi de $70,57 \mu\text{m}^3$ assemelhando-se ao volume de células diplóides. Os dados de volume dos híbridos também apoiam esta hipótese, com exceção da linhagem E106 que exibe valor inferior ao esperado para um tetraplóide.

Tabela 4.23 - Determinação do volume celular dos parentais e híbridos de *S. diastaticus* e *S. uvarum* com diferentes graus de ploidia. Os graus de ploidia entre parentais correspondem ao esperado nos dados de volume celular.

Linhagens	Ref.	Ploidia	Cruzamento	Comprimento (μm)	Largura (μm)	Volume (μm^3)
ATCC 28098	S.u	haplóide	P ₁	4,17	3,49	26,67
ATCC 28100	S.u	diplóide	P ₂	5,73	4,84	20,43
ATCC 28101	S.u	triplóide	-	6,61	5,36	99,43
ATCC 28104	S.u	tetraplóide	P ₃	7,89	6,02	149,59
J132b	S.d	(diplóide)	P ₄	6,37	4,60	70,57
28098 x J132b	H _I	(triplóide)	P ₁ xP ₄	8,41	4,63	94,54
28100 x J132b	H _{II}	(tetraplóide)	P ₂ xP ₄	6,52	5,05	86,95
28104 x J132b	H _{III}	(hexaplóide)	P ₃ xP ₄	8,61	6,25	176,06
E104 x J132b	H _A	(pentaplóide)	H ₃ xP ₄	8,17	5,38	124,03
E106 x J132b	H _B	(hexaplóide)	H ₁₁ xP ₄	9,04	6,05	173,30
E107 x J132b	H _C	(octaplóide)	H ₁₁₁ xP ₄	7,54	5,40	115,16

Estes híbridos foram também testados quanto à esporulação, avaliando a frequência de ascos e seu tipo. Os dados apresentados na Tabela 4.24 mostram que os híbridos com menor ploidia resultantes dos dois primeiros cruzamentos apresentam frequência de esporulação mais elevadas do que os do cruzamento com a linhagem *S. uvarum* tetraploide. Porém, estes últimos tiveram frequência mais elevada de ascos completos, o que denota maior estabilidade.

Quanto à avaliação da capacidade fermentativa em amido liquefeito, os dados de produção de etanol constam na Tabela 4.25, na qual podemos ver que os híbridos apresentam menor capacidade de fermentação do que o parental *Saccharomyces diastaticus*. Estes dados ficaram prejudicados pela capacidade das linhagens de *S. uvarum* fermentar maltose e maltotriose. Apesar deste inconveniente, os híbridos apresentam heterose negativa, assemelhando-se ao parental *S. uvarum*, como pode ser melhor observado no caso dos híbridos do terceiro cruzamento. A significância das diferenças com respeito ao parental superior foi confirmada pelo teste de Dunnett. O ensaio foi analisado estatisticamente (Tabela 4.26) mostrando que as diferenças entre linhagens e fermentações são significativas e que a precisão do experimento é boa já que o resíduo é baixo.

Em dois experimentos separados foram avalia-

Tabela 4.24 - Estimativa da estabilidade meiótica dos híbridos em ploidia variada entre linhagens de *S. diastaticus* e *S. uvarum* através da frequência de esporulação e de ascas com 2, 3 e 4 esporos.

Linhagens	Nº total anali- sado	Nº total de ascos	%	Nº de ascas com 2 ascosporos	%	Nº de ascas com 3 ascosporos	%	Nº de ascas com 4 ascosporos	%
ATCC 28098 (S.v)	1015	0	0	0	0	0	0	0	0
ATCC 28100 (S.v)	801	40	4,99	13	32,5	8	20	19	47,5
ATCC 28104 (S.v)	1421	39	2,7	17	43,6	14	35,89	8	20,5
J132b a (S.d.)	1115	0	0	0	0	0	0	0	0
E101 (H) $\alpha\alpha$	1073	456	42,5	410	89,9	43	9,45	3	0,65
E102 (H) $\alpha\alpha$	897	380	42,86	200	52,63	136	35,79	44	11,58
E103 (H) $\alpha\alpha$	1021	369	36,14	210	86,41	109	29,54	50	13,55
E106 (H) $\alpha\alpha\alpha$	1024	555	53,74	257	46,47	230	41,59	66	11,93
E107 (H) $\alpha\alpha\alpha\alpha$	982	335	34,11	137	40,9	112	33,43	86	25,67
E108 (H) $\alpha\alpha\alpha\alpha$	1037	238	22,95	99	41,6	66	27,7	73	30,7
E109 (H) $\alpha\alpha\alpha\alpha$	1033	384	37,17	96	25	138	35,93	150	39,06

Tabela 4.25 - Avaliação da produção de etanol a partir de amido liquefeito dos parentais e linhagens híbridas entre *S. diastaticus* e *S. uvarum*. Valores médios de 4 fermentações consecutivas de 23 h, a 30°C em meio de amido 15% com 3 repetições para cada linhagem.

Levedura	Cruzamento	Etanol (g/100 ml)	D	h(F ₁ -P ₁)
J132b (S.d)	P ₁	4,04	-	-
28098 (S.v)	P ₂	3,97	-	-
28100 (S.v)	P ₃	3,51	-	-
28104 (S.v)	P ₄	0,89	-	-
E102 (H)	P ₁ x P ₂	3,84	*	- 4,95
E104 (H)	P ₁ x P ₂	3,33	*	- 17,57
E106 (H)	P ₁ x P ₃	3,28	*	- 18,81
E107 (H)	P ₁ x P ₄	0,99	*	- 75,49
E108 (H)	P ₁ x P ₄	1,08	*	- 73,27
E109 (H)	P ₁ x P ₄	0,98	*	- 75,74

Tabela 4.26 - Análise de variância dos dados da Tabela 4.25. Experimento inteiramente casualizado.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	29	186,3264	6,4250	399,07**
Linhagens (L)	9	159,9416	17,7713	1033,81**
Fermentações (F)	2	11,8545	5,9272	368,15**
L x F	18	14,5303	0,8072	50,14**
Resíduos	60	0,9638	0,0161	
Totais	89	187,2902	2,1044	

dos todas as linhagens quanto à fermentação em melaço de cana. Os dados destas constam nas Tabelas 4.27 e 4.29 e a análise de variância para estes ensaios acham-se nas Tabelas 4.28 e 4.30, respectivamente. Nestas pode ser observado que nos híbridos do primeiro cruzamento a capacidade fermentativa foi superior aos parentais, dando valores elevados de heterose que variaram entre 22,88 e 38,31% acima do parental superior. A significância das diferenças com respeito a este parental foi confirmada pelo teste de Dunnett. No híbrido do cruzamento entre ATCC 28100 e J132b é observada heterose positiva, mas esta é reduzida, sendo somente de 1,94%. Mesmo assim a diferença com o parental 28100 é significativa.

Os híbridos do terceiro cruzamento exibem valores semelhantes ao parental *S. uvarum*, o que foi confirmado pela não significância no teste de Dunnett.

Os híbridos foram também avaliados quanto à produção de outros compostos resultantes da fermentação alcoólica, apresentados na Tabela 4.31, a qual mostra que os conjugantes produzem estes compostos em quantidades semelhantes aos parentais, exceto no caso de *n*-propanol, que exhibe valores significativamente superiores a ambos os pais, e iso-butanol que com exceção do híbrido E101, mostra algum acréscimo com relação aos parentais.

Tabela 4.27 - Avaliação da produção de etanol a partir de melaço de cana das linhagens híbridas entre *S. diastaticus* e *S. uvarum* - Valores médios de 5 fermentações consecutivas em melaço 22,55% de ART a 35°C por 15 h com 3 repetições.

Levedura	Cruzamento	Etanol (g/100 ml)	D	$h(F_1-P_1)$
28098	P ₁	4,02	-	-
J132b	P ₂	3,72	-	-
E101	P ₁ x P ₂	4,95	*	23,13
E102	P ₁ x P ₂	5,22	*	29,85
E103	P ₁ x P ₂	4,94	*	28,88
E104	P ₁ x P ₂	5,56	*	38,31

Tabela 4.28 - Análise de variância dos dados da Tabela 4.27. Experimento inteiramente casualizado.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	23	133,2767	5,7946	89,56**
Linhagens (L)	5	22,7888	4,5577	70,44**
Fermentações (F)	3	92,1089	30,7030	474,54**
L x F	15	18,3790	1,2253	18,94**
Resíduos	48	3,1061	0,0647	
Totais	71	136,3828	1,9209	

Tabela 4.29 - Avaliação da produção de etanol a partir de melaço de cana das linhagens híbridas entre *S. diastaticus* e *S. uvarum* - Valores médios de 5 fermentações consecutivas em melaço de cana com 14% de ART a 35°C por 15 h com 3 repetições.

Linhagens	Cruzamentos	Etanol (g/100 ml)	D	h (%)
ATCC 28100	P ₁	6,71	-	-
ATCC 28104	P ₂	6,43	-	-
J132b	P ₃	6,59	-	-
E106	P ₁ x P ₃	6,85	*	1,94
E107	P ₂ x P ₃	6,37	n.s.	-0,93
E108	P ₂ x P ₃	6,46	n.s.	0,47
E109	P ₂ x P ₃	6,46	n.s.	0,47

Tabela 4.30 - Análise de variância dos dados da Tabela 4.29. Experimento inteiramente casualizado.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	34	4,2510	0,1250	4,39**
Linhagens (L)	6	2,6499	0,4416	15,49**
Fermentações (F)	4	0,5935	1,1484	5,21**
L x F	24	1,0076	0,0420	1,47 ^{n.s.}
Resíduos	20	1,9987	0,0285	
Totais	104	6,2497	0,0601	

Tabela 4.31 - Determinação de componentes leves e alcoóis superiores no destilado de fermentações em melão de cana dos híbridos entre *S. uvarum* (28098) e *S. diastaticus* (j132b) - Análise cromatográfica em fase gasosa, da dos em ppm.

Linhagens	Acetona	Acetal- deído	Acetato de etila	n- propanol	Iso- butanol	Iso- amilico
J132b	2,093	64,0725	18,554	16,3975	99,62	27,822
ATCC 28098	1,7235	69,2845	17,4185	9,5775	122,395	47,3445
E101	2,989	73,3470	20,3105	26,6365	108,5325	40,8520
E102	1,936	70,0845	16,3865	24,1530	147,9035	46,8970
E105	2,1085	67,1160	20,7380	25,5545	134,6195	41,8025
E104	2,0910	79,5445	24,1575	28,7305	135,0595	45,9120

A Tabela 4.32 completa os dados de compostos formados durante a fermentação. Nela podem ser observados os resultados de análise cromatográfica para os híbridos dos cruzamentos 2 e 3. E106 exibe valores de acetona, acetato de etila e n-propanol inferiores aos parentais, enquanto que as concentrações de acetaldeído, iso-butanol e álcool isoamílico foram intermediárias. Os híbridos do cruzamento 3 mostram maior produção de álcool iso-amílico, produção intermediária de n-propanol, iso-butanol e concentrações semelhantes ao parental *S. uvarum* de acetona, acetaldeído e acetato de etila.

Os híbridos E104, E106 e E107 representando as 3 ploidias dos conjugantes foram mutagenizados com brometo de etídio e isolados mutantes deficientes respiratórios (ρ^-) que foram cruzados pelo método de "rare mating" (GUNGE e NAKATOMI, 1972) novamente com a linhagem de *S. diastaticus* J132b_{ade}⁻. Destes cruzamentos foram isolados 9 híbridos, sendo 3 de cada combinação. Células destes híbridos foram medidas e os dados são mostrados na Tabela 4.23. Estes indicam que os híbridos do primeiro cruzamento são possivelmente pentaplóides e os do segundo hexaplóides. O volume dos conjugantes do cruzamento entre E107 e J132b foi menor do que o parental híbrido, mesmo apresentando nível superior de ploidia.

Estes híbridos foram também testados quanto à estabilidade meiótica através da frequência de ascos e seus

Tabela 4.32 - Determinação dos componentes leves e alcoóis superiores no destilado de fermentações em melão de cana dos híbridos entre *S. uvatum* e *S. diastaticus* (J132b) - Análise cromatográfica em fase gasosa, dados em ppm.

Linhasgens	Acetona	Acetal- deído	Acetato de etila	n- propanol	iso- butanol	iso- amílico
J132b	6,892	36,946	5,165	42,442	41,115	47,722
ATCC 28100	6,714	20,159	8,916	32,346	38,027	80,063
ATCC 28104	7,208	28,245	4,561	15,254	44,404	56,889
E106	5,078	14,679	1,570	37,569	43,356	59,356
E107	1,898	24,237	3,954	24,159	43,012	65,564
E108	5,040	20,237	-	23,670	41,724	64,125
E109	5,115	19,492	-	23,799	43,366	64,884

tipos. Os resultados presentes na Tabela 4.33 mostram que os híbridos do cruzamento E104 x J132b_{ade}⁻ apresentam frequência de esporulação superior aos produtos dos outros cruzamentos, porém, a frequência de ascos com 2 esporos é elevada em comparação com a de 4 esporos. Os híbridos do cruzamento entre E106 e J132b_{ade}⁻ apresentaram a menor frequência de esporulação, mas a maior frequência de ascos completos.

Dando continuidade as análises dos híbridos, foi realizada a avaliação da produção de etanol em melaço de cana e amido dextrinizado, cujos dados são apresentados nas Tabelas 4.34 e 4.36, respectivamente. A análise de variância destes experimentos é apresentada nas Tabelas 4.35 e 4.37 e estabelece a significância das diferenças entre linhagens e fermentações.

Na primeira pode ser observado que os híbridos E120 e E121 apresentam valores semelhantes ao parental E104, o que é confirmado pelo teste de Dunnett. Os menores valores entre os híbridos foram obtidos para E140 e E141, os quais exibiram heterose negativa em relação ao parental E106. E150 e E151 foram significativamente superiores ao parental superior, dando portanto heterose positiva.

Em amido liquefeito (Tabela 4.36) o comportamento dos híbridos quanto à produção de etanol foi inferior à

produção do parental superior. Porém, no caso dos híbridos entre E104 x J132b e E107 x J132b pode ser observado um aumento no teor de álcool obtido em relação aos parentais híbridos.

Além do etanol durante a fermentação alcoólica são produzidos outros compostos, cujos dados avaliados para as fermentações em melaço de cana destes híbridos são apresentados na Tabela 4.34. Nesta pode ser observado que E120 e E121 originados do cruzamento entre E104 e J132b, apresentam produção de acetona, iso-butanol e n-propanol superior aos parentais, e de acetaldeído, acetato de etila e álcool isoamílico semelhantes à média dos pais. Os híbridos E140 e E141 exibem concentrações de acetato de etila, n-propanol e iso-butanol inferiores a ambos os parentais; de acetaldeído e acetona semelhantes a J132b e de álcool isoamílico intermediárias entre os pais. E150 e E151 exibem teores intermediários de isobutanol, isoamílico e acetona; superiores de n-propanol e inferiores de acetaldeído e acetato de etila em relação aos parentais.

Adicionalmente foi observado um aumento elevado do grau de floculação dos híbridos com respeito aos parentais, lembrando-se que *S. diastaticus* J132b não flocula. Este efeito observado nas três linhas de cruzamento sendo mais evidente naquela que inclui o parental *S. uvarum* ATCC 28104, já

que este apresenta floculação reduzida. Este fenômeno pode ser observado nas Figuras 9 e 16 para cada linha, respectivamente.

Tabela 4.33 - Estimativa da estabilidade meiótica dos produtos do cruzamento entre híbridos (*S. diastaticus* e *S. uvarum*) e o parental *S. diastaticus* através da frequência de esporulação e de ascus com 2, 3 e 4 esporos.

Linha gem	Nº total anali- sado	Nº total de ascus	%	Nº de ascus c/ dois esporos	%	Nº de ascus c/ três esporos	%	Nº de ascus c/ quatro esporos	%
E120	990	417	42,12	276	66,19	95	22,78	46	11,03
E121	990	429	43,33	336	78,32	68	15,85	25	5,83
E140	951	259	27,23	132	50,96	59	22,78	68	26,26
E141	861	252	29,26	82	32,54	82	32,54	88	34,92
E150	1168	408	34,93	314	76,96	82	20,10	12	2,94
E151	981	439	44,75	265	60,36	129	29,38	45	10,26

Tabela 4.34 - Avaliação da produção de etanol a partir do melaço de cana das linhagens originadas dos retro cruzamentos entre híbridos (*S. diastaticus* e *S. uvarum*) e o parental *S. diastaticus* (J132b) - Valores médios de 5 fermentações consecutivas em melaço de cana com 15% de ART a 35°C por 15 h, com 3 repetições.

Linhagens	Cruzamento	Etanol (g /100 ml)	D	h (%) (F-P _{max})
J132b	P ₁	6,73	-	-
E104	H _A	7,34	-	-
E106	H _B	7,51	-	-
E107	H _C	6,70	-	-
E120	P ₁ x H _A	7,20	n.s.	-1,91
E121	P ₁ x H _A	7,32	n.s.	-0,27
E140	P ₁ x H _B	6,77	*	-9,85
E141	P ₁ x H _B	6,95	*	-7,46
E150	P ₁ x H _C	7,23	*	-7,91
E151	P ₁ x H _C	7,10	*	-5,97

Tabela 4.35 - Análise de variância dos dados da Tabela Experimentos inteiramente casualizado.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	49	25,0255	0,5107	6,53 ^{**}
Linhagens (L)	9	10,8591	1,2066	15,43 ^{**}
Fermentação (F)	4	7,2329	1,8082	23,12 ^{**}
L x F	36	6,9335	0,1981	2,53 ^{**}
Resíduos	100	7,8218	0,0782	
Totais	149	32,8473	0,2204	

Tabela 4.36 - Avaliação da produção de etanol a partir de amido liquefeito das linhagens originadas dos retro cruzamentos entre híbridos (*S. diastatii* - *cus* e *S. uvarum*) e o parental *S. diastaticus* (J132b) - Valores médios de 5 fermentações consecutivas em amido liquefeito a 15% a 35°C por 48 horas em 3 repetições.

Linhagens	Cruzamento	Etanol (g/100 ml)	D	h(%) (F-P _{max})
J132b	P ₁	3,09	-	-
E104	P ₂	2,03	-	-
E106	P ₃	1,37	-	-
E107	P ₄	1,11	-	-
E120	P ₁ x P ₂	2,29	*	-25,89
E121	P ₁ x P ₂	2,15	*	-30,42
E140	P ₁ x P ₃	1,23	*	-60,19
E141	P ₁ x P ₃	1,22	*	-60,52
E150	P ₁ x P ₄	1,93	*	-37,54
E151	P ₁ x P ₄	2,08	*	-32,69

Tabela 4.37 - Análise de variância dos dados da Tabela 4. Experimento inteiramente casualizado.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	29	62,0612	2,1400	14,91 ^{**}
Linhagens (L)	9	31,4109	3,4901	24,32 ^{**}
Fermentações (F)	2	11,4299	5,7150	39,82 ^{**}
L x F	18	19,2204	1,0678	7,44 ^{**}
Resíduos	60	8,6102	0,1435	
Totais	89	70,6714	0,7941	

Tabela 4.38 - Determinação de componentes leves e alcoóis superiores no destilado de fermentações em melão de cana dos retro cruzamentos entre os híbridos e o parental *S. diastaticus* (J132b) - Análise cromatográfica em fase aquosa, dados em ppm.

Linhagens	Acetal- deído	Acetona	Acetato de etila	N-propanol	iso- butanol	iso- amílico
J132b	47,873	4,686	18,830	46,149	42,974	44,737
E104	43,494	4,725	19,439	43,777	42,157	54,623
E106	52,506	4,963	20,737	51,129	46,449	66,256
E107	45,416	4,610	16,952	26,548	42,710	65,786
E120	41,539	4,861	18,442	46,952	45,645	47,758
E121	47,776	5,080	17,210	49,290	43,120	48,556
E140	47,728	4,614	14,904	35,665	40,782	55,177
E141	46,876	4,756	15,176	35,595	41,758	60,734
E150	43,187	5,033	9,793	53,454	44,320	51,777
E151	43,472	4,831	14,882	56,335	41,926	55,408

Fig. 14 - Flocculação em YEPD após 48 horas de crescimento dos parentais J132b(S.d); ATCC 28098 (S.v); e os híbridos E104 e E120.

Fig. 15 - Flocculação em YEPD após 48 horas de crescimento dos parentais J132b (S.d); ATCC 28100 (S.v); e os híbridos E106 e E140

Fig. 16 - Floculação em YEPD após 48 horas de crescimento dos parentais J132b (S.d); ATCC 28104 (S.v); e os híbridos E107 e E150

5. DISCUSSÃO

Devido ao número de ensaios efetuados, considerou-se necessária a discussão conjunta dos resultados e por esta razão, este capítulo foi subdividido considerando-se os objetivos do trabalho e os grupos de experimentos, quais sejam recuperação de híbridos, heterose e estabilidade genética.

5.1. Recuperação e caracterização de híbridos

Híbridos de leveduras foram obtidos por fusão de protoplastos e cruzamentos naturais sendo isolados por vários métodos fornecendo resultados que permitem a discussão como se segue:

5.1.1. Fusões com marcas naturais

A avaliação preliminar das linhagens selvagens

quanto a características naturais, permitiu a formulação de meios seletivos com base nas diferentes fontes de carbono e vitaminas para os cinco cruzamentos por fusão de protoplastos efetuados (Item 3.1).

A aplicação deste tipo de sistema seletivo para o cruzamento 1 entre as linhagens industriais 57-5 de *S. diastaticus* e C-74 de *S. cerevisiae*, permitiu a recuperação de 35 colônias híbridas confirmadas como tais, por testes adicionais em meio de amido e meio sintético sem inositol, dentre 1000 colônias isoladas do meio seletivo de regeneração (Item 4.1).

Apesar da inconsistência deste sistema seletivo para assegurar unicamente o desenvolvimento dos híbridos, podemos considerá-lo como de eficiência elevada. Isto é evidente quando comparamos estes dados com os resultados de BARNEY *et alii* (1980) obtidos para a fusão de protoplastos entre *S. diastaticus* e *S. uvarum*. Em dois experimentos separados, identificaram 31 e 105 híbridos; respectivamente, em aproximadamente 10^6 colônias testadas, pela técnica de seleção em dois meios seletivos.

No cruzamento 2, entre *S. diastaticus* (57-5) e *S. bailli* (C-4), dentre 62 isolados originalmente do meio seletivo, foi possível confirmar o estado híbrido de 3 colo-

nias através de análises realizadas posteriormente, quanto ao crescimento em meios com várias fontes de carbono e a morfologia das colônias.

Os resultados obtidos com *S. diastaticus* (57-5) e *S. bailli* (C-4), através do sistema de seleção, podem ser considerados plenamente satisfatórios, apesar de não ser disponível na literatura dados que permitam uma comparação. Apesar do crescimento residual observado, a técnica permitiu enriquecimento dos híbridos e seu isolamento a partir da análise de um número reduzido de colônias.

Já para os cruzamentos 3, 4 e 5 (Item 3.1) não foi possível o isolamento de híbridos. Mesmo quando tentativamente colônias obtidas do cruzamento 3 foram analisadas (Tabela 4.3) todos os resultados mostraram ser parentais. A ineficiência do sistema de seleção nestes casos, pode ser atribuída à ocorrência de crescimento residual das linhagens parentais, possivelmente ocasionado pela presença de quantidades mínimas de outros nutrientes no meio de regeneração, como por exemplo, outros açúcares que surgiram durante a esterilização, bem como, vitaminas disponíveis devido à lise de protoplastos durante o processo de fusão ou plaqueamento. Com o tratamento pelo PEG pequenos agrupamentos de esferoplastos se mantêm mesmo após a semeadura e por autólise suplementam aqueles viáveis. O crescimento residual foi também observado por BARNEY *et alii* (1980) quando os híbridos interespecíficos en-

tre *S. diastaticus* e *S. uvarum* foram selecionados em meio de amido como única fonte de carbono. Este problema, agravado pelo fato de serem esperadas frequências muito reduzidas para fusões intergenêricas, como as obtidas por PROVOST *et alii* (1978) para *Endomycopsis fibuligera* com *Candida tropicalis* e por STEWART (1981) para *Kluyveromyces lactis* com *Saccharomyces cerevisiae*, pode ter provocado o insucesso do sistema no caso dos cruzamentos 3, 4 e 5.

Considerando-se programas de melhoramento, desde que seja possível, o meio seletivo ideal será aquele que identifique os híbridos possuidores das características desejadas. Neste sentido, no caso de híbridos entre espécies com capacidade de fermentação de diferentes fontes de carbono, como as usadas no presente trabalho, pode ser vantajoso o isolamento com base em caracteres naturais. Um sistema semelhante ao aqui descrito foi usado por BARNEY *et alii* e CARRAU *et alii* (1982) para o isolamento de híbridos interespecíficos e intergenêricos, respectivamente, no qual aplicaram-se dois meios diferenciais contendo diferentes fontes de carbono. Os resultados do presente trabalho comparados a estes mostram vantagens importantes, pois como foi visto anteriormente, mesmo com o problema do crescimento residual das linhagens parentais foi possível o enriquecimento dos híbridos e por ser usado um meio seletivo contra ambos os parentais, tornam viáveis estudos de estabilidade, mantendo-se neste sistema as

marcas ou caracteres a serem analisados.

Os sistemas de seleção de híbridos com base em características próprias das linhagens, pode ter sua maior desvantagem por não se poder assegurar a expressão gênica de tais caracteres nos híbridos. Estes resultados podem levar à consideração errônea de que as linhagens são incompatíveis geneticamente. Este fato foi observado por nós em trabalhos preliminares de fusão entre *S. cerevisiae* e *L. starkeyi*, para os quais não foi possível a recuperação de híbridos, apesar de se ter obtido frequências elevadas de esferoplastização e terem sido analisadas aproximadamente 10^9 células.

No caso de cruzamentos envolvendo linhagens selvagens e de laboratório, uma alternativa que resolve este inconveniente foi proposta por SPENCER *et alii* (1980), onde marcas mitocondriais foram usadas na seleção contra o parental selvagem. Este método semelhante ao descrito por GUNGE e NAKATOMI (1972) para cruzamentos naturais, apresenta a vantagem de que nem todas as leveduras exibem marcas mitocondriais e de que, somente a transferência de mitocôndrias é suficiente para provocar o crescimento da linhagem selvagem, sem ter necessariamente ocorrido cariogamia.

5.1.2. Fusões com marcadores genéticos

A utilização de linhagens com marcas genéticas,

especialmente às auxotróficas, tem sido largamente aplicado devido a facilidade de isolamento dos conjugantes produtos de fusão de protoplastos. Estes recursos têm sido aplicados para cruzamentos intraespecíficos de leveduras (SOLINGEN e van der PLAAT, 1977; YAMAMOTO e FUKUI, 1977; SIPICZKI e FERENCZY, 1977; FERENCZY e MARAZ, 1977; FOURNIER *et alii*, 1977; SVOBODA, 1978; CHRISTENSEN, 1979; MARAZ e FERENCZY, 1979; RUSSELL e STEWART, 1979; e EVANS *et alii*, 1982), de fungos (FERENCZY *et alii*, 1974, 1975 e 1976; ANNE e PEBERDY, 1975 e 1976; e outros), bem como para cruzamentos interespecíficos e intergenéricos (PROVOST *et alii*, 1978; STEWART, 1981; KEVEI e PEBERDY, 1977).

Uma das vantagens da fusão de protoplastos é permitir cruzamentos entre linhagens com o mesmo tipo de reação sexual. Cruzamentos intraespecíficos envolvendo linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com reação sexual do mesmo tipo e oposta foram realizados no presente trabalho, exibindo frequências de fusão de $3,4 \times 10^{-3}$ e $8,2 \times 10^{-4}$, respectivamente, o que comprova os dados referentes à independência da fusão quanto ao tipo de reação sexual observada por MARAZ e FERENCZY (1979), já que se houvesse interferência seria esperada uma frequência muito elevada no último caso. O trabalho realizado por SVOBODA (1976) já mostrava a não aglutinação de protoplastos originados de linhagens de reação sexual oposta, e mesmo com a regeneração parcial da parede não exibiram aglutinação. O que é também confirmado pelas frequências de fusão observa-

das para os dois casos descritos.

Um problema nas fusões de protoplastos é a determinação do grau de ploidia dos conjugantes, haja visto que mais de dois protoplastos podem estar envolvidos simultaneamente no evento, como foi comprovado por ARIMA e TAKANO(1979). Além do mais, o estabelecimento da ploidia serve como confirmação de estado híbrido.

Os métodos para determinação da ploidia envolvem critérios citológicos, químicos e genéticos. No primeiro caso são destacados a contagem de cromossomos a qual é dificultada em fungos devido ao tamanho reduzido dos mesmos; a medida do volume nuclear, para a qual é necessária a sua coloração e o volume celular que possibilita uma estimativa rápida através da medição microscópica das células, devido a que tanto células de fungos, conídios, esporos e células de leveduras mostram um aumento no seu tamanho com o nível de ploidia (MANIOTIS, 1980). A validade deste método será melhor discutida no item seguinte com base em resultados obtidos com poliploides.

No caso dos cruzamentos intraespecíficos em *S. cerevisiae*, foi possível a comprovação do estado híbrido através da observação de diferenças marcantes no volume celular dos híbridos em comparação com as linhagens parentais ha

plóides conforme mostrado na Tabela 4.11, este método também foi usado com sucesso por MARAZ e FERENCZY (1979).

Como foi citado no item 4.2.2., colonias híbridas da fusão entre *Endomycopsis fibuligera* e *Saccharomyces cerevisiae* foram isolados do meio seletivo de regeneração, e testados no meio mínimo, meio completo e meio de amido. Esta caracterização permitiu estabelecer que todos os isolados exibiam complementação das marcas auxotróficas das linhagens parentais, morfologias semelhantes a *Endomycopsis* (E) com Pseudomicelios, ou a *Saccharomyces* (S) em YEPD, e que somente as colonias com morfologia (E) ou com setores apresentavam formação de halo em amido, correspondente à degradação deste carboidrato, o que mostra uma elevada correlação entre morfologia e produção de enzimas amilolíticas. Como é bem conhecido, a morfologia colonial está correlacionada com a produção de metabólitos de interesse industrial, como por exemplo, o tamanho de colonias de *Penicillium chrysogenum* com a produção de penicilina e a cor de *Streptomyces* com a produção de tetraciclina. (MALIK, 1979).

A correlação morfologia-atividade amilolítica descrita anteriormente e ilustrada nas Figuras 6-10, requer estudos adicionais já que parece indicar que os genes para a produção das enzimas amilolíticas encontram-se distribuídos no genoma de *Endomycopsis fibuligera*, de tal forma que a perda de cromossomos nos híbridos como resultado da instabi-

lidade genética influi marcadamente sobre este caráter, bem como sobre a morfologia. Neste sentido, estudos de transformação com DNA de *Endomycopsis fibuligera* (CBS 2527) parcialmente purificado pelo método de Marmur (CRYER *et alii*, 1975), introduzido em protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* (AH22 e IL102-8D) com o auxílio do PEG estão sendo desenvolvidos no Departamento de Genética (ESALQ).

5.1.3. Cruzamentos Naturais

Os cruzamentos naturais foram efetuados com o objetivo de comparar métodos de isolamento de conjugantes, eficiência de obtenção dos mesmos e a possibilidade de cruzamentos interespecíficos por esta técnica. Além disto, a estabilidade de destes híbridos pode ser comparada com os obtidos por fusão de protoplastos.

Devido à possibilidade de cruzamentos naturais, foram obtidos híbridos interespecíficos de *S. diastaticus* com *S. cerevisiae* e *S. uvarum*, também utilizados em estudos posteriores de estabilidade e heterose.

A micromanipulação é uma técnica muito utilizada em estudos genéticos de leveduras, não somente para a separação de ascosporos de ascos individuais (MORTIMER e HAWTHORNE, 1975), mas também para o isolamento de zigotos de misturas

de cruzamento. Através desta foi possível o isolamento de conjugantes da linhagem J132b_{ade}⁻ de *S. diastaticus* com linhagens de laboratório de *S. cerevisiae* e a linhagem Fl-A da mesma espécie obtida pela segregação da levedura industrial Fleishmann. Além da facilidade de isolamento oferecida pela micromanipulação, a diferença morfológica dos zigotos em relação às células permite assegurar a condição híbrida dos isolados.

A caracterização dos híbridos dos cruzamentos com linhagens de laboratório (Tabela 4.13) permitiu comprovar a complementação das marcas auxotróficas, a transferência das características de resistência mitocondrial e fundamentalmente, a expressão da capacidade de degradação de amido. Este último fato também foi observado nos híbridos envolvendo Fl-A.

Também por micromanipulação foi possível o isolamento de híbridos interespecíficos entre J132b_{ade}⁻ e as linhagens haplóide, diplóide e tetraplóide de *S. uvarum* descritos na Tabela 3.1. Um dos problemas em cruzamentos naturais e em especial no uso desta técnica de isolamento, é o aparecimento de zigotos abortivos ou mesmo as baixas frequências de zigotos poliplóides, o que reduz a possibilidade de obtenção de híbridos já que neste caso seria necessária separação de um grande número de zigotos para se ter a chance de obter algum viável. Este inconveniente surgiu nos cruzamentos envol-

vendo as linhagens J132b, 28100 e 28104, pelo que somente um híbrido foi obtido no primeiro caso.

Uma alternativa neste tipo de cruzamento, desde que as linhagens apresentem marcadores, é o isolamento de híbridos aproveitando a complementação das marcas e, desta forma, mesmo com baixas frequências de zigotos, colônias híbridas podem ser recuperadas. Este sistema foi aplicado com sucesso no cruzamento J132b_{ade}⁻ e ATCC 28104_{met}⁻; recuperando-se os híbridos em meio sintético sem estes requerimentos.

Uma outra opção para cruzamentos raros foi a técnica proposta por GUNGE e NAKATOMI (1972) com a utilização de marcas mitocondriais numa das linhagens e auxotróficas na outra. Este método permitiu no presente trabalho o isolamento de híbridos do retrocruzamento dos conjugantes E104, E106 e E107, com o parental *S. diastaticus* J132b_{ade}⁻ requerendo-se a indução de mutantes "petites" mitocondriais com brometo de etídio nos parentais híbridos. As colônias conjugantes foram assim isoladas em meio sintético com glicerol como única fonte de carbono, já que este não é fermentezível.

Como mencionado no item anterior, a medida do volume celular permite estimar o grau de ploidia. Como nas plantas superiores o volume de células uninucleadas aumenta 1,6 a 2,5 vezes com o dobro do genoma, células individuais de

fungos como gametas, conídios, esporos e células de leveduras, mostram também maior volume com o aumento no número de genomas. Tais formas gigantes foram estudadas em *Penicillium notatum* por SANSOME (1946, 1949), em *Aspergillus* por HEAGLY e ROPER (1952) e PONTECORVO *et alii* (1953) e em leveduras por LINDEGREN e LINDEGREN (1951), OGUR *et alii* (1952, 1953) e LEOPOLD (1956 a e b), os quais confirmaram a correlação volume celular e ploidia através de determinação do conteúdo de DNA e estudos genéticos. O aumento do volume celular também foi observado em linhagens com duplicações cromossômicas (PAES DE BARROS, 1977; CASE e ROPER, 1978; NIFFINEGGER-SOUZA, 1979) e em dissômicos (PIZZIRANI, 1977; GABRIELLI, 1978) de *Aspergillus nidulans*.

No presente trabalho a determinação do volume celular nos híbridos entre *S. diastaticus* e *S. uvarum* permitiu estimar a ploidia dos conjugantes pela comparação com o volume de linhagens poliplóides conhecidas de *S. uvarum* disponíveis no ATCC. Pelos dados da Tabela 4.23 pode ser observado que o volume celular da linhagem J132b de *S. diastaticus* corresponde ao de um diplóide quando comparado com ATCC28100, o que é confirmado também pelos resultados obtidos com os híbridos, já que $94,54 \mu\text{m}^3$ para o grupo H₁ corresponde ao de uma triplóide, o mesmo acontecendo com o restante, com exceção de E106 e o grupo; H_C. Estas exceções podem ser explicadas pelo fato de que em poliplóides, principalmente com ploidia eleva-

da, ocorreu grande variação de volume, influenciando possivelmente a média nestes casos.

A linhagem de *S. diastaticus* J132b é referida na literatura (ERRATT e STEWART, 1978) como haplóide e originada da linhagem industrial poliplóide 164, conclusão evidente em função dos resultados de cruzamentos e mapeamento do gene DEX 1 presente nesta linhagem. Porém, no presente trabalho todos os resultados observados quanto ao volume celular, estabilidade genética na meiose e viabilidade de esporos dos híbridos com esta linhagem, confirmam a sua condição diploide.

Todos os híbridos entre *S. uvarum* e *S. diastaticus* foram também avaliados quanto à sua capacidade de degradação de amido em placas, para comprovar a expressão desta característica. Através deste teste foi observado que todos os conjugantes formam halo em amido com a coloração de lugol, o que está associado à expressão da amiloglicosidase.

5.2. Comportamento fermentativo e heterose

Caracteres relacionados com produção, geralmente são de base genética quantitativa e para o seu melhoramento técnicas de mutação são pouco eficientes. Como opção são utilizados com sucesso métodos que envolvem a recombinação, implicando na obtenção de híbridos ou de novos arranjos gênicos.

Isto tem sido válido para plantas e animais. Em leveduras, a obtenção de híbridos e recombinantes têm mostrado acréscimos significativos de produção (THAYSEN e MORRIS, 1943; TAVARES, 1974; TAVARES, 1980 e outros). Nestes casos, como em outros organismos, foram observados ganhos devidos a heterose, o que associado a geralmente alta estabilidade dos híbridos de leveduras tornam o método muito adequado. A possibilidade de efetuar cruzamentos entre linhagens de origem diversa e mesmo, cruzamentos interespecíficos, abrem uma perspectiva adicional para o melhoramento de linhagens industriais descortinando novas possibilidades de aplicação, visto que vários metabólitos podem ser produzidos e novos substratos poderão ser utilizados com simplificação de processos e barateamento de custos. Com o objetivo de estabelecer o valor dos cruzamentos interespecíficos em leveduras, foram avaliados os híbridos obtidos entre *Saccharomyces diastaticus*, *S. cerevisiae* e *S. uvarum*, quanto aos caracteres de fermentação alcoólica de amido e melço, assim como, a produção de alcoóis superiores.

Um teste preliminar de fermentação de amido liquefeito quantificado através de queda de Brix em ensaios com as linhagens híbridas do cruzamento 1 obtidas por fusão de protoplastos entre as linhagens industriais de *S. diastaticus* (57-5) e de *S. cerevisiae* (C-74) permitiu observar que a maioria apresenta capacidade de degradação de amido inferior ao parental fermentador *S. diastaticus*, com valores próximos

à metade da capacidade do parental (Tabela 4.4). O ensaio de produção de etanol dos melhores híbridos apresentados na Tabela 4.5, mostra valores de produção inferiores ao parental 57-5 para os híbridos CD 682 e CD840 e diferenças não significativas para os quatro restantes.

A avaliação da produção de etanol a partir deste mesmo carboidrato para os híbridos obtidos por cruzamento natural entre (J132b) e (F1-A), mostrou também que os híbridos exibem valores de produção de álcool significativamente inferiores ao parental fermentador, e que estes são intermediários entre a capacidade fermentativa de ambos parentais (Tabela 4.18).

Da mesma forma, os dados referentes à redução da densidade (Tabela 4.9) indicam que os híbridos entre (57-5) e (C-4) exibem valores intermediários (DBI-14, DBI-27 e DBI-5), entre os parentais.

A importância da dose gênica na fermentação foi comprovada por HOWSHOWITZ (1979) para a degradação de maltose através da construção de diplóides e triplóides carregando um ou dois genes MAL (MAL 1, MAL 2 e MAL 6), e analisando a cinética e atividade enzimática, o que mostrou que todos os três genes exibem efeito de dosagem gênica, sendo que MAL 2 também exibe efeito de dosagem sobre a cinética de indução. O efeito de dosagem de MAL 1 e MAL 6 é aditiva enquanto o de MAL 2 decresce com o aumento da dose. Estudo semelhante com MAL 2 foi realizado por STEWART et alii (1982) com triplóides isogênicos MAL 2/mal o/mal o; MAL 2/MAL 2/mal o e MAL 2/MAL 2/MAL 2, comprovando o efeito de dosagem gênica. Um fato

semelhante também foi observado para os genes SUC. Quando foram analisados quatro diplóides isogênicos na condição heterozigota. A taxa de fermentação de sacarose a 20% (w/v) foi muito semelhante em todos os casos indicando que SUC1, SUC2, SUC3 e SUC4 produzem invertase com atividade quase idêntica. Porém, quando diplóides heterozigotas para SUC1 e cada um dos outros genes foram testados, as diferenças passaram a ser significativas (STEWART *et alii*, 1982). Com o propósito de estabelecer a importância da dose gênica na fermentação de amido de híbridos interespecíficos, foram avaliados quanto à produção de etanol os conjugantes de *S. diastaticus* (J132b) com as linhagens haplóide, diplóide e tetraplóide de *S. uvarum*. Na Tabela 4.25 podem ser observados os resultados desta análise mostrando que os híbridos apresentam capacidade de fermentação de amido inferior ao parental J132b. Nos ensaios com amido dextrinizado podem surgir situações, como neste caso, nas quais as linhagens dex⁻ apresentem valores elevados de produção de etanol. Valores elevados podem ser atribuídos à formação de açúcares de baixo peso como maltose e maltotriose em quantidades suficientemente altas, a exemplo do que acontece na maltificação onde a α -amilase produz principalmente maltose, quando atua por períodos prolongados de tempo (MAC LEOD, 1979) apesar desta dificuldade pode ser observado adicionalmente que os híbridos nos dois primeiros cruzamentos, para os quais os parentais *S. uvarum* mostraram produção elevada de etanol, exibiram teores alcoólicos inferiores aos pais não portadores de genes dex. Por outro lado, os híbridos do terceiro cruzamento mostraram ca

pacidade igual ou superior ao parental *S. uvarum*, o que pode ser atribuído à atividade de amiloglicosidase.

Para completar o estudo da dose gênica também foram avaliados em amido os híbridos obtidos entre E104, E106 e E107 por retrocruzamento com o parental *S. diastaticus* (J132b). Os resultados destes testes foram apresentados na Tabela 4.36, na qual pode ser observado que para os dois primeiros cruzamentos os híbridos não exibiram variação consistente, porém, para o último houve um pequeno aumento na produção de etanol.

Considerando que as linhagens de *S. uvarum* utilizadas são diferentes quanto à capacidade fermentativa da maltose e que associado a possível formação de açúcares de baixo peso molecular durante a dextrinização com alfa-amilase, torna-se difícil estimar o efeito de dosagem gênica para todos os casos estudados. Porém, como mostram os dados obtidos com os híbridos E107, E108 e E109, bem como, os produtos de retrocruzamento E150 e E151, é possível identificar um efeito positivo associado ao aumento da dose gênica.

Os dados até aqui discutidos, mostram que os híbridos entre *S. diastaticus*, *S. cerevisiae*, *S. uvarum* e *S. baillii* exibem menor capacidade de fermentação de amido do que os parentais fermentadores. Estes resultados estão de acordo

com os obtidos para híbridos entre *S. diastaticus* e *S. uvarum* por BARNEY *et alii* (1980) onde os híbridos exibiram capacidade de atenuação intermediária entre a dos parentais. Por outro lado, os dados apresentados por PANCHAL *et alii* (1981) mostram um aumento na capacidade de atenuação por parte dos híbridos quando comparados com os parentais. Esta discordância aparente com os dados deste trabalho, pode ser explicada pelo fato de que os valores de atenuação não medem especificamente a atividade amilolítica, mas sim, as atividades de degradação dos açúcares presentes no mosto. Desta forma, esta aparente heterose positiva pode ser realmente a atividade conjunta dos sistemas de degradação da maltose e de dextrinas, já que um período de 72 horas é muito prolongado e os dados mostram que a maltose foi complementamente degradada com 48 horas.

As causas desta redução na capacidade de degradação de amido merece estudos posteriores. Uma tentativa de explicar este fato está sendo levada a cabo no Departamento de Genética (ESALQ) através do estudo de transformantes obtidos por incorporação de DNA de *S. diastaticus* em *S. cerevisiae*. Uma hipótese que pode ser aqui levantada em vista dos resultados obtidos no presente trabalho é que a redução da capacidade fermentativa de amido nos híbridos pode ser devida à dificuldade de expressão da amiloglicosidase. A redução na atividade de transcrição dos genes não deve ser

esperada devido à composição do amido liquefeito e a ausência do sistema amilolítico nas linhagens receptoras de *Saccharomyces cerevisiae* e *S. uvarum*. Dados adicionais necessários para a confirmação desta hipótese serão o objetivo de trabalhos futuros.

Outro ponto de interesse industrial é a fermentação de sacarose na forma de melaço de cana. PANCHAL *et alii* (1982) observaram que o híbrido 1400 entre *S. diastaticus* 1384 e *S. uvarum* 21 apresentam um aumento na osmotolerância quando comparado com os parentais, o que abre um novo campo no melhoramento de leveduras para a produção de etanol a partir de mostos com alta concentração de açúcar. Com o objetivo de avaliar os possíveis ganhos quanto à fermentação de melaço de cana, os híbridos obtidos entre *S. diastaticus*, *S. cerevisiae* e *S. uvarum* foram analisados neste sistema:

Os híbridos obtidos por fusão de protoplastos entre as linhagens industriais 57-5 (Sd.) e C-74 (S.c) como pode ser observado na Tabela 4-7, exigiram produção de etanol semelhante ao melhor parental ou inferior a este, enquanto que os híbridos obtidos por cruzamento natural entre as linhagens J132b (S.d) e F1-A (S.c) exibiram heterose positiva variando entre 1,35 e 3,9% como pode ser observado na Tabela 4.20. Heterose positiva e elevada também foi observada nos híbridos do cruzamento entre J132b (s.d) e ATCC 28098

(S.c) a qual variou entre 22,88 e 38,31%. Já nos cruzamentos restantes com *S. uvarum*, somente E106 exibiu heterose positiva, enquanto os outros apresentaram diferenças não significativas.

Com o aumento do número de genomas de *S. diastaticus*, o comportamento foi diferente nos 3 grupos de híbridos, sendo que os primeiros (E120 e E121) não apresentaram diferenças significativas, E140 e E141 mostraram heterose negativa e E150 e E151 mostraram heterose positiva de 7,91 e 5,97%, respectivamente.

Os dados acima discutidos mostram que além da vantagem oferecida por este tipo de cruzamentos interespecíficos em termos de capacidade de degradação de amido, há possibilidade de aproveitar os ganhos no melhoramento para a produção de etanol a partir de sacarose. A heterose observada nestes casos possivelmente é ocasionada pela combinação dos genes SUC presentes em *S. diastaticus* e aqueles das linhagens de *S. cerevisiae* e *S. uvarum*, além dos ganhos puramente devidos à condição heterozigota.

Como outro parâmetro de importância industrial, foi avaliada no presente trabalho a produção de componentes leves, como acetona, acetaldeído e acetato de etila, e alcoóis superiores como propanol, isobutanol e isoamílico. Nas

Tabelas 4.22, 4.31, 4.32 e 4.38 foram apresentados os dados em ppm de cada composto, tanto dos híbridos quanto dos parentais, obtidos pela análise cromatográfica do destilado após fermentações em melaço de cana. Nelas pode ser observado que os híbridos apresentam diferenças elevadas e superiores aos pais, em alguns casos, como para álcool isoamílico nos híbridos E201, E202, E203, E107, E108 e E109 e para n-propanol nos híbridos E101, E102, E103, E104, E150 e E151.

Devido aos inúmeros fatores envolvidos na produção destes compostos; como a biossíntese de aminoácidos, em especial valina, leucina e isoleucina; fonte de nitrogênio e concentração deste, a condição metabólica das células e a fonte de carbono (YLANEN, 1966; AYRAPAA, 1971), a determinação dos efeitos heteróticos assim como de suas causas é dificultada. Mesmo assim, é possível nos casos citados, constatar efeitos heteróticos positivos que podem ser aproveitados em estudos posteriores quanto à natureza das alterações dos valores de heterose.

A floculação é uma característica que vem se tornando de grande importância em leveduras industriais, tanto na fabricação de cerveja, quanto atualmente na produção de álcool carburante por permitir a separação fácil de levedo, dispensando-se as centrífugas o que possibilita o desenvolvimento de sistemas de fermentação contínua ou intermiten

te em mini-destilarias. Estudos de genética e bioquímica desta característica, têm sido desenvolvidos por STEWART (1976, 1977), LEWIS (1976), RUSSELL *et alii* (1980), TAVARES (1983) e JOHNSTON (1981), indicando que vários genes estão envolvidos na floculação, e que células floculantes apresentam uma estrutura especial de parede. Nos híbridos entre J132b (S.d) e as linhagens de *S. uvarum*, assim como nos conjugantes obtidos pelo retrocruzamento, já mencionados, foi observado um aumento significativo na floculação o que é ilustrado nas Figuras 14-16. Devido a J132b (S.d) não exibir floculação, este fato pode ser atribuído a variação na composição de fomananos da parede dos híbridos, cuja influência neste caráter foi comprovada por LYONS e HOUGH (1971) e JAVATISSA e ROSE (1976), ou a fatores modificadores, já que a observação microscópica e o tratamento com EDTA mostraram que a floculação é verdadeira e não devida à não separação das células filhas.

5.3. Estabilidade genética em híbridos interespecíficos

A estabilidade genética em microrganismos industriais é um fator de grande importância pois garante a manutenção das características de interesse, o que tem levado a muitos estudos neste sentido (CHATER, 1980; GILLILAND, 1980; CALAM, 1980 e ROEDER *et alii*, 1980). Em híbridos interespecíficos e intergenéricos, os problemas de estabilida-

de são agravados, pelas diferenças no número de cromossomos entre os parentais, assim como as variações de especificidade dos centrômeros e não homologia cromossômica (PROVOST *et alii*, 1978 e STEWART, 1981).

Os híbridos do cruzamento 1 obtidos por fusão de protoplastos entre *S. cerevisiae* e *S. diastaticus*, foram esporulados e a estabilidade meiótica estimada pela frequência de ascos e seus tipos. Na Tabela 4.10 pode ser observado que somente o híbrido CD487 dentre os oito testados, apresentou um aumento na frequência de ascos com quatro esporos, mas mantendo a percentagem de esporulação semelhante ao parental *S. cerevisiae*, enquanto o restante apresentou frequências semelhantes aos parentais ou não esporularam. Já que não foi observada a formação de setores ou colônias irregulares entre os híbridos, esta variação pode ser atribuída a segregação mitótica durante as primeiras divisões após a fusão. Isto não pode ser provado neste trabalho devido ao fato de que as colônias híbridas foram transferidas da placa de regeneração onde não é possível a observação de setores.

Instabilidade mitótica elevada foi observada em cruzamentos intergenéricos por fusão de protoplastos (PROVOST *et alii*, 1978 e STEWART, 1981), ocorrendo também no presente trabalho, nos híbridos obtidos por esta técnica entre *E. fibuligera* e *S. cerevisiae*, o que pode ser ob-

servado nas Figuras 6-8, onde setores com morfologia *Saccharomyces* surgem de colonias com morfologia *Endomycopsis*. Esta instabilidade não pode ser quantificada devido à ocorrência de segregação no meio seletivo, perdendo-se durante o crescimento em meio líquido as formas *Endomycopsis* e a capacidade de degradação de amido. Uma opção nestes casos pode ser utilização de linhagens de *S. cerevisiae* com um número maior de marcas, de tal forma que seja garantida no meio seletivo a manutenção de grande parte do genoma de *Endomycopsis*, ou no caso de interesse unicamente aplicado utilizar a técnica de transformação o que está sendo realizado no momento neste laboratório.

No caso de cruzamentos interespecíficos naturais ou por fusão entre *S. cerevisiae* e *S. diastaticus* é esperado um grau elevado de estabilidade como atestam os trabalhos de ERRATT e STEWART (1978) e STEWART *et alii* (1982) a não ser instabilidade decorrente de diferentes níveis de ploidia. No caso em tela, a análise da estabilidade mitótica e meiótica foi efetuada quando possível para os híbridos de *S. diastaticus*, com *S. cerevisiae* e com *S. uvarum* obtidos por cruzamentos naturais.

A análise da estabilidade mitótica dos híbridos entre J132b (S.d) e as linhagens marcadas de *S. cerevisiae* através do método descrito no item 3 e resultados da Ta

bela 4.14, mostrou que as diferenças do número de colônias crescidas nos dois meios (seletivo e não seletivo), em todos os híbridos pertencentes a três cruzamentos, não são significativas e, portanto, não ocorre instabilidade durante a mitose. Devido à taxa menor de crescimento dos híbridos no meio mínimo, não foi possível fazer uma comparação direta para os resultados obtidos nos dois pré-tratamentos. A estabilidade também foi confirmada pela não significância do teste de homogeneidade (χ^2) realizado para o pré-tratamento em YEPD.

Por outro lado, a estimativa da estabilidade meiótica através da frequência de ascas, mostrou percentagens muito baixas de ascas completos (Tabela 4.15), o que indica instabilidade meiótica. Esta foi confirmada para os híbridos do primeiro cruzamento através de determinação da viabilidade de esporos dissecados por micromanipulação a partir de ascas completos, onde não foi observado o crescimento de nenhuma tetrade completa. Estes resultados, apoiados pelos de volume celular já discutidos no item 5.1.2, confirmam a diploidia da linhagem J132b de *S. diastaticus*. Estabilidade meiótica reduzida, também foi observada para os híbridos do cruzamento entre J132b (S.d) e Fl-A (S.c), para os quais a percentagem de ascas com 4 esporos variou entre 4,24 e 9,68%, mesmo com frequências elevadas de esporulação da ordem de 38,19 a 54,3%.

A elevada estabilidade mitótica de poliplóides de *Saccharomyces* (MANIOTIS, 1980) foi confirmada para os híbridos interespecíficos entre *S. uvarum* e J132b (s.d). Através da ausência de setores e formação de colônias regulares. Por outro lado, a ploidia interfere significativamente na estabilidade meiótica, o que pode ser observado nos dados das Tabelas 4.29 e 4.33. A maior frequência de ascos foi exibida pelo híbrido de J132b (S.d) com a linhagem diplóide ATCC 28100 (S.c) e as percentagens mais elevadas de ascos com quatro esporos, correspondeu aos híbridos com ATCC 28104, os quais são possivelmente hexaplóides ($\approx 30\%$). Já nos conjugantes obtidos por retrocruzamento, a maior estabilidade foi também observada nos hexaplóides E140 e E141, sendo que os octaplóides derivados do cruzamento entre E107 e J132b, exibiram percentagem de ascos completos menor que o parental híbrido. Estes dados apoiam também a hipótese de diploidia da linhagem parental J132b.

Os resultados acima apresentados indicam que é um fator importante no planejamento de programas de hibridização por qualquer técnica, é estabelecer o grau de ploidia adequado para se obter o maior nível de estabilidade, o que deve variar para cada caso. É importante ressaltar também que híbridos hexaplóides nos casos estudados mostraram a maior estabilidade meiótica, o que pode servir como base na escolha de linhagens para a formação de leveduras de interesse industrial.

A estimativa da estabilidade meiótica através da frequência de esporulação e de ascas com 2,3 e 4 esporos mostrou ser um método eficiente, auxiliando inclusive na determinação da ploidia.

Um problema que deve ser finalmente discutido, é que o fato da linhagem J132b de *S. diastaticus* ser diplóide impediu estabelecer a ocorrência de instabilidade meiótica nos híbridos interespecíficos, já que as variações observadas são, principalmente ou exclusivamente, devidas ao nível de ploidia, o que mascara qualquer efeito da condição híbrida. Por outro lado, possibilitou o estudo de poliplóides com número elevado de genomas de *S. diastaticus*, com estimativas do efeito de dosagem gênica na expressão do potencial de fermentações de amido e sacarose, o que se reveste de alto interesse acadêmico e aplicado.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho foi desenvolvido com a finalidade de comparar os sistemas de recuperação de híbridos obtidos por cruzamentos naturais e por fusão de protoplastos e avaliar o comportamento fermentativo e estabilidade em híbridos interespecíficos, de forma a estimar a expressão gênica de caracteres específicos de diferentes leveduras em conjugantes diversos, sua importância em futuros projetos de melhoramento e a adequação ao uso industrial. Dos resultados obtidos podem ser tiradas as seguintes conclusões:

- 1) A seleção de híbridos obtidos por fusão de protoplastos com base em caracteres naturais, mostrou-se um método eficiente em casos onde as frequências esperadas de fusão foram elevadas embora podendo ser prejudicado pelo crescimento residual.

- 2) A utilização de marcadores genéticos no isolamento de híbridos mostrou-se altamente eficiente desde que as marcas apresentam frequências muito reduzidas de reversão.
- 3) A independência da frequência de fusão com respeito ao tipo de reação sexual das linhagens parentais foi confirmada.
- 4) As técnicas de micromanipulação e cruzamentos raros ("rare mating") mostraram-se eficientes na obtenção natural de híbridos interespecíficos entre *S. diastaticus* e *S. cerevisiae*, apenas limitada pelo tipo de reação sexual dos parentais.
- 5) Os híbridos interespecíficos de *S. diastaticus* com *S. cerevisiae*, com *S. uvarum* e com *S. baillii*, exibiram capacidade de fermentação de amido, a qual foi menor do que a da linhagem parental fermentadora ou igual a esta, em todos os casos avaliados, independente da forma de obtenção e dos parentais.
- 6) Heterose positiva para fermentação de melão de cana foi observada em híbridos interespecíficos de *S. diastaticus* com *S. cerevisiae* e *S. uvarum* obtidos por cruzamentos naturais, e não naqueles obtidos por

fusão, o que pode ser atribuído a diferenças no potencial fermentativo das linhagens parentais. Este fato abre a possibilidade da utilização de cruzamentos interespecíficos no melhoramento de leveduras para a produção de etanol.

- 7) A análise de componentes leves e alcoóis superiores, pode ser usada como parâmetro na avaliação de ganhos heteróticos e na confirmação do estado híbrido.
- 8) A observação de heterose positiva para a floculação em híbridos entre *S. uvarum* (floculantes) e *S. diastaticus* (não floculantes), abre a possibilidade de aplicação destes cruzamentos no melhoramento desta característica, permitindo também estudos genéticos e bioquímicos dos fatores envolvidos no fenômeno.
- 9) A frequência de ascos e os seus tipos permite uma estimativa real da estabilidade genética durante a meiose, já que os dois parâmetros estão diretamente relacionados com o evento meiótico.

- 10) A estabilidade mitótica em híbridos interespecíficos entre *S. diastaticus* e *S. cerevisiae* é elevada, mesmo os conjugantes analisados sendo triplóides.
- 11) Grau muito elevado de instabilidade foi observado nos híbridos intergenéricos entre *Endomycopsis fibuligera* e *Saccharomyces cerevisiae*, como esperado devido a sua distância filogenética.

7. LITERATURA CITADA

- AHKONG, Q.F.; HOWELL, J.L.; LUCY, J.A.; SAFWAT, F.; DAVEY, M.R. e COCKING, E.C. 1975. Fusion of hen erythrocytes with yeast protoplasts induced by polyethylene glycol. *Nature*, London. 255:66-7.
- ALFÖLDI, L. 1981. Fusion of microbial protoplasts: problems and perspectives in Genetic Engeneering of Microorganisms for Chemicals. Ed. A. Hollaender Plenum Press. NY. pg.59-71.
- ANDERSON, E. e MARTIN, P.A. 1975. The sporulation and mating of brewing yeasts. *J. Inst. Brew.* 81:242-247.
- ANDREWS, J. e GILLILAND, R.B. 1952. Super attenuation of beer: a study of three organisms capable of causing abnormal attenuations. *J. Inst. Brew.* 58:189-196.

ANNÉ, J. e PEBERDY, J.F. 1975. Conditions for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol solutions. Arch. Microbiol. 105:201-205.

ANNÉ, J. e PEBERDY, J.F. 1976. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. J. Gen. Microbiol. 92:413-417.

ARIMA, K. e TAKANO, I. 1979. Multiple fusion of protoplasts in *Saccharomyces* Yeasts. Molec. Gen. Genetics 173:271-277.

ÄYRÄPÄÄ, T. 1971. Biosynthetic formation of higher alcohols by yeast. Dependence on the nitrogenous nutrient level of the medium. J. Inst. Brew. 77:266-275.

AZEVEDO, J.L.; TAVARES, F.C.A. e MELO CRUZ, M.R. 1978. Genetic improvement of yeasts. In: Biochemistry and Genetics of yeasts. Ed. M. Bacila, B.L. Horecker e A.O.M. Stoppani. pg. 563-575. Academic Press.

BARNETT, J.A. e PANKHURST, R.J. 1974. A new key to the yeasts. Amsterdam. North-Holland Publishing Co.

BARNEY, M.C. ; JANSEN, G.P. e J.R. HELBERT. 1980. Use of spheroplast fusion and genetic transformation to introduce dextrin utilization into *Saccharomyces uvarum*. J. Amer. Soc. Brew. Chem. 38:1-5.

- BASTIDE, M.; TRAVE, P. e BASTIDE, J.M. 1975. L'hydrolyse enzymatique de la paroi appliquée à la classification des levures. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 126A:275-294.
- BASTIDE, M.; HADJBI, E.; SCHEIBER, D.; MIEGEVILLE, M.; VERMEIL, C. e BASTIDE, J.M. 1979. Modalités de libération des protoplastes de *Saccharomyces cerevisiae*: étude en microscopie électronique à balayage. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 130A:419-433.
- BROWN, A.J.J.; SEARLE, B.A. e TUBB, R.S. 1980. The development of new techniques for the genetic manipulation of brewing yeasts. 5th Int. Symp. Yeasts, Y141.
- CALAM, C.T. 1980. The long-term storage of microbiol. cultures in industrial practice in the Stability of Industrial Organisms. Ed. B.E. Kirsop. Commonwealth Mycological Institute p. 32-38.
- CARRAU, J.L.; AZEVEDO, J.L. de; SUBBERY, P. e CAMPBELL, D. 1982. Methods for recovering fusion products among oenological strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Rev. Bras. de Genética, V:221-226.
- CHATER, K.F. 1980. Genetic instability, with special reference to industrial microorganisms in the Stability of Industrial Organisms. Ed. B.E. Kirsop. Commonwealth Mycological Institute. pg. 7-10.

- CHRISTENSEN, B.E. 1979. Somatic hybridizations in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of products of protoplasts fusion. Carlsberg Res. Commun. 14:225-233.
- CRYER, D.R.; ECCLESHALL, R. e MARMUR, J. 1975. Isolation of yeast DNA. In Methods of Cell Biology. Vol.XII. Ed. D.M. Prescott. Academic Press. NY. pg. 39-44.
- CUMMINGS, J. e FOGEL, S. 1978. Genetic homology of wive yeasts with *Saccharomyces cerevisiae*. J. Inst. Brew. 84:267-270.
- DAVIS, R. e ELVIN, P.A. 1964. The effect of β -mercaptoethanol on release of invertase and formation of protoplasts of *Saccharomyces fragilis*. Biochem. J. 93, 8p.
- EDDY, A.A. e WILLIAMSON, D.H. 1957. A method of isolating protoplasts from yeast. Nature, London 179:1252-3.
- EDDY, A.A. e WILLIAMSON, D.M. 1959. Formation of aberrant cell walls and of spores by the growing yeast protoplast. Nature, London 183:1101.
- ERRATT, J.A. e STEWART, G.G. 1978. Genetic and biochemical studies on yeast strains able to utilize dextrans. J. Am Soc. Brew. Chem. 36:151-161.
- ESSER, K. e R. KUENEN. 1967. Genetics of fungi. Springer Verlag. NY. 500p.

- EVANS, K.O.; ADENIJI, A. e Mc CLARY, D.O. 1982. Selection and fusion of auxotrophic protoplasts of *Candida albicans*. *Antonie van Leeuwenhoek* 48:169-182.
- FERENCZY, L.; KEVEI, F. e ZSOLT, J. 1974. Fusion of fungal protoplasts. *Nature, London*. 298:193-4
- FERENCZY, L.; KEVEI, F. e SZEGEDI, M. 1975. High-frequency fusion of fungal protoplasts. *Experientia* 31:1028-1030.
- FERENCZY, L.; KEVEI, F.; SZEGEDI, M.; FRANKO, A. e ROJIK, I. 1976. Factors affecting high-frequency fungal protoplast fusion. *Experientia* 32:1156-1158.
- FERENCZY, L. e MARAZ, A. 1977. Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature, London*, 268:524-525.
- FERENCZY, L. 1981. Microbial protoplast fusion. In *Genetics as a tool in Microbiology*. S.W. GLOWER and O.A. HOPWOOD Editors. Cambridge Univ. Press.
- FOURNIER, P.; PROVOST, A.; BOURGUIGNON, C. e HESLOT, H. 1977. Recombination after protoplast fusion in the yeast *Candida tropicalis*. *Arch. Microbiol.* 115:143-149.
- GABRIELLI, A.C. 1978. Estudos citogenéticos em uma linhagem deteriorada (Vg) de *Aspergillus nidulans* e seus derivados. Piracicaba, ESALQ/USP. 101p (Dissertação de Mestrado).

- GIAJA, J. 1919. Emploies des ferments dans les études de physiologie cellulaire. Le globule de levure dépouillé de sa membrane. C.R. Soc. Biol. Paris. 82:719-720.
- GILLILAND, R.B. 1980. Strain variation in brewing yeasts. in The Stability of Industrial Organisms. Ed. B.E. Kirsop. Commonwealth Mycological Institute. pg.15-19.
- GJERMANSEN, C. e SIGSGAARD, P. 1981. Construction of a hybrid brewing strain of *Saccharomyces carlsbergensis* by mating of meiotic segregants. Carlsberg Res. Commun. 46:1-11.
- GUNGE, N. e NAKATOMI, Y. 1972. Genetic mechanisms of rare mating of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* heterozygous for mating type. Genetics 70:41-58.
- HAVELKOVA, M. e MENSİK, P. 1969. The ultrastructures of the cells and the protoplasts of *Lipomyces lipofer*. Antonine van Leeuwenhoek, Vol. 35. Supplement: Yeast Symposium. B15-B16.
- HEAGY, F.C. e ROPER, J.A. 1952. Deoxyribonucleic acid content of haploids and diploid *Aspergillus* conidia. Nature, London, 170:713-714.
- HOUSSET, P.; M. NAGY e SCHNENCKE, J. 1975. Protoplasts of *Schizosaccharomyces pombe*. An improved method for their preparation and the study of their guanine uptake. J. Gen. Microbiol. 70:260-264.

- JAYATISSA, P.M. e ROSE, A.H. 1976. Role of wall phosphomannan in flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 96:165-174.
- JOHNSTON, J.R. 1981. Genetic manipulation of industrial yeasts. Proc. Int. Symp. Genet. Eng. 13-18.
- KANEKO, T.; KITAMURA, K. e YAMAMOTO, Y. 1973. Susceptibilities of yeasts to yeast cell lytic enzymes of *Arthrobacter luteus*. Agr. Biol. Chem. 37:2295-2302.
- KAO, K.N. e MICHAYLUK, M.R. 1974. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta (Berl.) 115,355-367.
- KEVEY, F. e PEBERDY, J.F. 1977. Interspecific hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplasts. J. Gen. Microbiol. 102:255.
- KITAMURA, K. e YAMAMOTO, Y. 1973. Purifications and properties of an enzyme zymoliase, with lyses viable yeast cells.
- KUO, S.C. e YAMAMOTO, S. 1975. Preparation and growth of yeast protoplasts in methods in cell biology. Vol. XI. Ed. D.M. Prescott. Academic Press.
- LEDERBERG, J. e LEDERBERG, E.M. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriology, 63:390-406.

- LEOPOLD, V. 1956a. Tetraploid inheritance in *Saccharomyces*.
J. Genet. 54:411-426.
- LEOPOLD, V. 1956b. Tetrad analysis of segregation in auto-tetraploids. J. Genet. 54:427-439.
- LEWIS, C.W.; JOHNSTON, J.R. e MARTIN, P.A. 1976. The genetics of yeast flocculation. J. Inst. Brew. 82:158-160.
- LINDEGREN, C.C. e LINDEGREN, G. 1951. Tetraploid *Saccharomyces*.
J. Gen. Bact. 5:885-893.
- LOBYREVA, L.B. 1975. Preparation of *Candida utilis* protoplasts.
Microbiology. 44:255-258.
- LODDER, J. (editor). 1970. The yeast, a taxonomic study,
second edition. Amsterdam. North Holland Publishing Co.
- LYONS, T.P. e HOUGH, J.S. 1971. Further evidence for the cross-breeding hypothesis for flocculation of brewers's yeast.
J. Inst. Brew. 77:300-305.
- MAC LEOD, A.N. 1979. The physiology of malting in brewing science. Vol. 1 - Ed. J.R.A. Pollock. Academic Press.
NY. pg.146-232.
- MALIK, V.S. 1979. Genetics of applied microbiology. Adv. in Genetics 20:37-126.

- MANIOTIS, J. 1980. Polyploidy in fungi. In Polyploidy, Biological relevance. Ed. Walter H. Lewis. Plenum Press. N.Y. pg. 163-192.
- MARAZ, A. e FERENCZY, L. 1979. Mating-type independent protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. In Protoplasts - applications in microbial genetics. Ed. J.F. Peberdy. Publishing by Univ. Nottingham.
- MELLON, R.E. 1925. Studies on microbic heredity. I. Observations on a primitive form of sexuality (zygospore formation) in the colon typhoid group. J. Bacteriology 10:481-501.
- MENDOZA, C.G. e VILLANUEVA, J.R. 1962. Production of yeast protoplasts by an enzyme preparation of *Streptomyces*. Nature, London, 195:1326.
- MORTIMER, R.K. 1958. Radiobiological and genetic studies on a poliploid series (haploid to hexaploid) of *Saccharomyces cerevisiae*. Radiation Res. 9:312-326.
- MORTIMER, R.K. e D.C. HAWTHORNE. 1969. Yeast genetics - in the yeasts - Vol. 1. Biology of yeasts. Ed. A. Rose e J.S. Harrison. Acad. Press. N.Y. pg. 386-460.
- MORTIMER, R.K. e HAWTHORNE, D.C. 1975. Genetic mapping in yeast. In. Methods in Cell Biology. Vol. XI. Ed. D.M. Prescott. Acad. Press. pg. 221-233.

MORTIMER, K. e TAVARES, F.C.A. 1976. Genetic mapping in yeast in microbiology. 1976. Ed. D. Schlessinger. Am. Soc. for Microbiology.

MOWSHOWITZ, D.B. 1979. Gene dosage effect on the synthesis of maltase in yeast. J. Bacteriology 137:1200-1207.

NECAS, O. 1971. Cell wall synthesis in yeast protoplasts. Bacteriological reviews 35:149-170.

OGUR, M.; SHINCKLER, S.; LINDEGREN, O e LINDEGREN, G.G. 1952. The nucleic acids in a polyploid series of *Saccharomyces*. Arch. Biochem. 40:175-184.

OGUR, M.; MINCKLER, S.; Mc CLARY, D.O. 1953. Desoxyribonucleic acids and the budding cycle on the yeasts. J. Bacteriology, 66:642-645.

PANCHAL, C.J.; RUSSEL, I. e STEWART, G.G. 1980. Ethanol fermentation revisited: role of genetics in an ancient art. Proc. Int. Symp. Genet. Eng. Piracicaba, pg.19-22.

PANCHAL, C.J.; PEACOCK, L. e STEWART, G.G. 1982. Increased osmotolerance of genetically modified ethanol producing strains of *Saccharomyces* sp. Biotechnology letters 4:639-644.

PEBERDY, J.F. 1979. Protoplast fusion - A new approach to interspecies genetic manipulation and breeding in fungi. In Adv. in Protoplast Research. Proc. 5th Int. Protoplast Symp. [separata].

- PIMENTEL GOMES, F. 1966. Curso de Estatística Experimental. 24.^a edição. Piracicaba. Esc. Sup. de Agr. "Luiz de Queiroz", USP. 384p.
- PIZZIRANI, A.A. 1977. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ-USP, 111p (Dissertação de Mestrado).
- POMPER, S.; DANIELS, K.M.; Mc KEE, D.N. 1954. Genetic analysis of poliploid yeast. *Genetics* 39:343-355.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; Mc DONALD, K.D. e BUFTON, A.W.J. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. in Genetics* 5:141-238.
- PROVOST, A.; BOURGUIGNON, C.; FOURNIER, P.; RIBET, A.M. e HESLOT, H. 1978. Intergenic hybridization in yeasts through protoplast fusion. *FEMS Microbiology Letters*. 3:309-312.
- ROEDER, G.S.; FARABAUGH, P.J. ; CHALEFF, D.T. e FINK, G.R. 1980. The origins of gene instability in yeast. *Science*, 209:1375-1384.
- RUSSEL, I. e STEWART, G.G. 1979. Spheroplast fusion of Brewer's yeast strains. *J. Inst. Brew.* 85:95-98.
- RUSSELL, I.; STEWART, G.G.; READER, H.P.; JOHNSTON, J.R. e MARTIN, P.A. 1980. Revised nomenclature of genes that control yeast flocculation. *J. Inst. Brew.*, 86:120-121

- RUSSELL, I. e STEWART, G.G. 1980. Transformation of maltotriose uptake ability into a haploid strain of *Saccharomyces* sp. J. Inst. Brew., 86:55-59.
- SAKAI, K. e TAKAHASHI, T. 1973. Estimation of ploidies in brewing yeasts. J. Inst. Brew. 79:534.
- SANSOME, E.R. 1946. Induction of gigas forms of *Penicillium notatum* by treatment with camphor vapours. Nature, London, 157:843.
- SANSOME, E.R. 1949. Spontaneous mutation in standard and "gigas" forms of *Penicillium notatum* strain 1249 B21. Transact. Brit. Mycol. Soc. 32:305-314.
- SCHWENCKE, J.; GONZALEZ, G. e FARIAS, G. 1969. A rapid and reproducible method for obtaining yeast protoplasts. J. Inst. Brew. 75:15-19.
- SEARLE, B.A. e TUBB, R.S. 1981. Regulation of amyloglicosidase production by *Saccharomyces diastaticus*. J. Inst. Brew. 87:244-247.
- SILLS, A.M. e STEWART, G.G. 1982. Production of amylolytic enzymes by several yeast species. J. Inst. Brew. 88:313-316.
- SIPICZKI, M. e FERENCZY, L. 1977. Protoplast of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating-type. Mol. Gen. Genetics 151:77-81.

SIPICZKI, M.; KUCSERA, J.; ULASZEWSKI, S. e ZSOLT, J. 1982.

Hybridization studies by crossing and protoplast fusion within the genus *Schizosaccharomyces* Lindner. J. Gen. Microbiol. 128(9):1989-2000.

SMITH, W.E. 1944. Observations indicating a sexual mode of reproduction in a common bacterium (*Bacteroides funduliformis*). J. Bacteriology. 47:417-418.

SNOW, R. 1966. An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic "Nystatin". Nature, London, 9:211-212.

STEEL, R.G.D. e TORRIE, J.H. 1960. Principles and procedures of statistics - with special reference to the biological sciences. Mc Graw-Hill Book Co. Inc.

SPENCER, J.F.T. e SPENCER, D.M. 1977. Hybridization of non-sporulating and weakly sporulating strains of brewer's and distillers yeast. J. Inst. Brew. 83:287-289.

SPENCER, T.; LAUD, P. e SPENCER, D.M. 1980. The use of mitochondrial mutants in the isolation of hybrids involving industrial yeast strains. Mol. Gen. Genetics, 178:651-654.

SOLS, A.; GANCEDO, C. e DELAFUENTE, G. 1971. Energy - Yielding metabolism in yeasts. In The Yeast - Vol. 2. Physiology and Biochemistry of Yeasts. Ed. A.H. Rose e J.S. Harrison. Academic Press. N.Y. pg. 271-307.

- STEPHEN, E.R. e NASIM, A. 1981. Production of protoplasts in different yeasts by mutanase. *Can. J. Microbiol.* 27:550-553.
- STEWART, G.G.; GARRISON, I.F.; GORING, T.E.; HELEG, M.; PIPASTS, P. e RUSSELL, I. 1976. Biochemical and genetic studies on yeast flocculation. *Kemia Kemi* 10:465-479.
- STEWART, G.G. e RUSSELL, I. 1977. The identification, characterization and mapping of a gene for flocculation in *Saccharomyces* sp. *Can. J. Microbiol.* 23:441-447.
- STEWART, G.G. 1981. The genetic manipulation of industrial yeast strains. *Can. J. Microbiology*, 27:973-990.
- STEWART, G.G.; PANCHAL, C.J.; RUSSELL, I. e SILLS, A.M. 1982. Advances in ethanol from sugars and starch. Royal Society of Canada's International Symposium of Ethanol from Biomass. Winnipeg, Canada.
- STREIBLOVA, E. 1968. Surface structure of yeast protoplasts. *J. Bacteriology* 95:700-707.
- SVIHLA, G.; SCHLENK, F. e DAINKO, J.L. 1961. Spheroplasts of the yeast *Candida utilis*. *J. Bacteriology* 82, 808.
- SVOBODA, A. 1966. Regeneration of yeast protoplasts in agar gels. *Exp. Cell. Res.* 44:640.
- SVOBODA, A. 1976. Mating reaction in yeast protoplasts. *Arch. Microbiol.* 110:313-318.

- SVOBODA, A. 1978. Fusion of yeast protoplasts induced by polyethylene glycol. J. Gen. Microbiol., 109:169-175.
- TAMAKI, H. 1978. Genetic studies of ability to ferment starch in *Saccharomyces*: gene polymorphism. Mol. Gen. Genet. 164: 205-209.
- TAVARES, F.C.A. 1974. Genetic improvement of *Saccharomyces carlsbergensis* for single cell protein production. Genetics of Industrial Microorganisms, 11nd International Symposium- Abstracts p. 97.
- TAVARES, F.C.A. 1980. Microbial breeding in Brazil: yeast breeding for ethanol production. Proc. 2th Japan-Brazil. Symp. on Science and Technology. pg.185-189.
- TAVARES, F.C.A. 1981. Genetic engineering for ethanol production. Proc. Int. Symp. Genet. Eng. 3-6. Piracicaba.
- TAVARES, F.C.A. 1983. Melhoramento de leveduras floculantes para a produção de etanol. Anais da X Reunião Anual de Genética de Microrganismos. Caxias do Sul (em impressão).
- THAYSEN, A.C. e MORRIS, M. 1943. Preparation of a giant strain of *Torulopsis utilis*. Nature, London, 152:526-528.
- TUBB, R.S. 1979. Applying yeast genetics in brewing. A.Current Assessment. J. Inst. Brew. 85:286-289.