**ANÁLISE DOS EFEITOS GENÉTICOS DA PROPRIEDADE “VELOCIDADE
MÁXIMA DE CRESCIMENTO EM *Saccharomyces cerevisiae*”**

CARMO AUGUSTO LARA POLONI

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **FLAVIO CESAR ALMEIDA TAVARES**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Microbiologia
Agrícola.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Dezembro - 2004

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Poloni, Carmo Augusto Lara
Análise dos efeitos genéticos da propriedade "velocidade máxima de crescimento
em *Saccharomyces cerevisiae*" / Carmo Augusto Lara Poloni. -- Piracicaba, 2004.
72p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.
Bibliografia.

1.Epistasia 2. Genética quantitativa 3.Leveduras. 4.Meiose 5. Proteínas I. Título

CDD 589.23

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus Pais, irmãos e à minha Avó Eunice,

Dedico.

A Deus, Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Nesta oportunidade, reitero meus sinceros agradecimentos, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta obra, em especial:

Prof. Dr. Flavio César Almeida Tavares, pela oportunidade.

Prof. Dr. Márcio Rodrigues Lambais, pela participação na banca de qualificação.

Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani Kleiner, pela participação na banca de qualificação.

Dr. Luiz Humberto Gomes, pela participação na banca de qualificação e da defesa.

Prof. Dr. Roland Vencovsky, pelo valioso auxílio intelectual.

Prof. Dr. José Roberto Moro, pela participação na banca de defesa.

Dra. Keila Maria Roncato Duarte.

Ana Maria Brancalion Giacomeli, pelo apoio técnico e amizade.

Aos Amigos; Jupará, Gaúcho, Polé, Dani, Sarita, Varegêra e Alessandra Pupin.

À secretaria do PPG-Microbiologia Agrícola, em especial à Sarah e Giovanna.

À CAPES e ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

À Maria Lúcia, pelo Amor, compreensão e companheirismo em todas as horas.

Aos “Irmãos” das Repúblicas USPior e K-Labouço.

E finalmente, a Luiz Vicente de Souza Queiroz, pela idealização e incorporação de uma utopia chamada ESALQ.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 Meios de Cultura.....	10
3.1.1 Meio completo sólido (YEPD).....	10
3.1.2 Meio de esporulação (Rafinose Enriquecida).....	10
3.1.3 Meio completo líquido (YEPD).....	11
3.2 Soluções.....	11
3.2.1 Solução Tampão da enzima lítica.....	11
3.2.2 Solução de rompimento dos ascósporos.....	11
3.3 Linhagens utilizadas.....	12
3.4 Métodos.....	13
3.4.1 Metodologia para a síntese do material biológico.....	13
3.4.1.1 Esporulação das linhagens diplóides e isolamento das linhagens haplóides.....	14
3.4.1.2 Determinação da reação sexual das linhagens segregantes haplóides.....	15

3.4.1.3 A síntese do híbrido HCPA-VI.....	16
3.4.1.4 Síntese dos híbridos de retrocruzamentos.....	17
3.4.2 Método para a determinação da velocidade máxima de crescimento.....	18
3.4.2.1 Preparo do inóculo padronizado.....	18
3.4.2.2 Ensaios de crescimento.....	19
3.4.2.3 Cálculo da velocidade máxima de crescimento.....	19
3.4.3 Abordagem biométrica do caráter analisado.....	20
3.4.3.1 Abordagem simplificada dos componentes da variação fenotípica.....	21
4.3.2 Origem quantitativa dos componentes da variação fenotípica.....	22
4.4 Delineamento Experimental e Modelos Estatísticos.....	23
4.4.1 Modelo geral para o caráter quantitativo.....	24
4.4.2 Modelo decomposto para o caráter quantitativo.....	24
4.4.3 Decomposição da variância genética.....	27
4.4.3.1 Determinação das variâncias genéticas em haplóides.....	28
4.4.3.1.1 Determinação da variância genética total em haplóides.....	28
4.4.3.1.2 Determinação da variância genética epistática em haplóides do tipo aditiva por aditiva em haplóides.....	28
4.4.3.1.3 Determinação da variância genética aditiva em haplóides.....	29
4.4.3.2 Determinação das variâncias genéticas em diplóides.....	29
4.4.3.2.1 Determinação da variância genética dominante em diplóides.....	29
4.4.3.2.2 Determinação da variância genética aditiva em diplóides.....	29
4.4.3.2.3 Determinação do Grau Médio de Dominância.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Análise de variação entre todas as linhagens utilizadas.....	32
4.2 Contraste entre os graus de ploidia.....	34
4.2.1 Nível de ploidia 1, Haplóides Segregantes de HCPA-VI.....	36
4.2.1.1 Estimativas dos parâmetros genéticos nas linhagens haplóides.....	38
4.2.1.1.1 Estimativa da variância genética epistática (σ^2_{AAH}), do tipo aditiva por aditiva, nas linhagens haplóides segregantes do híbrido HCPA.....	38

4.2.1.1.2 Estimativa da variância genética aditiva (σ^2_{AH}) nas linhagens haplóides segregantes do híbrido HCPA-VI	39
4.2.2 Nível de ploidia 2, Diplóides (retrocruzamentos de HCPA-VI)	40
4.2.2.1 Estimativa dos parâmetros genéticos nas linhagens diplóides (híbridos de retrocruzamentos)	43
4.2.2.1.1 Estimativa da variância genética dominante (σ^2_{AAH}) nas linhagens diplóides híbridas de retrocruzamentos	43
4.2.2.1.2 Estimativa da variância genética aditiva (σ^2_A) nas linhagens diplóides híbridas de retrocruzamentos	44
4.2.2.1.3 Estimativa do Grau Médio de Dominância (GMD) nas linhagens diplóides híbridas de retrocruzamentos	44
5 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
APÊNDICES	52

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Micromanipulador de células utilizado	14
2 Placa de ascos micromanipulados.....	15
3 Morfologia dos zigotos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
4 Esquema geral do material biológico sintetizado	17
5 Conjunto de genótipos aparentados utilizados no estudo do caráter quantitativo	22
6 Origem quantitativa dos efeitos genéticos.....	23

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Análise de variância, em blocos ao acaso, seus fatores de variação e as respectivas esperanças dos quadrados médios (E(QM)).....	26
2 Análise de variância, em blocos ao acaso das linhagens diplóides (linhagens retrocruzadas).....	27
3 Linhagens parentais, o híbrido HCPA-VI e suas linhagens segregantes haplóides, os híbridos de retrocruzamentos e as linhagens testemunhas.....	33
4 Análise de variância e de decomposição genotípica do fator de variação "Linhagens" em "Haplóides" e em "Diplóides" em seus respectivos ascos.....	34
5 Análise de variância e decomposição genotípica do fator de variação "Linhagens" em "Haplóides" em seus respectivos ascos.....	36

6	Análise de variância e decomposição das linhagens em "Diplóides" (os híbridos de retrocruzamentos) e seus ascos participantes.....	41
7	Análise de variância parcial envolvendo as linhagens diplóides, nas decomposições do fator "Diplóides"	42

ANÁLISE DOS EFEITOS GENÉTICOS DA PROPRIEDADE “VELOCIDADE MÁXIMA DE CRESCIMENTO EM *Saccharomyces cerevisiae*”

Autor: CARMO AUGUSTO LARA POLONI

Orientador: Prof. Dr. FLAVIO C.A. TAVARES

RESUMO

Os efeitos epistáticos recentemente vêm sendo objeto de atenção como resultado de estudos moleculares demonstrando a interação de vários genes cooperativamente nos metabolomas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Tratando-se de um microrganismo de importância industrial e modelo na pesquisa celular, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* favorece os estudos genéticos quantitativos em análises nas condições haplóide e diplóide. Neste trabalho, foi estudado o caráter genético quantitativo "Velocidade máxima de crescimento" da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foram utilizadas 47 linhagens, entre linhagens parentais, testemunhas, híbridos e segregantes, em experimentos planejados para obter estimativas dos componentes da variação gênica. Os efeitos aditivos corresponderam a 55,14 % da variação gênica total nas linhagens haplóides e a 66,80 % de toda a variação nas linhagens diplóides,

enquanto o efeito de dominância estimado nas linhagens diplóides representou 33,20 % da variação. Nas linhagens haplóides, foi também estimada a ação gênica epistática, do tipo aditiva por aditiva, correspondendo a 44,86% da variação total, valor de maior magnitude do que o encontrado previamente para o caráter “Produção de etanol” pelo mesmo microrganismo.

**GENETIC EFFECTS OF THE PROPERTY “MAXIMUM GROWTH RATE IN
Saccharomyces cerevisiae”**

AUTHOR: CARMO AUGUSTO LARA POLONI

ADVISER: Prof. Dr. FLAVIO C.A. TAVARES

SUMMARY

The inheritance of a quantitative character is classically identified as due to additive, dominant and epistatic effects. For many reasons in plant and animal studies the epistatic effects are considered negligible mainly for breeding purposes. *Saccharomyces cerevisiae* offers the opportunity to study quantitative characters both in haploid and diploid conditions of isogenic lines which is an advantage compared to plants and animal studies. With the aim to compare results to previous studies of a more simple genetic trait the maximum growth rate of *Saccharomyces cerevisiae* was studied. The results indicate a comparable genetic effect for the estimates for additive, dominant and epistatic genic action. The estimates were respectively 55,14 % of additive effects for haploids and 66,80 % in diploids. Dominant effects in diploid were estimated to represent 33,20 % of genetic variance. In the haploid condition the epistatic effects were 44,86% of total genetic variance, which suggest to pay more attention to this kind of genetic effect.

1 INTRODUÇÃO

Existem poucos relatos sobre o estudo da base genética da produção envolvendo microrganismos, principalmente no que tange à expressão de caracteres quantitativos.

Ao contrário, em plantas e animais este estudo é imprescindível, principalmente levando-se em conta a aplicação no melhoramento genético. Neste sentido, inúmeros trabalhos foram feitos para estimar os efeitos genéticos envolvidos na herança de um caráter quantitativo, os quais são discriminados biometricamente como resultado das ações gênicas aditivas, dominantes e de interações intergênicas ou epistáticas.

Historicamente, o estudo dos caracteres quantitativos teve maior aplicação nas plantas e animais, contemplando com maior importância os efeitos genéticos de aditividade e de dominância.

Por esses e outros motivos, pouca importância foi associada aos efeitos epistáticos no estabelecimento dos princípios e metodologias desenvolvidos para o melhoramento genético.

Na literatura especializada verifica-se que os efeitos epistáticos podem ser desconsiderados por representar uma fração desprezível de toda a variação herdável, dando-se maior importância aos efeitos genéticos aditivos. Este fato não quer dizer que a interação gênica não alélica não seja importante para os indivíduos e de fato, atualmente a literatura sobre expressão gênica registra que tanto monogenes como rotas metabólicas, envolvem a expressão conjunta e coordenada de vários genes não alelos.

Ou seja, os estudos moleculares estão indicando outra forma de avaliar a interação de diversos genes na expressão dos caracteres e propriedades, sejam de

importância econômica ou não, o que é relevante para o entendimento da base genética dos caracteres quantitativos nos diferentes organismos.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido o microrganismo preferencialmente utilizado neste para estes estudos de alta relevância genética e fisiológica.

Contudo, os estudos moleculares que revelam os metabolomas embora reconhecendo e destacando a importância da epistasia, fazem pouca referência e nenhuma associação aos conhecimentos acumulados em plantas e animais e vice-versa.

Neste contexto, o presente trabalho utiliza um caráter que reflete a manifestação global dos genes envolvidos no metabolismo e retoma estudos feitos previamente sobre o caráter quantitativo “Produção de etanol” na levedura.

Com este objetivo, estudou-se o caráter quantitativo "Velocidade máxima de crescimento" da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, propriedade esta identificada como fundamental para a produtividade nas fermentações industriais.

Há grande vantagem em utilizar este microrganismo por viabilizar a análise de caracteres quantitativos nas condições haplóide e diplóide. Na condição haplóide, excluem-se das análises, as múltiplas interações alélicas que comumente confundem as estimativas dos efeitos genéticos em análises de caracteres quantitativos em organismos diplóides, como as plantas e animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A Genética Quantitativa microbiana é relativamente pouco conhecida e Caten & Jinks (1976), justificaram este fato alegando a íntima associação do desenvolvimento da genética quantitativa com o melhoramento animal e vegetal e à necessidade de sistemas meióticos para o estudo dos caracteres de variação contínua, ou quantitativos.

De fato, a maioria das espécies microbianas não possui sistemas meióticos desenvolvidos e também, no seu melhoramento genético, preferencialmente se utilizaram métodos como a mutação induzida, seguida de seleção. Embora, utilizando-se de metodologias diferentes, observaram ainda Caten & Jinks (1976) que o melhoramento de organismos superiores possui métodos que podem prontamente ser adaptados ao melhoramento genético de microrganismos.

Em plantas e animais, os estudos sobre as bases genéticas de caracteres quantitativos são imprescindíveis ao melhoramento genético, observando-se que atualmente, ganham cada vez maior relevância os recursos da análise genética molecular para auxiliar os trabalhos de melhoramento genético. Destaca-se neste sentido o uso de marcadores moleculares e técnicas de identificação de seqüências genômicas de interesse relacionados aos caracteres em estudo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A variação contínua de um caráter quantitativo é caracterizada estatisticamente por parâmetros biométricos (médias, variâncias, covariâncias, correlações, etc.), que refletem as propriedades genéticas do componente herdável da variação.

Classicamente os efeitos genéticos envolvidos na herança de um caráter quantitativo são discriminados como resultado das ações gênicas aditivas, dominantes e de interações gênicas entre estas, também conhecidas por ações gênicas epistáticas (Mather & Jinks, 1984). Deste modo, são obtidas informações relativas aos efeitos médios dos genes envolvidos nessa variação contínua.

As estimativas dos parâmetros estatísticos são obtidas a partir da relação entre os valores esperados, com os valores observados nos dados experimentais (Falconer, 1976 ; Caten & Jinks, 1976 ; Mather & Jinks, 1984).

A idéia de Fischer da decomposição da variância entre as várias causas da variação tem sido de grande utilidade para o entendimento da genética quantitativa.

Comstock & Robinson (1952) firmaram considerações necessárias para alcançarem as interpretações genéticas através do estudo dos componentes da variância.

Estas considerações são a condição diplóide com meiose regular, frequência gênica igual a 1/2, ausência de alelismo múltiplo, ausência de ligação dos genes afetando o caráter (se esta existir, deverá haver equilíbrio das fases de associação e repulsão desses genes) e ausência de epistasia.

Os mesmos autores ainda fizeram considerações com relação às derivações das esperanças dos quadrados médios, a ocorrência de cruzamentos ao acaso, distribuição randômica dos genótipos no meio e a não ocorrência de efeito maternal.

No entanto, para Caten & Jinks (1976), as considerações relacionadas por Comstock & Robinson (1952) impedem a aplicação de conceitos e princípios de genética quantitativa e de biometria em muitos microrganismos, em especial, às espécies haplóides e sem reprodução sexual, pois os modelos disponíveis para determinação dos efeitos genéticos envolvidos na variação dos caracteres quantitativos são aqueles desenvolvidos para estudos em plantas e animais, sendo os mesmos exclusivamente desenvolvidos para organismos diplóides e, portanto, considerando os efeitos de dominância e desconsiderando os efeitos epistáticos.

O estudo de caracteres quantitativos em plantas e animais, devido às limitações experimentais e dificuldades de mensuração prática, fizeram com que no melhoramento genético pouca importância fosse dada aos efeitos epistáticos, verificando Frankel &

Schork, (1996) que na literatura da época não eram encontradas mais do que dez publicações sobre o tema.

Os efeitos epistáticos são geralmente estimados como um resíduo na análise da variância, após a separação do que se considerem os efeitos genéticos principais (Brewbaker, 1964).

Com relação aos estudos clássicos em caracteres quantitativos realizadas em organismos eucariotos, em sua maioria em plantas e animais (Allard, 1960 ; Falconer, 1976), revelam segundo as metodologias e modelos estatísticos utilizados que o componente de variação do tipo epistático vem sendo considerado como desprezível, devido às dificuldades em estimá-las, ou assumindo-se as limitações do modelo (Comstock & Robinson, 1952). Sobre o assunto, Falconer (1960) escreveu: “a natureza complexa das interações, como sempre, não nos interessam, pois no valor genotípico agregado, as interações de todos os tipos são tratadas conjuntamente como um simples desvio de interação”.

Também, como complementa Brewbaker (1964): "as interações não-alélicas apresentam-se como uma complicação na análise da herança quantitativa, sendo o seu papel de difícil avaliação. É provável, no entanto, que elas raras vezes sejam suficientemente importantes para causarem um erro sério nos cálculos, quando desprezadas. As variâncias epistáticas são em geral, ignoradas nas análises, pois elas contribuem muito pouco para a variância".

Entretanto, as opiniões sobre a relevância dos processos epistáticos não são unânimes. Allard (1960) revela: “seria mesmo de surpreender se muitos dos caracteres que interessam ao melhorista não tivessem sua base material em sistemas com reação do tipo epistática. Muitos deles, sem dúvida, são bastante complexos e mesmo que possa ser interessante especular a respeito de sua base bioquímica, tal especulação provavelmente não seria conclusiva atualmente”.

Como nos estudos realizados em plantas e animais nem sempre os efeitos da ação gênica podem ser discriminados sem confundimento, e porque os caracteres estão sob forte influência ambiental devido ao tempo de exposição dos organismos aos efeitos ambientais diversos (Caten & Jinks, 1976 ; Falconer, 1976), a importância dada à

epistasia é resumida por Hallauer (1981) como sendo “uma descrição puramente estatística não definindo uma função fisiológica ou de expressão, sendo uma partição ortogonal da interação inter-alélica, podendo ser desconsiderada sem prejuízos aos progressos de seleção”.

Em uma interessante discussão sobre o tema, Frankel & Schork (1996) ilustram a complexidade do assunto e o modo como as definições sobre epistasia não permitem um delineamento sobre o tema. Os mesmos autores apontam as dificuldades de estimação dos efeitos epistáticos e à necessidade de maiores discussões sobre as variadas e obscuras interações intergênicas, como os fatores pelos quais os processos epistáticos venham sendo excluídos dos estudos de análise genética.

Mais recentemente, Wolf (2000) comenta em seu trabalho que determinadas combinações genótípicas podem resultar em efeitos fenotípicos sinérgicos favoráveis à evolução biológica, relatando que a epistasia também deve ser considerada como um processo relacionado aos processos evolutivos. Também sobre efeitos sinérgicos, na mesma época, Wloch (2001) demonstrou que os efeitos sinérgicos ocasionados pelas epistasias também podem resultar em efeitos fenotípicos negativos. Este autor observou que a progênie de um cruzamento entre duas linhagens portadoras de mutações deletérias da levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresentou interação negativa para o fenótipo estudado, demonstrando que as mutações deletérias dos parentais interagiram entre-si negativamente no descendente F1.

O alcance das manifestações genéticas causadas pelas epistasias pôde também ser observado por Martin (2002), apontando as epistasias contribuindo para um processo de maior resistência à infecção pelo vírus da aids em função de ativações gênicas quando determinadas combinações alélicas foram constituídas em suas pesquisas.

Com a finalidade de investigar a magnitude dos efeitos genéticos presentes em um caráter quantitativo em microrganismos, Kido (1990) associou os princípios da genética quantitativa às características particulares que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* disponibiliza aos estudos genéticos, e assim detectou a manifestação de interações epistáticas correspondente a 33,80 % de toda a variação gênica observada na expressão do caráter quantitativo “Produção de etanol”.

As investigações genéticas em leveduras iniciaram-se com Winge, em meados da década de trinta. Aproximadamente dez anos depois, Lindegren também deu início a destacados estudos genéticos em leveduras (Rose, 1969). Estes dois grupos de pesquisa, liderados pelos pesquisadores supracitados, foram os responsáveis pelas descobertas dos princípios gerais e por grande parte das metodologias básicas estabelecidas para genética em leveduras (Rose, 1969).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* constitui-se em um organismo eucariótico experimental por excelência e modelo de célula eucariótica (Rose, 1969), apresentando seu genoma inteiramente seqüenciado, genoma funcional com 1.739 genes funcionais determinados (Gavin et al, 2002), presença de ciclo sexual, fase haplóide e diplóide estáveis, sistema de recombinação meiótica, recuperação dos genótipos em proporções determinadas, possibilitando o estudo dos produtos meióticos (análise de tétrades) com a expressão de seus respectivos genótipos (Jeffrey, 1981).

Estas propriedades possibilitam que análises de caracteres de variação contínua em *Saccharomyces cerevisiae* sejam realizadas associadas às análises de tétrades. Este recurso de análise genética permite estudar os caracteres quantitativos de forma mais completa e precisa sem a perda de informações entre as gerações, permitindo obter informações impossíveis de serem obtidas atualmente em investigações dessa ordem envolvendo plantas e animais, devido à impossibilidade de análise dos produtos meióticos, como se faz na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Suzuki & Griffiths, 1992).

Embora as condições, haplóide e diplóide, permitam o estudo de propriedades genéticas com precisão, o que historicamente fez da levedura *Saccharomyces cerevisiae* um dos mais importantes organismos para estudos genéticos (Rose, 1969), pouco ainda se conhece a respeito de caracteres quantitativos na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que os estudos genéticos em leveduras são, em grande parte, restritos aos caracteres governados por um ou poucos genes.

No entanto, os estudos sobre biologia molecular vêm sendo desenvolvidos utilizando-se, preferencialmente, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como material

biológico de estudo. Gavin et al. (2002) realizaram um importante trabalho nesse sentido, concluindo o metaboloma da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Os metabolomas constituem-se no entendimento do metabolismo das vias e rotas bioquímicas envolvidas nos diferentes processos fisiológicos da biologia celular. Os estudos dos metabolomas referem-se aos estudos de expressão conjunta de proteínas relacionadas a um dado complexo gênico em expressão por um sistema celular em um dado momento ou circunstância. Estudos dessa ordem vêm colaborando na elucidação dos processos de interação gênica, pois permitem uma análise da expressão conjunta de um determinado complexo gênico em um determinado instante.

As análises proteômicas em larga escala, envolvendo uma grande quantidade de produtos gênicos, tornaram-se viáveis a partir do desenvolvimento de novas metodologias utilizadas para a determinação de proteínas. A metodologia de determinação proteica por espectrometria de massa permite a identificação de proteínas em larga escala. Os dados obtidos pelo espectrômetro de massa são comparados em um banco de dados e então as proteínas são identificadas e relacionadas aos seus genes correspondentes.

Gavin et al (2002) concluíram o metaboloma da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, resultando no processamento de 1.739 genes em 589 conjuntos protéicos identificados. Análises de bioinformática destes conjuntos definiram 232 complexos protéicos distintos e foram também propostas novas funções celulares para 344 proteínas, incluindo 231 proteínas sem função previamente determinadas.

Assim, os estudos moleculares estão indicando outra forma de avaliar a interação de diversos genes na expressão dos caracteres e propriedades, o que é relevante para o entendimento da base genética dos caracteres quantitativos nos diferentes organismos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A realização deste estudo foi idealizada contemplando-se o trabalho com um caráter quantitativo que tivesse como propriedade o fato de ser governado pelo maior número de genes possível

Ou seja, que o caráter quantitativo tivesse uma base genética ampla, intuitivamente acreditando que na determinação deste caráter, o maior número de interações gênicas estivessem presentes e também, que a sua expressão fosse um reflexo direto de eficiência nos processos de expressão gênica.

Monod (1949), aponta o caráter quantitativo "Velocidade máxima de crescimento" encerrando em si, toda a complexidade das atividades do ciclo celular, envolvendo a divisão mitótica e as funções de síntese energética, transporte de nutrientes e todas as etapas envolvidas na fisiologia celular de uma célula eucariótica, podendo ser estudado quantitativamente.

Foram ainda considerados para essa escolha, os fatores operacionais favoráveis à condução dos ensaios de crescimento, uma vez considerado o número elevado de tratamentos avaliados em conjunto.

3.1 Meios de cultura

3.1.1 Meio completo sólido (YEPD)

- Extrato de levedura _____ 1,0%
- Peptona _____ 1,0%
- Dextrose _____ 2,0%
- Agar _____ 2,0%
- Água destilada _____ completar para 1000 mL

O meio de cultura descrito acima é utilizado para a manutenção das culturas, realização dos cruzamentos e isolamento dos híbridos ou segregantes micromanipulados.

3.1.2 Meio de esporulação (rafinose enriquecida)

- Acetato de potássio _____ 1,0 %
- Extrato de levedura _____ 0,1 %
- Glicose _____ 0,05 %
- Ágar _____ 2,0 %
- Água destilada _____ completar para 1000 mL

Meio indutor de esporulação das linhagens diplóides (2n) para a obtenção de segregantes haplóides (n).

3.1.3 Meio completo líquido (YEPD)

- Extrato de levedura_____1,0%
- Peptona_____1,0%
- Dextrose_____2,0%
- Água destilada__completar para 1000 mL

Meio utilizado para a multiplicação das células tanto para inóculo inicial quanto nos ensaios de velocidade máxima de crescimento.

3.2 Soluções

3.2.1 Solução tampão da enzima lítica dos ascósporos

- Sorbitol_____18,22g
- TRIS (pH = 7,5)_____0,12g
- NaPO₄_____0,36g
- EDTA_____0,37g
- Água destilada_____completar para 100 mL
- Esterilização por filtração em filtro milipore.

3.2.2 Solução rompimento dos ascósporos

- 250,0 μ L de tampão da enzima.
- 0,750 μ L de mercaptoetanol.
- 1,500 μ L da enzima litase.

A solução com a enzima facilita o rompimento dos ascos para a liberação dos esporos.

3.3 Linhagens utilizadas

Todas as linhagens utilizadas na elaboração deste estudo são pertencentes ao banco de germoplasma do Laboratório de Genética de Leveduras do Departamento de Genética – ESALQ/USP, sendo estas:

- GH7 (linhagem testadora da reação sexual tipo α).
- AH22 (linhagem testadora da reação sexual tipo a).
- Fleischmann (linhagem testemunha - controle positivo).
- HCPII-5A (linhagem testemunha - controle negativo).
- GRF-18 (linhagem parental número 1).
- HCPII-3B (linhagem parental número 2).

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Metodologia para a síntese do material biológico para as análises

A síntese do material biológico utilizado neste estudo buscou a constituição de um conjunto de linhagens genéticas aparentadas de forma pré-estabelecida e apresentadas nas figuras 4 e 5, para que se tornasse possível o emprego dos métodos biométricos disponíveis para as análises.

Desta forma, a partir de uma amostra inicial de vinte e oito linhagens, foi realizada a indução da esporulação destas para que fossem selecionadas somente as linhagens diplóides (as passíveis de esporulação).

Do total das vinte e oito linhagens, somente onze esporularam. O próximo passo foi o de se verificar o número de esporos presentes nos ascos de cada uma das onze linhagens selecionadas, uma vez que para a realização do estudo somente seriam de interesse as linhagens que fornecessem tétrades completas, ou seja, quatro esporos por asco.

Esta Segunda etapa de seleção forneceu o número de seis linhagens e destas, somente quatro se mostraram adequadas ao estudo considerando-se a viabilidade dos seus esporos segregantes após micromanipulados e isolados em placa.

As duas linhagens parentais utilizadas nesse trabalho foram selecionadas em função de seus valores fenotípicos ensaiados quanto ao caráter “Velocidade máxima de crescimento” e quanto à viabilidade de seus descendentes.

3.4.1.1 Esporulação das linhas diplóides e Isolamento de linhagens haplóides

As linhagens diplóides ($2n$) foram estriadas em placas de Petri contendo o meio Rafinose enriquecido (item 3.1.2) e incubadas em estufa B.O.D. marca Marconi 415, a 30° Celsius pelo período variando de três a sete dias.

Decorrido este período (variável de linhagem para linhagem), uma alçada de células da placa com o meio Rafinose enriquecido (item 3.1.2) foi introduzida em um tubo Eppendorf contendo a solução lítica (item 3.2.2) e incubada por vinte minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo estriou-se com essa mistura, uma placa de Petri contendo o meio sólido YEPD (item 3.1.1) Esta placa foi então invertida em suporte do microscópio com o micromanipulador adaptado por Tavares (1977) conforme a figura 1.

Os ascos completos (tétrades) foram dissecados e seus respectivos esporos foram transferidos para posições conhecidas na própria placa, conforme a figura 2. Cada esporo dá origem a uma colônia isogênica, com tipo de reação sexual definido e que pode ser indefinidamente multiplicada na ausência de mutações que afetem ao tipo de reação sexual.

Figura 1 - Micromanipulador de células pertencente ao Laboratório de Genética de Leveduras - ESALQ/USP

Figura 2 - Crescimento de tétrades de esporos haplóides provenientes de ascos micromanipulados, após quarenta e oito horas da dissecação dos ascos

3.4.1.2 Determinação da reação sexual dos esporos segregantes

Após a esporulação das células diplóides ($2n$) e a micromanipulação dos respectivos esporos segregantes haplóides (n), procedeu-se à determinação da reação sexual destas linhagens segregantes haplóides, cruzando-as com linhagens testadoras de reação sexual conhecidas (GH7 α ; AH22a).

Decorrido o período aproximado de quatro horas após cruzamento (figura 3), pode-se fazer o reconhecimento dos zigotos pela sua morfologia peculiar.

A forma típica trilobada que resulta de duas células conjugantes e do primeiro broto de divisão produzido é a indicação de que ocorreu hibridização e, portanto, que a linhagem haplóide testada possui a reação sexual contrária à da linhagem testadora (conhecida).

Figura 3 - Cruzamento e formação de zigotos identificados pela morfologia característica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (a coloração esverdeada das células acima são características de células transformadas geneticamente com a introdução do gene GFP, sendo esta figura exclusivamente para uso didático)

3.4.1.3 A síntese do Híbrido HCPA-VI

Os híbridos são obtidos a partir do cruzamento entre duas linhagens haplóides portadoras de reação sexual contrárias.

O cruzamento é realizado colocando-se em contato físico, uma pequena massa de células representantes das duas linhagens haplóides.

Decorrido aproximadamente quatro horas após o cruzamento, encontrando-se células zigotos típicas, faz-se o seu isolamento com o auxílio do micromanipulador, transferindo os zigotos para posições conhecidas na mesma placa de Petri, distantes da massa celular em mistura. As linhagens haplóides HCP11-3B_a e GRF-18_α foram cruzadas naturalmente e um dos seus híbridos, denominado HCPA-VI, foi isolado pelo processo de micromanipulação.

3.4.1.4 Síntese dos híbridos de Retrocruzamentos

O híbrido HCPA-VI sofreu esporulação e a subsequente micromanipulação dos seus esporos segregantes, sendo isolados nas respectivas tétrades e multiplicados. Em seguida, foram determinadas as respectivas reações sexuais das linhagens haplóides segregantes e posteriormente, estas foram retrocruzadas com as linhagens parentais recorrentes (HCP-II-3B_a e GRF-18_α) obedecendo-se as respectivas reações sexuais (figura 4). Deste modo foram obtidos vinte híbridos viáveis de retrocruzamentos.

Figura 4 - Esquema geral do material biológico sintetizado

3.4.2 Método para a determinação da Velocidade máxima de crescimento

Os ensaios de crescimento das culturas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram realizados para a determinação da velocidade máxima de crescimento das culturas celulares referentes a cada um dos tratamentos genéticos analisados.

Um ensaio de crescimento constitui-se da elaboração de uma curva de crescimento da cultura celular, para a estimativa das taxas de crescimento (Monod, 1949). A mensuração da velocidade de crescimento obedeceu à determinação da densidade celular das culturas pelo princípio da turbidez, utilizando-se para tanto um espectrofotômetro marca Beckmann ajustado no comprimento de onda de 600 nanômetros, com leituras regulares em intervalos temporais de duas horas. Desta forma obtiveram-se cinco medidas referentes às densidades celulares das culturas ensaiadas, nos diferentes intervalos de tempo, cujos valores encontram-se dispostos no apêndice 1.

3.4.2.1 Preparo do inóculo padronizado

A necessidade de trabalhar com inóculos padronizados está baseada no fato em que, ao iniciar os ensaios de crescimento com os inóculos padronizados, as possibilidades de erros experimentais são reduzidas e um melhor acompanhamento dos ensaios pôde ser realizado, assegurando-se assim, uma fiel avaliação experimental.

Atendendo a esta preocupação, prepararam-se os inóculos padronizados para os ensaios de crescimento, em Erlenmeyers contendo trinta mililitros do meio completo líquido YEPD (item 3.1.3) e uma alçada de células de linhagem genética a ser avaliada. Após a inoculação das linhagens, de forma individualizada, os Erlenmeyers foram então incubados sob agitação constante de vinte rotações por minuto a trinta graus Celsius, durante o período de vinte e quatro horas para a multiplicação celular.

Decorrido o período de vinte e quatro horas, espera-se que as culturas tenham atingido densidades populacionais máximas, densidades populacionais estas, correspondentes à fase estacionária em uma curva de crescimento padrão (Monod, 1949).

Essas culturas serviram de fonte dos inóculos, em alíquotas de oitocentos microlitros, das culturas em fase estacionária. Uma fase estacionária de uma curva de crescimento “padrão” corresponde ao momento em que a cultura celular atingiu sua população máxima. Foi devido a esta característica que selecionamos tal ponto da cultura, com a finalidade de obtermos um inóculo o mais padronizado possível quanto ao número de células.

3.4.2.2 Ensaios de Crescimento

Os inóculos padronizados foram então adicionados, de forma individualizada, em novos Erlenmeyers contendo quarenta e cinco mililitros de meio completo líquido YEPD (item 3.1.3) e, neste momento foi então realizada a primeira quantificação da densidade da cultura celular, constituindo esta, ao primeiro ponto da curva de crescimento da cultura celular.

Após a inoculação das linhagens e à mensuração do primeiro ponto da curva de crescimento, os Erlenmeyers foram incubados sob agitação constante de vinte rotações por minuto a trinta graus Celsius e, quantificações consecutivas das densidades celulares das culturas foram realizadas em intervalos temporais de duas horas, constituindo na soma, os cinco pontos amostrados. Tais medidas correspondem aos pontos sobre os quais, foram obtidas as curvas de crescimento (conforme ilustrado no apêndice 2) de forma individualizada para cada tratamento genético analisado.

3.4.2.3 Cálculo da Velocidade Máxima de Crescimento

As linhagens testemunhas FF e HCP-5A, as linhagens parentais HCPII-3B, GRF-18, o híbrido HCPA-VI, seus segregantes haplóides e seus híbridos de retrocruzamentos, foram ensaiados quanto à determinação de sua velocidade máxima de crescimento, tempo mensurado em horas, em ensaios de crescimento controlados, em delineamento de blocos casualizados com quatro repetições.

Os resultados encontram-se no apêndice 1. A metodologia de cálculo da velocidade máxima de crescimento consiste na determinação da fase exponencial de crescimento da cultura celular, na curva de crescimento, aonde a velocidade de crescimento da cultura é máxima e constante. Foram então identificadas as duas leituras realizadas que delimitam e que compreendam a fase exponencial de crescimento da cultura, sendo estas leituras denominadas **B** e **b**.

Os valores correspondentes às duas leituras **B** e **b** são utilizados no cálculo da determinação da velocidade máxima de crescimento, segundo a expressão citada por Pelqzar, 1980:

$$\text{Velocidade Máxima} = \frac{2}{(\text{Log } b/B) \times 3,3}.$$

3.4.3 Abordagem Biométrica do Caráter analisado

A abordagem biométrica envolve modelos utilizados para plantas e animais, que foram adaptados anteriormente por Kido (1990) na avaliação do caráter quantitativo "Produção de etanol" e utilizados no estudo do caráter quantitativo "Velocidade máxima de crescimento" pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Maiores detalhamentos matemáticos e deduções biométricas estão apresentados no trabalho de Kido (1990), sendo que neste trabalho foi dado maior enfoque ao emprego da metodologia previamente apresentada pelo autor supracitado.

A metodologia utilizada permite separar os efeitos genéticos e suas interações, fornecendo estimativas dos tipos de ações gênicas envolvidas na expressão do caráter quantitativo em estudo. Desta forma, espera-se poder comparar a magnitude destes efeitos em caracteres quantitativos de base genética ampla.

3.4.3.1 Abordagem simplificada dos componentes da variação fenotípica

Para fins analíticos, a variação contínua fenotípica apresentada por um caráter quantitativo e seus respectivos componentes, pode ser representada pelo seguinte modelo:

$$V_P = V_G + V_E + V_{GE} \quad \text{no qual,}$$

V_P = variação fenotípica total da população.

V_G = variação genética que contribui na variação fenotípica total.

V_E = variação ambiental que contribui na variação fenotípica total.

V_{GE} = variação associada à interação entre fatores genéticos e ambientais.

O modelo pode ser detalhado ao nível do componente "variação genética" e assim, inferir quais os subcomponentes que o constituem, da seguinte forma:

$$V_G = V_A + V_D + V_I \quad \text{no qual,}$$

V_G = Variação Genética.

V_A = Variação Aditiva.

V_D = Variação Dominante.

V_I = Variação por Interações intergênicas.

Assim, a variância genética total será dependente da contribuição de cada efeito em todos os locos que determinam o caráter.

A variância fenotípica pode ser então definida pela contribuição genética de cada tipo de interação alélica e intergênica dos genes envolvidos, dos efeitos ambientais e da interação entre a constituição genética e os efeitos ambientais, assim:

$$V_P = V_A + V_D + V_I + V_E + V_{GE}$$

V_P = variação fenotípica total da população.

V_A = Variação Aditiva.

V_D = Variação Dominante.

V_I = Variação por Interações intergênicas.

V_E = variação ambiental que contribui na variação fenotípica total.

V_{GE} = variação associada à interação entre fatores genéticos e ambientais.

3.4.3.2 Origem quantitativa dos componentes da variação fenotípica

Para obter estimativas dos componentes da variação em estudos de caracteres quantitativos, é necessário que se trabalhe com um conjunto de genótipos aparentados de forma adequada e pré-estabelecida (figura 5). Neste trabalho, estes pré-requisitos foram respeitados seguindo um sistema de parentesco determinado para o estudo de caracteres quantitativos em vegetais, idealizado da seguinte forma:

Figura 5 - Conjunto de genótipos aparentados utilizados

A partir de mensurações de indivíduos das gerações parentais, híbridas e segregantes, obtêm-se valores médios que permitem fazer inferências a respeito dos efeitos genéticos contidos na variação, da seguinte forma:

Figura 6 - Origem quantitativa dos efeitos genéticos

No esquema hipotético acima, o valor fenotípico apurado por $+[a]$ corresponde ao efeito aditivo dos alelos favoráveis ao caráter, presentes no **Parental 1**, em relação à média dos parentais (m). Em analogia, o valor apurado por $[d]$ corresponde ao efeito de dominância que os alelos do **Parental 1** exercem sobre os alelos do **Parental 2** na população descendente entre ambos (F 1).

3.4.4 Delineamento Experimental e Modelos Estatísticos

O caráter quantitativo “Velocidade máxima de crescimento” foi analisado através de ensaios de crescimento seguindo o delineamento experimental de blocos casualizados. Os tratamentos primários ou parcelas constituíram os vários tratamentos genéticos analisados (linhagens parentais, híbrido HCPA-VI, segregantes haplóides do híbrido, os híbridos de retrocruzamentos e as linhagens testemunhas) e as quatro repetições constituíram os blocos casualizados. As análises de variâncias foram realizadas de acordo com Steel & Torrie (1980) e Gomes (1985). Os modelos e procedimentos biométricos utilizados nas decomposições das variâncias, nas

determinações das esperanças matemáticas e nas estimativas dos parâmetros genéticos, foram aqueles adaptados e citados por Kido (1990), sobre os quais seria inviável a apresentação mais detalhada nesta oportunidade devido a grande complexidade envolvida.

3.4.4.1 Modelo geral utilizado para o caráter quantitativo “Velocidade máxima de crescimento”

$$Y_{im} = \mu + L_i + B_m + E_{(im)} \quad , \text{ onde}$$

Y_{im} = Velocidade máxima de crescimento, medida de tempo em horas, observada na linhagem i , na repetição m .

μ = Média de todos os tratamentos.

L_i = Efeito devido à linhagem i .

B_m = Efeito da repetição m .

$E_{(im)}$ = Efeito do resíduo ao nível de parcelas.

Os tratamentos primários foram decompostos nas causas “linhagens Haplóides” e “linhagens Diplóides” e, também, ao contraste “Haplóides x Diplóides”.

As linhagens haplóides e diplóides foram decompostas hierarquicamente em, “Entre os Ascós” e “Dentro dos Ascós”.

3.4.4.2 Modelo decomposto, ao nível de parcelas, utilizado para o caráter quantitativo “Velocidade máxima de crescimento”:

$$Y_{ij} = \mu + (H_{i(j)} + A_j) \theta + (D_{i(j)} + A_j) \gamma + E_{(ij)} \quad , \text{ onde}$$

$\theta = 1$ e $\gamma = 0$, para as linhagens haplóides (H).

$\theta = 0$ e $\gamma = 1$, para as linhagens diplóides (D).

Y_{ij} = Velocidade de crescimento, em horas, observada na linhagem i haplóide ou diplóide, do asco j haplóide ou diplóide.

μ = Média de todos os tratamentos.

$H_{i(j)}$ = Efeito da linhagem i haplóide, do asco j haplóide.

$D_{i(j)}$ = Efeito da linhagem i diplóide, do asco j diplóide.

A_j = Efeito do asco j (haplóide ou diplóide).

$E_{(ij)}$ = Efeito do resíduo ao nível de parcelas.

A tabela 1 apresenta as causas de variação e respectivas esperanças dos quadrados médios para o delineamento utilizado, conforme Kido (1990). Para as linhagens diplóides, oriundas de esporos segregantes do híbrido HCPA-VI, retrocruzadas com as linhagens parentais recorrentes (HCPII-3B e GRF-18), foi realizada uma decomposição adicional, nas seguintes causas de variação:

- “Entre retros (R)”, correspondente ao contraste entre os híbridos de retrocruzamentos realizados com uma linhagem parental recorrente versus os híbridos de retrocruzamentos oriundos da outra linhagem parental recorrente.
- “RxA” (RA), correspondente à interação do asco com as linhagens parentais recorrentes.
- “Hib/A/R” ($H_{ib/A/R}$), correspondente aos híbridos de retrocruzamentos de esporos de um mesmo asco, com os parentais recorrentes.

Tabela 1. Quadro da Análise de variância, em blocos ao acaso, com respectivas causas de variação e esperanças dos quadrados médios (E(QM))

F.V	QM	E(QM)	F
Blocos	Q1	$\sigma_B^2 + \sigma_e^2 + \iota \sigma_C^2$	Q1/Q10
Linhagens (L)	Q2	$\sigma_B^2 + \sigma_e^2 + r\sigma_L^2$	Q2/Q10
Haplóides (H)	Q3	$\sigma_B^2 + \sigma_e^2 + r\sigma_{TH}^2$	Q3/Q10
Entre os Ascós	Q4	$\sigma_B^2 + \sigma_e^2 + 4r\sigma_{aH}^2$	Q4/Q10
Dentro dos Ascós	Q5	$\sigma_B^2 + \sigma_e^2 + r\sigma_{WH}^2$	Q5/Q10
Diplóides (D)	Q6	$\sigma_B^2 + \sigma_e^2 + r\sigma_{TD}^2$	Q6/Q10
Entre os Ascós	Q7	$\sigma_B^2 + \sigma_e^2 + 4r\sigma_{aD}^2$	Q7/Q10
Dentro dos Ascós	Q8	$\sigma_B^2 + \sigma_e^2 + r\sigma_{WD}^2$	Q8/Q10
H x D	Q9		Q9/Q10
Resíduo	Q10	$\sigma_B^2 + \sigma_e^2$	

Onde

ι = número de linhagens haplóides e diplóides

r = número de repetições

σ_C^2 = variância devida ao efeito de blocos

σ_L^2 = variância genética entre as linhagens

σ_{aH}^2 = variância genética “Entre os Ascós” (haplóides)

σ_{aD}^2 = variância genética “Entre os Ascós” (diplóides)

σ_{WH}^2 = variância genética “Dentro dos Ascós” (haplóides)

σ_{WD}^2 = variância genética “Dentro dos Ascós” (diplóides)

σ_B^2 = variância ambiental referente às repetições

σ_e^2 = variância ambiental referente ao resíduo

σ_{TH}^2 = variância genética total em haplóides

σ_{TD}^2 = variância genética total em diplóides

Deste modo, foram determinadas as esperanças dos quadrados médios dos fatores de variação supracitados. A partir destas esperanças, foram isoladas as variâncias genéticas contidas nos fatores de variação de interesse, conforme a Tabela 2.

3.4.4.3 Decomposição da variância genética

As variâncias genéticas foram decompostas nas variâncias genéticas aditiva e epistática (do tipo aditiva por aditiva), no nível haplóide e nas variâncias aditiva e dominante no nível diplóide.

Tabela 2. Análise de variância, em blocos ao acaso das linhagens diplóides

F.V	QM	E(QM)	F
Blocos	Q1	$\sigma_B^2 + \sigma_e^2 + 4o\sigma_C^2$	Q1/Q7
Diplóides (D)	Q2	$\sigma_B^2 + \sigma_e^2 + r\sigma_{TD}^2$	Q2/Q7
Entre os Retros (R)	Q3	$\sigma_B^2 + \sigma_e^2 + 2r\sigma_{RA}^2 + 2o\sigma_R^2$	(Q3+Q6) / (Q5+Q7)
Entre os Ascós (A)	Q4	$\sigma_B^2 + \sigma_e^2 + 4r\sigma_{aD}^2$	Q8/Q10
R x A	Q5	$\sigma_B^2 + \sigma_e^2 + r\sigma_{Hib/A/R}^2 + 2r\sigma_{RA}^2$	Q9/Q10
Hib/A/R	Q6	$\sigma_B^2 + \sigma_e^2 + r\sigma_{Hib/A/R}^2$	Q6/Q7
Resíduo	Q7	$\sigma_e^2 + \sigma_F^2$	

o = número de ascós diplóides.

r = número de repetições.

σ_C^2 = variância devida ao efeito de blocos.

σ_{TD}^2 = variância genética total em diplóides.

σ_R^2 = variância genética entre os retrocruzamentos com as linhagens parentais recorrentes.

σ_{aD}^2 = variância genética em diplóides “Entre os Ascós”.

σ_{RA}^2 = variância genética interativa entre ascós e retrocruzamentos com as linhagens parentais recorrentes.

$\sigma_{Hib/A/R}^2$ = variância genética entre híbridos de retrocruzamentos de esporos com um dos parentais recorrentes.

σ_B^2 = variância ambiental referente às repetições.

σ_e^2 = variância ambiental referente ao resíduo.

3.4.4.3.1 Determinação das variâncias genéticas em haplóides

3.4.4.3.1.1 Determinação da variância genética total em haplóides

A variância genética total em haplóides (σ_{TH}^2) foi decomposta nas variâncias genéticas em haplóides “Entre os Ascós” (σ_{aH}^2) e “Dentro dos Ascós” (σ_{WH}^2).

$$\sigma_{TH}^2 = \sigma_{aH}^2 + \sigma_{WH}^2$$

3.4.4.3.1.2 Determinação da variância genética epistática do tipo aditiva por aditiva (σ_{AAH}^2) em haplóides

$$\sigma_{aH}^2 = 1/3 \sigma_{AAH}^2 \quad \text{logo,}$$

$$\sigma_{AAH}^2 = 3 \sigma_{aH}^2$$

3.4.4.3.1.3 Determinação da variância genética aditiva (σ^2_{AH}) em haplóides

$$\sigma^2_{WH} = \sigma^2_{AH} + 2/3 \sigma^2_{AAH} \quad \text{logo,}$$

$$\sigma^2_{AH} = \sigma^2_{WH} - 2/3 \sigma^2_{AAH}$$

3.4.4.3.2 Determinação das variâncias genéticas em diplóides

De acordo com a metodologia utilizada, as estimativas das variâncias genéticas aditivas e dominantes foram obtidas a partir das causas de variação “Entre os Ascós” e “RxA”, da seguinte forma:

3.4.4.3.2.1 Determinação da variância genética dominante em diplóides

$$\sigma^2_{aD} = 1/3 \sigma^2_D \quad \text{logo,}$$

$$\sigma^2_D = 3 \sigma^2_{aD}$$

3.4.4.3.2.2 Determinação da variância genética aditiva em diplóides

$$\sigma^2_{RA} = 1/6 \sigma^2_A \quad \text{logo,}$$

$$\sigma^2_A = 6 \sigma^2_{RA}$$

3.4.4.3.2.3 Determinação do Grau Médio de Dominância (GMD)

$$\text{GMD} = \frac{4\sigma^2_D}{2\sigma^2_A}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A possibilidade de análise dos produtos meióticos completos (análise de tétrades) que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* oferece permite estudar o mesmo caráter genético seja ele qualitativo ou quantitativo, em nível haplóide e diplóide, podendo-se inclusive efetuar comparações de linhagens originárias de um mesmo asco ou de ascos diferentes de um mesmo híbrido.

Estas condições biológicas dificilmente poderão ser satisfeitas em organismos superiores e isto justifica utilizar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* com vantagens para se isolar os efeitos quantitativos e inclusive os efeitos aditivos e epistáticos livres dos efeitos de dominância.

Este trabalho vem a complementar o estudo realizado por Kido (1990), no qual foi analisado o caráter quantitativo “Produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*” sendo verificado por este autor o efeito epistático correspondendo a 33,80% de toda a variação genética.

No presente trabalho, foi analisado um caráter quantitativo de base genética mais ampla do aquele analisado por Kido. O caráter em estudo, a “Velocidade máxima de crescimento”, é uma propriedade característica do crescimento da espécie e é parâmetro importante na indústria de fermentações.

Em suma, o caráter analisado exprime o tempo gasto para a população celular dobrar sua massa em condições ambientais não restritivas e onde todas as etapas do ciclo celular devem estar acontecendo com o máximo de eficiência.

O crescimento celular, portanto, envolve a expressão de todos os genes celulares e conseqüentemente, todas as possíveis interações gênicas. Este foi o motivo pelo qual foi escolhida esta propriedade.

Conforme descrito, as linhagens parentais haplóides, o híbrido diplóide e as respectivas linhagens segregantes haplóides, nos diferentes cruzamentos, foram ensaiadas experimentalmente de forma individualizada, determinando-se para cada uma delas o respectivo valor da propriedade “Velocidade máxima de crescimento”.

Os resultados obtidos em cada experimento estão apresentados no anexo 1, resultados estes que foram submetidos às análises biométricas apresentadas a seguir:

4.1 Análise de variação entre todas as linhagens genéticas utilizadas

Todos os tratamentos foram submetidos a uma primeira análise de variância (tabela 3), aonde todos os tratamentos genéticos foram submetidos ao fator de variação denominado "Linhagens".

Tabela 3. Linhagens parentais, o híbrido HCPA-VI, suas linhagens segregantes haplóides, os híbridos de retrocruzamentos, os híbridos intrameióticos e as linhagens testemunhas

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	3	0,635	0,212	4,930 **
Linhagens	44	49,311	1,121	26,069 **
Resíduo	132	5,731	0,043	
Total	179	55,677		

Nesta análise inicial, buscou-se identificar diferenças significativas entre todas as linhagens genéticas utilizadas neste trabalho.

Desta forma, foram observadas diferenças significativas ao nível de 1% e a 5% de significância (teste F) para esta fonte de variação. Estas diferenças significativas revelam a diversidade do material genético analisado, diferenças estas detectadas pela expressão direta dos genótipos correspondentes, em condições experimentais já descritas.

O fator de variação "Blocos" também mostrou diferenças significativas aos mesmos níveis de significância. Kido, 1990, utilizando metodologia biométrica semelhante, também encontrou diferença significativa no fator "Blocos" em seu estudo sobre produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. O mesmo autor sugere como possíveis causas àquelas relacionadas às variações não controláveis nos procedimentos experimentais presentes nas repetições dos ensaios.

4.2 Contraste entre os graus de ploidia

Com a finalidade de identificar possíveis diferenças fenotípicas envolvendo o grau de ploidia entre as linhagens, foi realizada uma segunda análise de variância (tabela 4), na qual o fator de variação "Linhagens" analisado anteriormente, foi decomposto nos aos níveis "Haplóides" e "Diplóides", correspondendo às linhagens segregantes do híbrido HCPA-VI e às linhagens híbridas de retrocruzamentos, respectivamente.

Foi também realizada uma análise buscando identificar o contraste entre haplóides e diplóides (H x D) na tentativa de se investigar possíveis vantagens fenotípicas em consequência do nível de ploidia celular analisado.

Tabela 4. Análise de variância e decomposição do fator de variação "Linhagens" em "Haplóides" e "Diplóides" e seus respectivos ascos

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Linhagens (L)	44	49,311	1,121	26,069 **
Haplóides (H)	19	10,799	0,568	13,209 **
Entre os ascos	4	1,748	0,437	10,163 **
Dentro dos ascos	15	9,051	0,603	14,023 **
Diplóides (D)	19	3,423	0,180	4,186 **
Entre os ascos	4	2,337	0,584	13,581 **
Dentro dos ascos	15	1,087	0,072	1,674
H x D	1	62,126	62,126	1444,790 **
Resíduo	132	5,731	0,043	
Total	179			

Assim, foi observada diferença significativa no contraste "H x D", nos níveis de significância de 1% e 5% (teste F).

De fato, as linhagens diplóides necessitaram, em média, de 1,8441 horas para dobrar sua massa celular, na fase exponencial de crescimento; enquanto que as linhagens haplóides necessitaram, em média, de 2,1926 horas para dobrar sua massa, nas mesmas condições. Este resultado indica, intuitivamente, que o maior número de genes presentes nas linhagens diplóides estejam favorecendo quantitativamente a expressão do caráter.

A tabela 4 mostra que as linhagens haplóides diferiram entre si aos níveis de significância de 1% e 5% (teste F), o que veio a ratificar o resultado da análise anterior, na qual foi detectada a diversidade genética entre as linhagens, diversidade genética esta, também presente entre os indivíduos haplóides.

As linhagens diplóides também mostraram diferenças significativas entre si, nos mesmos níveis de significância, ratificando da mesma forma, que a diversidade genética também está presente nos indivíduos diplóides, não sendo exclusiva, portanto, dos indivíduos haplóides.

Na mesma tabela, foram também analisados os fatores "Entre os ascos" (buscando identificar diferenças entre as médias dos cinco ascos analisados) e "Dentro dos ascos" (buscando identificar diferenças entre os produtos meióticos de cada um dos ascos analisados), tanto para "Haplóides" quanto para "Diplóides".

Nas linhagens haplóides, os fatores "Entre os ascos" e "Dentro dos ascos", mostraram diferenças significativas aos níveis de significância de 1% e 5% (teste F).

Nas linhagens diplóides, o fator "Entre os ascos" revelou diferença significativa nos níveis de significância propostos, enquanto que o fator "Dentro dos ascos" não revelou diferenças significativas nos mesmos níveis. Essa nulidade de significância ocorreu devido à presença de interações alélicas, as quais tornaram os indivíduos diplóides mais homogêneos fenotipicamente, o que não ocorreu com os indivíduos haplóides, pela ausência de interação alélicas nesses indivíduos.

4.2.1 Nível de ploidia 1 - Haplóides Segregantes de HCPA-VI

Com a finalidade de se estimar de forma mais precisa os componentes genéticos e ambientais da variação presentes em cada um dos níveis de ploidia analisados (haplóide e diplóide), foi realizada uma nova análise de variância, na qual buscou-se identificar somente os fatores de variação presentes nas linhagens haplóides.

Adicionalmente, este fator foi decomposto nos níveis dos diferentes ascos segregantes (tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância ao nível de parcelas e decomposição do fator de variação "Linhagens" em "Haplóides" em seus respectivos ascos de origem

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	3	0,974	0,325	7,738 **
Haplóides (H)	19	10,799	0,568	13,524 **
Entre os ascos	4	1,748	0,437	10,405 **
Dentro dos ascos	15	9,051	0,603	14,357 **
Dentro do Asco 1	3	0,121	0,040	0,952
Dentro do Asco 2	3	0,262	0,087	2,071
Dentro do Asco 4	3	0,608	0,203	4,833 **
Dentro do Asco 5	3	4,408	1,469	34,976 **
Dentro do Asco 6	3	3,652	1,217	28,976 **
Resíduo	57	2,376	0,042	
Total	79	14,149		

A tabela demonstra que o fator de variação "Blocos" continua significativo aos níveis de 1% e 5% de significância (teste F), ratificando a hipótese de desvios devidos

aos fatores de variação não controláveis. O fator "Haplóides" também revelou-se significativo nos mesmos níveis de significância, fortalecendo o resultado da análise anterior.

Adicionalmente, também foi observada a variabilidade genética presente "Dentro dos ascos" e "Entre os ascos". É interessante ressaltar que as tétrades analisadas (ascos) são os produtos diretos das meioses ocorridas pelo híbrido HCPA-VI ($2n$).

Assim, a partir da análise de tétrades, foi possível detectar, de forma precisa, a manifestação da geração de variabilidade genética a partir de eventos meióticos em uma célula eucariótica, como evidencia as diferenças significativas apuradas entre os indivíduos presentes "Dentro dos ascos" e "Entre os ascos".

Considerando que não existam perdas de material genético durante uma meiose, um asco deve representar todo o genoma do híbrido.

Assim, espera-se que as médias fenotípicas dos ascos não sejam diferentes entre si, caso o tipo de ação gênica envolvida seja aditiva. Entretanto, de acordo com a tabela 5, o fator "Entre os ascos" foi significativo nos níveis estatísticos empregados.

Desta forma, intuitivamente, os resultados sugerem a participação de outros tipos de ações gênicas envolvidas, além da ação gênica aditiva, visto que as médias fenotípicas dos ascos foram diferentes entre si.

Uma vez que, nesta análise, somente genomas haplóides foram utilizados, descartamos aqui, a participação da ação gênica do tipo dominante, característica de genomas diplóides. Assim, as diferenças detectadas podem ser atribuídas a tipos de ações gênicas envolvendo interações não alélicas.

Conforme a metodologia utilizada por Kido (1990), deduz-se que toda a variabilidade presente no fator "Entre os ascos" pode ser atribuída às interações inter-alélicas epistáticas, do tipo aditiva por aditiva.

Assim, a metodologia biométrica utilizada neste trabalho, permitirá a realização de uma estimativa do componente da variação epistático, do tipo aditivo por aditivo, nas linhagens haplóides, conforme o item 4.2.1.1.1.

4.2.1.1 Estimativas dos parâmetros genéticos nas linhagens haplóides

As variâncias genéticas nas linhagens haplóides foram estimadas a partir das esperanças dos quadrados médios desenvolvidas para os fatores de variação "Entre os ascos" e "Dentro dos ascos", de acordo com as tabelas 1 e 5.

Dessa forma, foram estimadas as variâncias genéticas "Entre os ascos" (σ^2_{aH}) como sendo 0,0246 Hs² e, "Dentro dos Ascós" (σ^2_{WH}) como sendo 0,1399 Hs².

A soma das duas variâncias genéticas determinadas corresponde à variância genética total em haplóides (σ^2_{aH}), sendo seu valor 0,1645 Hs².

Conforme a metodologia utilizada por Kido (1990) descrita no item 3.4.2.3.1 e às variâncias supradeterminadas, foram então estimados os seguintes parâmetros genéticos, da seguinte forma:

4.2.1.1.1 Estimativa da variância genética epistática (σ^2_{AAH}), do tipo aditiva por aditiva, nas linhagens haplóides segregantes do híbrido HCPA-VI

A partir das variâncias genéticas determinadas no item anterior (4.2.1.1), estimou-se a variância genética epistática, do tipo aditiva por aditiva em haplóides, conforme o item 3.4.2.3.1.2 assim:

$$\sigma^2_{TH} = \sigma^2_{aH} + \sigma^2_{WH} \quad (1)$$

$$\sigma^2_{aH} = 1/3 \sigma^2_{AAH} \quad (2)$$

$$\text{Logo, } \sigma^2_{AAH} = 3 \sigma^2_{aH}, \quad \text{Portanto: } 0,0246 = 1/3 \times \sigma^2_{AAH} \quad \text{logo,}$$

$$\sigma^2_{AAH} = 0,0738 \text{ Hs}^2, \text{ ou } \sigma^2_{AAH} = 44,86 \% \text{ de } \sigma^2_{TH}$$

Conforme descrito anteriormente, de um modo geral, os modelos biométricos desconsideram as epistasias. Porém, tem-se demonstrado que em eucariotos, quando um caráter quantitativo é analisado em sua forma haplóide, isto é, onde não há possibilidade de manifestação dos efeitos de dominância, o componente epistático revela-se de grande magnitude. Neste trabalho, o componente epistático correspondeu a 44,86% de toda a variância genética. Kido (1990), utilizando metodologia biométrica semelhante no estudo do caráter quantitativo "Produção de Etanol" por *Saccharomyces cerevisiae*, também encontrou o componente epistático se revelando de forma expressiva, correspondendo a 33,80% da variância total.

Desta forma, não parece ser conveniente o tratamento que vem sendo dado aos efeitos epistáticos nos estudos de caracteres quantitativos, mesmo quando os objetivos são direcionados a programas de melhoramento genéticos em organismos superiores.

4.2.1.1.2 Estimativa da variância genética aditiva (σ^2_{AH}) nas linhagens haplóides segregantes do híbrido HCPA-VI

A partir das variâncias genéticas determinadas no item (4.2.1.1), estimou-se a variância genética aditiva em haplóides, conforme o item 3.4.2.3.1.3 assim:

$$\sigma^2_{WH} = \sigma^2_{AH} + 2/3 \sigma^2_{AAH} \quad (3)$$

$$\text{Logo, } \sigma^2_{AH} = \sigma^2_{WH} - 2/3 \sigma^2_{AAH} \quad (4)$$

$$\text{Portanto: } \sigma^2_{AH} = 0,1399 - 2/3 \sigma^2_{AAH} \text{ logo,}$$

$$\sigma^2_{AH} = 0,0907 Hs^2, \text{ ou } \sigma^2_{AH} = 55,14 \% \text{ de } \sigma^2_{TH}$$

Desta forma, a variância genética devida aos efeitos genéticos aditivos, correspondeu pela maior parte da variância genética total.

Este resultado é de magnitude semelhante com o valor determinado por Kido (1990), em estudo no qual o autor estimou a variância genética aditiva representando 66,20 % de toda a variância genética.

Em plantas e animais, a participação do componente aditivo também corresponde pela maior parte da variação genética. Este fato sugere para esses organismos que, a busca por genótipos portadores do maior número de alelos favoráveis à expressão do caráter, pode ser um eficiente método no melhoramento do caráter de interesse.

4.2.2 Nível de ploidia 2 - Diplóides (retrocruzamentos de HCPA-VI)

Com a finalidade de se estimar de forma mais precisa os fatores de variação genéticos e ambientais, presentes nas variâncias fenotípicas observadas em cada nível de ploidia (haplóide e diplóide), foi realizada uma nova análise de variância complementar.

Nesta análise complementar buscou-se identificar somente as fontes de variação nos indivíduos diplóides (híbridos de retrocruzamentos), adicionalmente, decompostas aos níveis dos diferentes ascos participantes (tabela 6).

Tabela 6. Análise de variância em blocos ao acaso e decomposição das linhagens em “Diplóides” (híbridos de retrocruzamentos) e seus ascos participantes

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	3	0,165	0,055	1,250
Diplóides (D)	19	3,423	0,180	4,091 **
Entre os ascos	4	2,337	0,584	13,273 **
Dentro dos ascos	15	1,087	0,072	1,636
Dentro do Asco 1	3	0,603	0,201	4,568 **
Dentro do Asco 2	3	0,021	0,007	0,159
Dentro do Asco 4	3	0,057	0,019	0,432
Dentro do Asco 5	3	0,324	0,108	2,454 *
Dentro do Asco 6	3	0,082	0,027	0,613
Resíduo	57	2,525	0,044	
Total	79	6,113		

Esta análise teve como objetivo, melhor estimar os fatores de variação nos genótipos diplóides e, adicionalmente, também estimar os fatores de variação presentes nesses indivíduos diplóides, nos respectivos ascos participantes de origem.

Diferentemente das tabelas de números 3 e 5, a tabela 6 ilustra que o fator "Blocos" não se mostra significativo nos níveis considerados de 1% e 5% (teste F). Isto porque foram estimados novos quadrados médios, inclusive do resíduo, levando então à nulidade de significância deste fator. A partir da mesma tabela, foi observada diferença significativa no fator "Diplóides", nos mesmos níveis considerados, sendo que esta variabilidade genotípica também esteve presente na decomposição "Entre os ascos" e ausente na decomposição "Dentro dos ascos". Diferenças significativas entre os organismos diplóides também foram observadas no item 4.2, aonde foram feitas as considerações sobre o resultado observado.

Nesta mesma tabela, também foi analisado o comportamento, de forma individualizada, dos híbridos representantes de cada um dos cinco ascos. Nesta análise, mostraram significância, o asco número 1, a 1% e 5% (teste F) e o asco número 5 ao nível de significância de 5%, para o mesmo tipo de teste. Este fato revela a variabilidade gerada pelos efeitos de recombinação gênica ocorridos na formação dos híbridos.

Com a finalidade de melhor estimar as variâncias no fator denominado “Diplóides”, uma nova análise foi realizada, conforme ilustrado na tabela 7:

Tabela 7. Análise de variância parcial envolvendo as linhagens diplóides, nas decomposições do fator “Diplóides”

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	.
Diplóides	19	3,4234	0,1810	4,086 **	
Entre os ascos (A)	4	2,3370	0,5842	13,187 **	
Dentro dos ascos	15	1,0870	0,0724	1,634	
Entre retos (R)	1	0,0001	0,0001	0,0004	
R x A	4	1,0865	0,2716	6,79 x 10 ³ **	
Hib/A/R	10	0,0004	0,0000	0,0009	
Resíduo	57	2,5250	0,0443		.

As esperanças dos quadrados médios, determinadas na tabela 7, em associação com a metodologia apresentada no item 3.4.2.3.2, permitiram a realização das estimativas dos parâmetros genéticos nos genótipos diplóides, como seguem.

4.2.2.1 Estimativa dos parâmetros genéticos nas linhagens diplóides (híbridos de retrocruzamentos)

As variâncias genéticas nas linhagens diplóides híbridas de retrocruzamentos, foram estimadas a partir das esperanças dos quadrados médios desenvolvidas para os fatores de variação "Entre os ascos", "R x A" e "Hib/A/R" de acordo com as tabelas de números 2 e 7.

Dessa forma, foram estimadas as variâncias genéticas "Entre os ascos" (σ^2_{aD}) como sendo 0,0337 Hs^2 e, "RA" (σ^2_{RA}) como sendo 0,0339 Hs^2 .

A soma das duas variâncias genéticas determinadas corresponde à variância genética total em diplóides (σ^2_{TD}), sendo seu valor 0,3045 Hs^2 .

Conforme a metodologia utilizada por Kido (1990), descrita no item 3.4.2.3.2 e às variâncias supradeterminadas, foram estimados os seguintes parâmetros genéticos, da seguinte forma:

4.2.2.1.1 Estimativa da variância genética dominante (σ^2_D), nas linhagens diplóides híbridas de retrocruzamentos

A partir das variâncias genéticas determinadas no item (4.2.2.1), estimou-se a variância genética dominante em diplóides, conforme o item 3.4.2.3.2.1 assim:

$$\sigma^2_{TD} = \sigma^2_D + \sigma^2_A \quad (5)$$

$$\sigma^2_D = 3 \times \sigma^2_{aD} \quad (6)$$

$$\text{Logo, } \sigma^2_D = 0,1011 Hs^2, \text{ ou } \sigma^2_D = 33,20 \% \text{ de } \sigma^2_{TD}$$

4.2.2.1.2 Estimativa da variância genética aditiva (σ^2_A) nas linhagens diplóides híbridas de retrocruzamentos

A partir das variâncias genéticas determinadas no item (4.2.2.1), estimou-se a variância genética aditiva em diplóides, conforme o item 3.4.2.3.2.2 assim:

$$\sigma^2_A = 6 \times \sigma^2_{RA}, \quad (7)$$

$$\text{Logo, } \sigma^2_A = 0,2034 \text{ Hs}^2, \text{ ou } \sigma^2_A = 66,80 \% \text{ de } \sigma^2_{TD}$$

Dessa forma, a variância genética devida aos efeitos genéticos aditivos correspondeu pela maior parte da variância genética total, também entre os indivíduos diplóides. Nos demais organismos superiores, como as plantas e os animais, a literatura especializada registra valores coincidentes, tendo a ação gênica aditiva, a maior participação da variação genética total.

4.2.2.1.3 Estimativa do Grau Médio de Dominância (GMD) nas linhagens diplóides híbridas de retrocruzamentos

A partir das variâncias genéticas determinadas nos itens (4.2.2.1.1 e 4.2.2.1.2) estimou-se o Grau Médio de Dominância, conforme o item 3.4.2.3.2.3 assim:

$$\text{GMD} = \frac{4 \sigma^2_D}{2 \sigma^2_A} \quad (8)$$

$$\text{Logo, } \quad \text{GMD} = 0,9941$$

A estimativa do Grau Médio de Dominância próximo a um (0,9941), ilustra a situação média de dominância em todos os locos envolvidos na determinação do caráter quantitativo em estudo. Isto significa que no melhoramento genético de leveduras, torna-se viável a realização de hibridizações e conseguinte seleção de fenótipos diplóides superiores.

Nos genótipos diplóides analisados neste trabalho foi detectada a participação das ações gênicas de aditividade, de dominância (interações alélicas). As interações intergênicas em diplóides, certamente fazem parte da variação, embora estas não tenham sido estimadas no presente estudo em função da restrição do modelo utilizado apresenta, na separação dos efeitos das interações alélicas com àquelas não-alélicas.

Em estudos futuros, a partir do elevado número de informações atualmente disponíveis a respeito da biologia celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como seu genoma inteiramente seqüenciado, seu proteoma funcional deduzido com as funções determinadas de 1.739 genes, poderá ser possível que os processos de ação gênica venham a ser explicados em nível molecular. Essa linha de pesquisa seria de grande importância na elucidação das bases funcionais dos processos epistáticos, os quais se mostraram participantes em níveis representativos na identificação dos efeitos genéticos, principalmente em nível haplóide, contidos na expressão dos caracteres quantitativos analisados neste trabalho e também no trabalho de Kido (1990).

6 CONCLUSÕES

- 6.1 A metodologia utilizada foi eficiente para permitir estimar os efeitos genéticos extraídos de análises de variâncias de experimentos para medir a "Velocidade máxima de crescimento" da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.
- 6.2 A separação de dados efeitos genéticos na condição haplóide permitiram estimar respectivamente, sem interferências alélicas, os efeitos aditivo por aditivo diretamente, fato este ainda não possível de ser estimado diretamente em plantas e animais.
- 6.3 Os resultados deste trabalho indicam, juntamente com Caten & Jinks (1976) e Kido (1990) que, o melhoramento de organismos superiores possui métodos que podem prontamente ser adaptados em microrganismos pertencentes de sistemas de recombinação, como acontece na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**. New York: John Wiley, 1960. 381p.

BREWBAKER, J.L. **Agricultura genetics**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1964. 217p.

CARNEIRO, M.S. Mapas de ligação de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) baseados em marcadores RAPD. Piracicaba, 2001. 95 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo.

COMSTOCK, R.E. ; ROBINSON, H.F. Estimation of average dominance of genes. *In*: GOWEN, J.W. (Ed.). **Heterosis**. Ames: State College, 1952. p. 494-516.

FALCONER, D.S. **Introduction to quantitative genetics**. London: Longman, 1976. 365p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPLAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220p.

- FRANKEL, W.N ; SCHORK, N.J. Who's afraid of epistasis? **Nature Genetics**, v. 14, n. 4, 1996, p 371 - 373.
- GALVIN, A.C.; BOSCHE, M. ; KRAUSE, R. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. **Nature**, v. 415, p 141 – 147, 2002.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 11.ed. São Paulo: Nobel, 1985. 466p.
- GOMES, L.H. Avaliação de quatro métodos para a caracterização de leveduras. Piracicaba, 1995. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- GOMES, L.H.; ARGUESO, J.L.; DUARTE, K.M.R.; TAVARES, F.C.A. RAPD para a identificação de leveduras industriais. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICROORGANISMOS. 20., Piracicaba, 1995. **Anais**. Piracicaba: s.ed. 1995. p. 154.
- HALLAUER, A.R; MIRANDA F.J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames: The Iowa State University Press, 1981. 468p.
- HERSKOWITZ, I. ; OSHIMA, Y. Control of cell type in *Saccharomyces cerevisiae*: mating type and mating-type interconversion. In. STRATHERNN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. (Ed.). **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces***. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981. p.181-209.
- INGRAM, M. **An introduction to the biology of yeasts**. New York: Pitman, 1955. 273 p.

KIDO, E.A. Análise de tétrades e biométrica combinadas para o estudo da produção de etanol em *Saccharomyces cerevisiae*. Piracicaba, 1990. 160p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

LINDEGREN, C.C. **The yeast cell : its genetics and cytology**. St. Louis: Educational Publishers, 1949. 1 v.

MARTIN, M. P. Epistatic interaction between *KIR3DS1* and *HLA-B* delays the progression to AIDS, **Nature**, v. 31, p 429 – 434, 2002.

MATHER, K. ; JINKS, J. **Introdução à genética biométrica**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1984. 242p.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 3, p. 371-393, 1949.

PANDEY A. ; MATTHIAS , M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 15, 2000.

RAMALHO, M.A.P. ; SANTOS, J. B. ; PINTO, C.A.B. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 2000.

ROMAN, H. Development of yeasts as an experimental organisms. In: STRATHERNN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. (Ed). **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces***. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981. p.1-9.

ROMAN, W. **Yeasts**. The Hague : W. Junk, 1957. 246p.

ROSE, A.H. ; HARRISON, J.S. (Ed.) **The yeasts**. London: Academic Press, 1969. 1 v.

SPIGEL, M.R. **Estatística**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1977. 580p.

STEEL, R.G.D. ; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1980. 633p.

STRATHERNN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: life cycle and inheritance**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981.751p.

STRICKBERGER, M. W. **Genetics**. 3. ed. New York; London : Macmillan, 1985. 842p.

SUZUKI, D.T. ; GRIFFITHS, A.J.F. **Introdução a genética**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 633p.

TAVARES, F.C.A. ; ECHEVERRYGARAY, S. Yeast breeding for fuel production. In: STEWART, G.C.; RUSSELL, I.; KLEIN, R.D.; HIEBSCH, R.R. (Ed.). **Biological research on industrial yeasts**. Boca Raton: CRC Press, 1987. v. 1, p.59-79.

THORNER, J. Pheromonal regulation of development in *Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERNN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. (Ed.). **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: life cycle inheritance**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981. p.143-180.

UETZ, P. ; GIOT, L. ; CAGNEY, G. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 403, p.10, 2000.

WLOCH, D.M. ; BORTS, R. H. ; KORONA, R. Epistatic interactions of spontaneous mutations in haploid strains of the yeast *Saccharomyces*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 14, n. 2, p. 310-316, 2001.

WOLF, J.B. Gene interactions from maternal effects. **Evolution**, v. 54, n. 6, p. 1882-1898, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

1º Repetição

Tratamento	0 Hora	2 Horas	4 Horas	6 Horas	8 Horas
FF	0.1021	0.1225	0.2698	0.6402	1.1802
HCP II-5A	0.0822	0.0983	0.1123	0.1523	0.2241
HCP II-3B	0.1660	0.1898	0.3562	0.6792	1.2078
GRF-18	0.1974	0.2014	0.3691	0.6977	1.1105
HCPA VI	0.0084	0.0097	0.0059	0.0149	0.0439
HCPAVI-1A	0.1422	0.1606	0.2408	0.4206	0.7598
HCPAVI-1B	0.0381	0.0741	0.1852	0.4039	0.0000
HCPAVI-1C	0.1787	0.1818	0.2946	0.6081	1.1115
HCPAVI-1D	0.0489	0.1116	0.2581	0.5205	0.9828
HCPAVI-2A	0.0987	0.1638	0.3483	0.6759	1.1557
HCPAVI-2B	0.0592	0.0968	0.2328	0.5445	1.0330
HCPAVI-2C	0.1126	0.1329	0.2328	0.5161	0.8940
HCPAVI-2D	0.0202	0.0129	0.0175	0.0180	0.0215
HCPAVI-4A	0.1151	0.1382	0.2495	0.4647	0.8277
HCPAVI-4B	0.1316	0.1298	0.2490	0.5454	1.0261
HCPAVI-4C	0.1427	0.1860	0.2812	0.5399	0.7613
HCPAVI-4D	0.0699	0.1539	0.3545	0.7725	1.2347

1º Repetição

<u>Tratamento</u>	<u>0 Hora</u>	<u>2 Horas</u>	<u>4 Horas</u>	<u>6 Horas</u>	<u>8 Horas</u>
HCPAVI-5A	0.1555	0.1975	0.3404	0.5160	0.9230
HCPAVI-5B	0.1242	0.1349	0.3836	0.5322	0.8199
HCPAVI-5C	0.0189	0.0348	0.0816	0.1916	0.4589
HCPAVI-5D	0.0190	0.0302	0.0633	0.1624	0.4200
HCPAVI-6A	0.1207	0.2210	0.4132	0.6986	1.1019
HCPAVI-6B	0.1131	0.1209	0.3998	0.7236	1.0289
HCPAVI-6C	0.0913	0.1362	0.4082	0.9764	1.4608
HCPAVI-6D	0.1703	0.2097	0.4472	0.8887	1.4497
REVI / 1B-GR	0.1162	0.2730	0.7177	1.1857	1.4343
REVI / 1C-HII	0.0184	0.3274	0.7651	1.2350	1.5648
REVI / 1D-GR	0.0181	0.0162	0.0163	0.0319	0.0471
REVI / 1A-HII	0.1751	0.2948	0.5986	0.7896	0.9203
INVI / 1A-1B	0.1169	0.2875	0.5513	1.2545	1.5208
INVI / 1B-1C	0.1238	0.3849	0.9768	1.4441	1.5576
INVI / 1C-1D	0.1389	0.2851	0.7619	1.2957	1.5527
INVI / 1D-1A	0.1357	0.1836	0.3855	0.7346	1.2871

1º Repetição

<u>Tratamento</u>	<u>0 Hora</u>	<u>2 Horas</u>	<u>4 Horas</u>	<u>6 Horas</u>	<u>8 Horas</u>
REVI / 2A-GR	0.1371	0.3224	0.7932	1.2507	1.5587
REVI / 2B-HII	0.1073	0.1636	0.3615	0.5611	0.9547
REVI / 2C-GR	0.0927	0.1707	0.3975	0.8070	1.2279
REVI / 2D-HII	0.1120	0.1522	0.3539	0.5340	0.6992
REVI / 4A-HII	0.1551	0.3084	0.7847	1.3559	1.5812
REVI / 4B-GR	0.2047	0.3187	0.7874	1.3444	1.5818
REVI / 4C-HII	0.1722	0.2956	0.6853	1.2898	1.5419
REVI / 4D-GR	0.1971	0.3275	0.7251	1.1114	1.3793
INVI / 4A-4C	0.2238	0.3761	0.6728	1.2301	1.5208
INVI / 4B-4D	0.1339	0.2874	0.7402	1.3376	1.6289
INVI / 4C-4B	0.1663	0.1726	0.3503	0.6746	1.1587
INVI / 4D-4A	0.1272	0.2384	0.6133	1.1679	1.5592
REVI / 5A-GR	0.1098	0.2106	0.5167	0.9778	1.3896
REVI / 5B-GR	0.1438	0.2273	0.6093	1.1427	1.4426
REVI / 5C-HII	0.1327	0.2855	0.7925	1.3593	1.5404
REVI / 5D-HII	0.1656	0.2752	0.8162	1.2918	1.5372

1º Repetição

<u>Tratamento</u>	<u>0 Hora</u>	<u>2 Horas</u>	<u>4 Horas</u>	<u>6 Horas</u>	<u>8 Horas</u>
INVI / 5A-5C	0.2025	0.3174	0.7111	1.1400	1.4736
INVI / 5B-5C	0.1758	0.2782	0.6875	1.0843	1.4963
INVI / 5D-5A	0.1652	0.2471	0.6729	0.1116	0.1689
INVI / 5B-5D	0.1554	0.2219	0.6198	0.8642	1.0330
REVI / 6A-GR	0.0656	0.2314	0.5433	0.9908	1.2739
REVI / 6B-GR	0.1034	0.1869	0.4992	1.0321	1.3231
REVI / 6C-HII	0.1347	0.2359	0.6569	1.2481	1.6618
REVI / 6D-HII	0.1864	0.2974	0.6892	1.1757	1.6302
INVI / 6A-6C	0.0029	0.4281	0.9686	1.3807	1.6549
INVI / 6B-6D	0.2031	0.2474	0.5709	1.1059	1.3361
INVI / 6C-6B	0.1880	0.2697	0.6146	1.1639	1.4970
INVI / 6D-6A	0.2212	0.2584	0.5902	1.1782	1.4398

2º Repetição

<u>Tratamento</u>	<u>0 Hora</u>	<u>2 Horas</u>	<u>4 Horas</u>	<u>6 Horas</u>	<u>8 Horas</u>
FF	0.1954	0.1852	0.3589	0.7832	1.2968
HCP II-5A	0.2032	0.2358	0.2896	0.3553	0.4747
HCP II-3B	0.4209	0.3148	0.4381	0.7429	1.2965
GRF-18	0.2745	0.2686	0.3968	0.7331	1.1657
HCPA VI	0.1863	0.2710	0.4396	0.9364	1.4882
HCPAVI-1A	0.2613	0.3892	0.7864	1.3554	1.5370
HCPAVI-1B	0.2326	0.2036	0.3077	0.5523	1.0803
HCPAVI-1C	0.3301	0.2929	0.3682	0.6184	1.0601
HCPAVI-1D	0.2119	0.2546	0.4157	0.7003	1.1179
HCPAVI-2A	0.3302	0.4210	0.7999	0.1125	1.2589
HCPAVI-2B	0.2137	0.2159	0.3214	0.4358	0.9500
HCPAVI-2C	0.2386	0.2742	0.4345	0.7724	1.0284
HCPAVI-2D	0.2636	0.2561	0.3353	0.5244	0.9821
HCPAVI-4A	0.2993	0.3394	0.5227	0.8731	1.3149
HCPAVI-4B	0.1741	0.1592	0.2205	0.4091	0.8364
HCPAVI-4C	0.0684	0.0494	0.0504	0.0907	0.7045
HCPAVI-4D	0.2286	0.2211	0.3544	0.5918	1.0989

2º Repetição

Tratamento	0 Hora	2 Horas	4 Horas	6 Horas	8 Horas
HCPAVI-5A	0.3164	0.3261	0.4916	0.8324	1.2636
HCPAVI-5B	0.1945	0.2417	0.8138	1.2132	1.4431
HCPAVI-5C	0.3205	0.2489	0.3549	0.6310	1.1030
HCPAVI-5D	0.1258	0.1602	0.3997	0.7798	0.1283
HCPAVI-6A	0.2733	0.2464	0.4186	0.8023	1.2718
HCPAVI-6B	0.1441	0.1234	0.4253	1.0057	1.4074
HCPAVI-6C	0.1377	0.1417	0.4027	0.4562	0.9559
HCPAVI-6D	0.3574	0.3479	0.6405	1.1240	1.5902
REVI / 1B-GR	0.1266	0.1593	0.2279	0.4121	0.7909
REVI / 1C-HII	0.1358	0.1659	0.2744	0.5660	0.9444
REVI / 1D-GR	0.3607	0.4437	1.0327	1.4898	1.7090
REVI / 1A-HII	0.2825	0.3977	0.8101	1.0290	1.1744
INVI / 1A-1B	0.1398	0.1842	0.4099	1.0021	1.3453
INVI / 1B-1C	0.2887	0.2172	0.4856	1.0897	1.4270
INVI / 1C-1D	0.1539	0.2044	0.4919	1.1163	1.4453
INVI / 1D-1A	0.1515	0.2770	0.6135	1.2337	1.6154

2º Repetição

<u>Tratamento</u>	<u>0 Hora</u>	<u>2 Horas</u>	<u>4 Horas</u>	<u>6 Horas</u>	<u>8 Horas</u>
REVI / 2A-GR	0.1642	0.2951	0.4325	0.9727	1.3250
REVI / 2B-HII	0.1270	0.2297	0.5129	1.0277	1.3970
REVI / 2C-GR	0.1153	0.1608	0.2962	0.6098	1.0392
REVI / 2D-HII	0.1754	0.2332	0.4988	0.6338	0.7841
REVI / 4A-HII	0.1563	0.2206	0.5235	1.1604	1.4767
REVI / 4B-GR	0.1568	0.2291	0.5549	1.1962	1.5116
REVI / 4C-HII	0.1338	0.2082	0.5153	1.1267	1.4524
REVI / 4D-GR	0.1385	0.2017	0.4679	1.0147	1.2062
INVI / 4A-4C	0.1068	0.2069	0.3454	0.5825	0.7829
INVI / 4B-4D	0.1428	0.1677	0.3499	0.8985	1.3203
INVI / 4C-4B	0.1518	0.2013	0.4674	1.0912	1.4367
INVI / 4D-4A	0.1721	0.1731	0.3338	0.8040	1.2503
REVI / 5A-GR	0.1259	0.1664	0.2722	0.4988	0.7805
REVI / 5B-GR	0.1689	0.2305	0.5044	1.0578	1.3628
REVI / 5C-HII	0.1374	0.1851	0.4127	0.9853	1.3982
REVI / 5D-HII	0.1212	0.2265	0.5484	1.1625	1.4575
INVI / 5A-5C	0.1290	0.2179	0.5382	1.1606	1.4129

2º Repetição

Tratamento	0 Hora	2 Horas	4 Horas	6 Horas	8 Horas
INVI / 5B-5C	0.1472	0.1857	0.4019	0.9476	1.3190
INVI / 5D-5A	0.1471	0.1674	0.3710	0.8981	1.3256
INVI / 5B-5D	0.1333	0.1954	0.2921	0.6992	1.1770
REVI / 6A-GR	0.1368	0.2100	0.4148	0.9024	1.2668
REVI / 6B-GR	0.1150	0.1689	0.3660	0.9111	1.2098
REVI / 6C-HII	0.1494	0.1739	0.3310	0.7628	1.2238
REVI / 6D-HII	0.1538	0.1916	0.4389	0.9674	1.4072
INVI / 6A-6C	0.1242	0.1549	0.3344	0.8903	1.4016
INVI / 6B-6D	0.1618	0.2333	0.5519	1.0616	1.3502
INVI / 6C-6B	0.1626	0.2537	0.5658	1.0983	1.4974
INVI / 6D-6A	0.1743	0.2571	0.5707	1.2524	1.4680

3º Repetição

<u>Tratamento</u>	<u>0 Hora</u>	<u>2 Horas</u>	<u>4 Horas</u>	<u>6 Horas</u>	<u>8 Horas</u>
FF	0.1257	0.1392	0.1743	0.3623	0.7865
HCP II-5A	0.2137	0.2020	0.2474	0.3063	0.4117
HCP II-3B	0.1302	0.1393	0.2555	0.4336	0.8146
GRF-18	0.2397	0.2016	0.3272	0.6002	1.0291
HCPA VI	0.0300	0.0493	0.4737	1.0358	1.3914
HCPAVI-1A	0.1266	0.1951	0.3586	0.6929	1.0782
HCPAVI-1B	0.0924	0.1173	0.2479	0.5082	1.0022
HCPAVI-1C	0.1297	0.1759	0.4204	0.8599	0.1363
HCPAVI-1D	0.0945	0.0941	0.1732	0.3528	0.7194
HCPAVI-2A	0.1288	0.1371	0.2463	0.4516	0.8578
HCPAVI-2B	0.0848	0.0937	0.1820	0.3813	0.7805
HCPAVI-2C	0.1179	0.1607	0.2611	0.5142	0.8239
HCPAVI-2D	0.1824	0.1649	0.2203	0.3514	0.6927
HCPAVI-4A	0.1263	0.1859	0.3446	0.6719	1.2789
HCPAVI-4B	0.0989	0.1608	0.3703	0.7635	1.2461
HCPAVI-4C	0.2850	0.3183	0.5822	0.8336	1.3170

3º Repetição

<u>Tratamento</u>	<u>0 Hora</u>	<u>2 Horas</u>	<u>4 Horas</u>	<u>6 Horas</u>	<u>8 Horas</u>
HCPAVI-4D	0.0850	0.1208	0.1922	0.3909	0.7942
HCPAVI-5A	0.1191	0.1305	0.2031	0.2976	0.4842
HCPAVI-5B	0.0754	0.2539	1.0586	1.4060	1.5965
HCPAVI-5C	0.1029	0.1465	0.3306	0.6612	1.1308
HCPAVI-5D	0.0998	0.0944	0.1543	0.2933	0.6506
HCPAVI-6A	0.1129	0.1213	0.2147	0.4007	0.7756
HCPAVI-6B	0.1181	0.1671	0.7785	1.1041	1.2423
HCPAVI-6C	0.0903	0.0932	0.1638	0.5202	1.1014
HCPAVI-6D	0.1773	0.1489	0.2425	0.4520	0.8729
REVI / 1B-GR	0.1273	0.1509	0.2567	0.5408	1.0549
REVI / 1C-HII	0.1470	0.1590	0.2318	0.3926	0.6980
REVI / 1D-GR	0.3131	0.2635	0.2679	0.5359	1.0361
REVI / 1A-HII	0.1441	0.1699	0.3507	0.6012	0.8396
INVI / 1A-1B	0.1485	0.1853	0.4066	0.8563	1.2890
INVI / 1B-1C	0.1650	0.2175	0.4792	0.9965	1.3986
INVI / 1C-1D	0.1409	0.1827	0.3963	0.8609	1.3368

3º Repetição

<u>Tratamento</u>	<u>0 Hora</u>	<u>2 Horas</u>	<u>4 Horas</u>	<u>6 Horas</u>	<u>8 Horas</u>
INVI / 1D-1A	0.1440	0.2591	0.5785	1.1515	1.5997
REVI / 2A-GR	0.1437	0.1971	0.3429	0.7036	1.1539
REVI / 2B-HII	0.1247	0.2263	0.4999	0.9442	1.3990
REVI / 2C-GR	0.1103	0.1665	0.3278	0.6321	1.0671
REVI / 2D-HII	0.1330	0.1831	0.3893	0.6921	0.8662
REVI / 4A-HII	0.1476	0.1960	0.4594	0.9557	1.4324
REVI / 4B-GR	0.1399	0.1822	0.3903	0.8485	1.3923
REVI / 4C-HII	0.1243	0.1397	0.2942	0.6744	1.2044
REVI / 4D-GR	0.1382	0.1777	0.3786	0.8007	1.1780
INVI / 4A-4C	0.1181	0.2150	0.4045	0.7050	1.0144
INVI / 4B-4D	0.1390	0.1661	0.3306	0.7515	1.2764
INVI / 4C-4B	0.1352	0.1542	0.2970	0.6714	1.2084
INVI / 4D-4A	0.1548	0.1708	0.3112	0.6455	1.2032
REVI / 5A-GR	0.1172	0.1923	0.4844	0.6415	0.8964
REVI / 5B-GR	0.1323	0.1887	0.4104	0.8195	1.2730
REVI / 5C-HII	0.1467	0.2251	0.4173	0.8897	1.3673
REVI / 5D-HII	0.1263	0.1737	0.3766	0.8137	1.3268

3º Repetição

Tratamento	0 Hora	2 Horas	4 Horas	6 Horas	8 Horas
INVI / 5A-5C	0.1329	0.1812	0.4029	0.8788	1.3459
INVI / 5B-5C	0.1504	0.1915	0.4070	0.8158	1.2960
INVI / 5D-5A	0.1387	0.3054	0.9227	1.3698	1.5552
INVI / 5B-5D	0.1244	0.1701	0.3540	0.6502	0.8936
REVI / 6A-GR	0.1229	0.1779	0.3241	0.5774	1.0451
REVI / 6B-GR	0.1227	0.1226	0.3322	0.7310	1.1706
REVI / 6C-HII	0.1496	0.1456	0.2511	0.5143	1.0104
REVI / 6D-HII	0.1335	0.2083	0.4388	0.9315	1.3908
INVI / 6A-6C	0.1077	0.1372	0.3034	0.9063	1.4765
INVI / 6B-6D	0.1592	0.2200	0.5587	1.0970	1.3384
INVI / 6C-6B	0.1732	0.1829	0.4680	1.2287	1.4985
INVI / 6D-6A	0.1777	0.2171	0.5331	1.1161	1.3906

4º Repetição

<u>Tratamento</u>	<u>0 Hora</u>	<u>2 Horas</u>	<u>4 Horas</u>	<u>6 Horas</u>	<u>8 Horas</u>
FF	0.1099	0.1989	0.4481	1.1128	1.4546
HCP II-5A	0.2221	0.2577	0.3254	0.4301	0.5247
HCP II-3B	0.2862	0.7024	1.2599	1.5421	1.6989
GRF-18	0.2715	0.3995	0.6302	1.1665	1.4287
HCPA VI	0.2472	0.2764	0.4740	1.0573	1.4335
HCPAVI-1A	0.1890	0.5220	1.1293	1.4412	1.5065
HCPAVI-1B	0.1489	0.1951	0.3844	0.7572	1.3158
HCPAVI-1C	0.2195	0.2259	0.4352	0.8612	1.3719
HCPAVI-1D	0.1215	0.1484	0.2517	0.4744	0.9089
HCPAVI-2A	0.2085	0.2404	0.4551	0.8347	1.3108
HCPAVI-2B	0.2035	0.3896	0.6304	1.3109	1.4248
HCPAVI-2C	0.1344	0.2129	0.3741	0.721	1.1325
HCPAVI-2D	0.1228	0.2059	0.4131	0.8099	1.3527
HCPAVI-4A	0.4065	0.5566	1.1438	1.4399	1.5252
HCPAVI-4B	0.1494	0.2381	0.7318	1.2091	1.4553
HCPAVI-4C	0.2528	0.6291	1.1979	1.4909	1.5779

4º Repetição

Tratamento	0 Hora	2 Horas	4 Horas	6 Horas	8 Horas
HCPAVI-4D	0.1332	0.6118	1.2989	1.4412	1.5008
HCPAVI-5A	0.1093	0.1752	0.6635	1.1549	1.4371
HCPAVI-5B	0.2258	0.3382	1.0545	1.3562	1.5203
HCPAVI-5C	0.1538	0.2155	0.4094	0.7695	1.2134
HCPAVI-5D	0.1238	0.1994	0.4952	1.0926	1.4024
HCPAVI-6A	0.1455	0.1904	0.3712	0.5871	0.8934
HCPAVI-6B	0.0659	0.2215	0.8443	1.0627	1.1921
HCPAVI-6C	0.1152	0.1573	0.3810	0.6305	1.1861
HCPAVI-6D	0.1623	0.2174	0.4012	0.7172	1.2171
REVI / 1B-GR	0.1537	0.1673	0.2584	0.5111	1.0140
REVI / 1C-HII	0.1476	0.1524	0.2122	0.3848	0.7726
REVI / 1D-GR	0.2246	0.2088	0.2442	0.3477	0.7051
REVI / 1A-HII	0.1954	0.2184	0.4187	0.7292	0.9098
INVI / 1A-1B	0.1478	0.1836	0.3000	0.6671	1.1436
INVI / 1B-1C	0.1741	0.2104	0.3705	0.8015	1.3850
INVI / 1C-1D	0.1729	0.1843	0.2866	0.6136	1.1844

4º Repetição

<u>Tratamento</u>	<u>0 Hora</u>	<u>2 Horas</u>	<u>4 Horas</u>	<u>6 Horas</u>	<u>8 Horas</u>
INVI / 1D-1A	0.1623	0.2487	0.5525	1.0648	1.5798
REVI / 2A-GR	0.1780	0.2016	0.3094	0.6037	1.1065
REVI / 2B-HII	0.1262	0.2124	0.4521	0.8776	1.3247
REVI / 2C-GR	0.1299	0.1850	0.3105	0.6900	1.1819
REVI / 2D-HII	0.1717	0.2247	0.3502	0.5802	1.3205
REVI / 4A-HII	0.1605	0.1912	0.3491	0.7784	1.3433
REVI / 4B-GR	0.1548	0.1943	0.3215	0.6813	1.2460
REVI / 4C-HII	0.1502	0.1758	0.2740	0.5795	1.1360
REVI / 4D-GR	0.1660	0.1740	0.2812	0.6291	1.1139
INVI / 4A-4C	0.1073	0.1879	0.3422	0.6369	0.9451
INVI / 4B-4D	0.1448	0.1704	0.2605	0.5674	1.1038
INVI / 4C-4B	0.1594	0.1787	0.2704	0.5627	1.1127
INVI / 4D-4A	0.1803	0.1992	0.2877	0.5524	1.1248
REVI / 5A-GR	0.1096	0.1418	0.1829	0.2875	0.4518
REVI / 5B-GR	0.1388	0.1931	0.3774	0.7763	1.2515
REVI / 5C-HII	0.1758	0.2015	0.3317	0.7215	1.2585

4º Repetição

Tratamento	0 Hora	2 Horas	4 Horas	6 Horas	8 Horas
REVI / 5D-HII	0.1421	0.1783	0.3039	0.6474	1.1894
INVI / 5A-5C	0.1510	0.1880	0.3242	0.7469	1.2972
INVI / 5B-5C	0.1648	0.1902	0.3017	0.6322	1.1721
INVI / 5D-5A	0.1858	0.4142	1.0301	1.3476	1.5765
INVI / 5B-5D	0.1805	0.2547	0.6357	0.9611	1.2320
REVI / 6A-GR	0.1373	0.1966	0.3976	0.9957	1.4957
REVI / 6B-GR	0.1441	0.1655	0.2408	0.5029	1.0141
REVI / 6C-HII	0.1503	0.1659	0.2431	0.4975	0.9873
REVI / 6D-HII	0.1561	0.1959	0.3557	0.7859	1.2799
INVI / 6A-6C	0.1164	0.2413	0.8248	1.3972	1.6107
INVI / 6B-6D	0.1773	0.1856	0.4702	0.9796	1.3163
INVI / 6C-6B	0.1586	0.1705	0.4282	1.1383	1.3215
INVI / 6D-6A	0.2031	0.2026	0.5449	1.2607	1.5361

Médias de todos os tratamentos, a partir das quatro repetições (medidas de tempo, em horas):

Tratamento	1 Rep.	2 Rep.	3 Rep.	4 Rep.	Média 4R.
FF	1.6150	2.0190	1.9072	1.7182	1.8149
HCP II-5A	4.5803	4.8167	4.7189	5.0025	4.7796
HCP II-3B	2.2168	2.5060	2.2131	2.3884	2.3311
GRF-18	2.1917	2.2734	2.3002	2.2664	2.2579
HCPA VI	1.5064	1.8454	1.7837	1.7395	1.7187
HCPAVI-1A	2.3598	1.9840	2.1186	1.8084	2.0677
HCPAVI-1B	1.5234	2.0800	1.8649	2.0577	1.8815
HCPAVI-1C	1.9256	2.5891	1.6017	2.0446	2.0403
HCPAVI-1D	1.6644	2.6757	1.9615	2.1463	2.1120
HCPAVI-2A	1.8498	2.1742	2.1751	2.1866	2.0964
HCPAVI-2B	1.5903	1.7907	1.8869	1.9061	1.7935
HCPAVI-2C	1.7529	2.4257	2.0592	2.1269	2.0912
HCPAVI-2D	2.0298	2.2241	2.0562	2.0042	2.0786
HCPAVI-4A	2.2438	2.7201	2.0899	1.9375	2.2478
HCPAVI-4B	1.7798	1.9514	1.6730	1.8075	1.8029
HCPAVI-4C	2.1396	2.3751	2.3111	2.1668	2.2482

Médias de todos os tratamentos, a partir das quatro repetições (medidas de tempo, em horas):

Tratamento	1 Rep.	2 Rep.	3 Rep.	4 Rep.	Média 4R.
HCPAVI-4D	1.6725	2.2548	1.9657	1.8536	1.9367
HCPAVI-5A	2.3997	2.6498	2.8670	2.4424	2.5897
HCPAVI-5B	1.3353	1.1495	0.9774	1.2272	1.1723
HCPAVI-5C	1.6349	2.4250	1.7146	2.1746	1.9873
HCPAVI-5D	1.4687	1.5263	1.7516	1.5341	1.5702
HCPAVI-6A	2.2307	2.1451	2.1130	2.0903	2.1448
HCPAVI-6B	1.1668	1.1278	0.9069	1.0429	1.0611
HCPAVI-6C	1.2714	1.3361	1.2076	1.5775	1.3481
HCPAVI-6D	1.8427	2.2865	2.1204	2.2776	2.1318
REVI / 1B-GR	2.7797	2.3558	1.8728	2.0460	2.2636
REVI / 1C-HII	2.9145	1.9275	2.6484	2.0021	2.3731
REVI / 1D-GR	1.9255	1.6519	2.0127	1.9738	1.8910
REVI / 1A-HII	1.9702	1.9615	1.9256	2.1442	2.0004
REVI / 2A-GR	1.5501	1.7218	1.9415	2.0877	1.8253
REVI / 2B-HII	1.7601	1.7372	1.7608	1.8473	1.7764
REVI / 2C-GR	1.6509	1.9326	2.0601	1.7476	1.8478
REVI / 2D-HII	1.6538	1.8354	1.8500	1.6969	1.7590

Médias de todos os tratamentos, a partir das quatro repetições (medidas de tempo, em horas):

<u>Tratamento</u>	<u>1 Rep.</u>	<u>2 Rep.</u>	<u>3 Rep.</u>	<u>4 Rep.</u>	<u>Média 4R.</u>
REVI / 4A-HII	1.4943	1.6148	1.6383	1.7403	1.6219
REVI / 4B-GR	1.5429	1.5775	1.7970	1.8582	1.6939
REVI / 4C-HII	1.6596	1.5399	1.6822	1.8631	1.6862
REVI / 4D-GR	1.7557	1.8028	1.8631	1.7331	1.7887
REVI / 5A-GR	1.5549	1.5875	1.5105	1.5461	1.5498
REVI / 5B-GR	2.2192	1.7820	1.7961	1.9349	1.9330
REVI / 5C-HII	1.3669	1.7820	1.8433	1.7958	1.6970
REVI / 5D-HII	1.2836	1.6036	1.8114	1.8453	1.6360
REVI / 6A-GR	1.6350	1.7954	1.6854	1.5202	1.6590
REVI / 6B-GR	1.4205	1.5301	1.4000	1.8950	1.5614
REVI / 6C-HII	1.3626	1.6715	1.9464	1.9487	1.7323
<u>REVI / 6D-HII</u>	<u>1.6604</u>	<u>1.6836</u>	<u>1.8539</u>	<u>1.7604</u>	<u>1.7396</u>

APÊNDICE 2: Curva de crescimento referente ao tratamento REVI/2AGR na primeira repetição.

Na curva de crescimento acima, o valor de densidade óptica 0,3224 corresponde ao valor **B** na expressão utilizada para o cálculo da velocidade máxima de crescimento (abaixo) e delimita o início da fase exponencial de crescimento da cultura celular.

O valor de densidade óptica 0,7932 corresponde ao valor **b** da mesma expressão e delimita o final da fase exponencial de crescimento da cultura celular.

$$\text{Velocidade Máxima} = \frac{2}{(\text{Log } b/B) \times 3,3}, \text{ logo: } V_{\text{máx}} = 1,5501 \text{ Horas.}$$