

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
PPGBIOTEC

Dissertação

**Identificação de genes
envolvidos na tolerância ao
alumínio em *Saccharomyces
cerevisiae***

Ludmila da Conceição Ferreira

Ouro Preto
2022



UFOP

Ludmila da Conceição Ferreira

Identificação de genes envolvidos na tolerância ao alumínio em *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia Industrial

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Izinara Rosse

Coorientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão

Coorientador: Prof. Dr. Aureliano Claret da Cunha

Ouro Preto – Minas Gerais

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

F383i Ferreira, Ludmila Da Conceição.
Identificação de genes envolvidos na tolerância ao alumínio em
Saccharomyces cerevisiae. [manuscrito] / Ludmila Da Conceição Ferreira.
- 2022.

64 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Izinara Rosse da Cruz.

Coorientadores: Prof. Dr. Aureliano Claret Da Cunha, Prof. Dr. Rogelio
Lopes Brandão.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro
Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

1. Mapeamento de QTL. 2. Leveduras. 3. Variantes genéticas. 4.
Tolerância ao alumínio. I. Brandão, Rogelio Lopes. II. Da Cunha, Aureliano
Claret. III. da Cruz, Izinara Rosse. IV. Universidade Federal de Ouro Preto.
V. Título.

CDU 604

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



FOLHA DE APROVAÇÃO

Ludmila da Conceição Ferreira

Identificação de genes envolvidos na tolerância ao alumínio em *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Aprovada em 08 de setembro de 2022

Membros da banca

Profa. Dra. Izinara Rosse da Cruz - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão - Coorientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Dr. Aureliano Claret da Cunha - Coorientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Profa. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhaes - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Fernanda Godoy Santos- Queen's University of Belfast

Izinara Rosse da Cruz, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 13/12/2022



Documento assinado eletronicamente por **Izinara Rosse da Cruz, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 13/12/2022, às 08:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0442047** e o código CRC **CD6697D2**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço as agências de fomento FAPEMIG, CAPES e CNPQ pelo financiamento do projeto e pela contribuição com crescimento da ciência brasileira.

Agradeço à instituição de ensino Universidade Federal de Ouro Preto, à Pró-reitoria de pesquisa e Pós-graduação da UFOP, ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, a Universidade Federal de Ouro Preto, ao NUPEB e aos professores do NUPEB.

Agradeço à minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Izinara Rosse pelos ensinamentos, paciência e incentivo durante o desenvolvimento desse projeto, aos meus coorientadores Dr. Aureliano Claret da Cunha e Dr. Rogelio Lopes Brandão por todo conhecimento compartilhado, vocês foram peças fundamentais para meu crescimento profissional.

Agradeço aos meus colegas do laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) em especial, Débora Faria, Patrícia Patres, Anna Clara Campos, Marcos Oliveira, Margarete Saraiva, Elisa Barreto, Bianca Peixoto por todo apoio. À querida Zezé, pela disponibilidade, carinho e alegria.

Agradeço aos meus amigos de Diamantina, amigos que conheci durante a graduação e pós-graduação e, por fim agradeço aos meus familiares, sobrinhos, amigos e ao meu namorado pelo apoio, sensibilidade e compreensão. Em especial minha querida mãe Emilia, por sempre me incentivar e me aconselhar nos momentos difíceis, obrigada pelo apoio, orações e amor de sempre.

RESUMO

A produção de etanol combustível representa um importante papel na economia de vários países, sendo os Estados Unidos, Brasil e China os maiores produtores mundiais. O bioetanol é um combustível renovável, sendo o biocombustível mais consumido no Brasil. A síntese do etanol é normalmente realizada com a obtenção de uma solução de açúcares, que são fermentados para produzir etanol, sendo este separado por destilação e purificado. A principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica em leveduras é a glicólise. Diversos fatores fisiológicos podem influenciar no desempenho fermentativo da *Saccharomyces cerevisiae*, como o estresse osmótico, o estresse ácido, a contaminação bacteriana e a presença de níveis tóxicos de alumínio. Em virtude da fermentação ocorrer em condições ácidas, o alumínio, absorvido pela cana-de-açúcar em solos ácidos, provoca sérios problemas durante a fermentação. As cepas de leveduras industriais diferem bastante em relação à tolerância ao alumínio e, considerando o potencial de aplicação biotecnológica das leveduras, se faz necessário um estudo das bases genéticas envolvidas nesse fenótipo de tolerância. Neste contexto, o objetivo do presente projeto foi identificar no genoma da *Saccharomyces cerevisiae* genes que possam estar envolvidos na tolerância ao alumínio. Desse modo, localizou-se os genes presentes na região do *QTL* no cromossomo VI apontados por Mezadri (2018), envolvidos na tolerância ao alumínio em *S. cerevisiae* e avaliou-se a tolerância ao alumínio por meio de testes de crescimento contendo diferentes concentrações de alumínio. Para verificar se os genes candidatos a estarem envolvidos com a tolerância ao alumínio carregavam variantes genéticas que poderiam estar associadas ao fenótipo de interesse, as sequências de nucleotídeos desses genes foram alinhadas utilizando a ferramenta online Clustal Omega, para visualização e análise do alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos utilizou-se o programa Jalview 2 e para visualização das variantes genéticas utilizou-se a ferramenta IGV. Nossos resultados indicaram envolvimento de 18 genes com a tolerância ao alumínio e três tipos variantes genéticas sendo elas sinônima, missense e sem sentido, que permitem estudo de modificação de SNV. Além disso, nossos resultados fornecem dados promissores para melhoramento de cepas industriais para produção de bioetanol.

Palavras-chave: Mapeamento de *QTL*, Leveduras, Variantes genéticas, tolerância ao alumínio, Fermentação.

ABSTRACT

The production of fuel ethanol plays an important role in the economy of several countries, with the United States, Brazil and China being the world's largest producers. Bioethanol is a renewable fuel, being the most consumed biofuel in Brazil. The synthesis of ethanol is normally carried out by obtaining a solution of sugars, which are fermented to produce ethanol, being separated by distillation and purified. The main metabolic pathway involved in alcoholic fermentation in yeast is glycolysis. Several physiological factors can influence the fermentative performance of *Saccharomyces cerevisiae*, like osmotic stress, the acid stress, bacterial contamination and the presence of toxic levels of aluminum. Because fermentation takes place in acidic conditions, the aluminum, absorbed by sugarcane in acidic soils, causes serious problems during fermentation. Industrial yeast strains differ greatly in tolerance to aluminum and, considering the potential biotechnological application of yeast, it is necessary to study the genetic bases involved in this tolerance phenotype. In this context, the aim of this project was to identify genes in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* that may be involved in aluminum tolerance. Thus, the genes present in the *QTL* region were located on the VI chromosomes pointed out by Mezdari (2018), involved in aluminum tolerance in *S. cerevisiae* and aluminum tolerance was evaluated by means of growth tests containing different concentrations of aluminum. To verify whether candidate genes involved in aluminum tolerance carried genetic variants that could be associated with the phenotype of interest, the nucleotide sequences of these genes were aligned using the online tool Clustal Omega, for visualization and analysis of the multiple alignment of nucleotide sequences, the program used was Jalview 2 and to visualize the genetic variants, tool IGV was used IGV. Our results indicated the involvement of 18 genes with aluminum tolerance and three types of genetic variants, which are synonymous, missense and meaningless that allow SNV modification study. Furthermore, our results provide promising data for the improvement of industrial strains for bioethanol production.

Keywords: QTL mapping, Yeasts, Genetic variants, Aluminum tolerance, Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Multiplicação celular de <i>S. cerevisiae</i>	13
Figura 2 - Rota metabólica utilizada para fermentação do etanol em <i>S. cerevisiae</i>	14
Figura 3 - Mapeamento genético dos <i>QTLs</i> envolvidos com a tolerância ao alumínio .21	
Figura 4 – Genes contido no <i>QTL</i> envolvidos com a tolerância ao alumínio nas coordenadas CHR VI 132,654 à 228.843 pb.	27
Figura 5 - Teste de crescimento com as cepas controle BY4741 e PE-2 e BY4741 Δ <i>fab1</i> na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio.....	35
Figura 7 - Teste de crescimento com as cepas BY4741 Δ <i>atg18</i> , BY4741 Δ <i>smc2</i> e BY4741 Δ <i>uli1</i> na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio	37
Figura 8 - Teste de crescimento com as cepas BY4741 Δ <i>cdc26</i> , BY4741 Δ <i>yfr018c</i> , BY4741 Δ <i>ubp6</i> e BY4741 Δ <i>rog3</i> na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio	38
Figura 9 - Teste de tolerância das cepas BY4741 Δ <i>rrt5</i> , BY4741 Δ <i>igl1</i> , BY4741 Δ <i>gsy1</i> e BY4741 Δ <i>deg1</i> na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio	39
Figura 10 - Teste de crescimento com as cepas BY4741 Δ <i>rpl29</i> , BY4741 Δ <i>gcn20</i> , BY4741 Δ <i>pes4</i> e BY4741 Δ <i>css2</i> na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio	40
Figura 11 - Teste de crescimento com as cepas BY4741 Δ <i>yfh7</i> , BY4741 Δ <i>smc1</i> e BY4741 Δ <i>loc1</i> na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio.....	41
Figura 12 - Teste de crescimento com as cepas BY4741 Δ <i>yfr006w</i> , BY4741 Δ <i>pho4</i> , e BY4741 Δ <i>yfr036w</i> na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio.	42
Figura 13: SNV detectada no gene <i>IGDI</i> na posição 182.368 pb do cromossomo VI. .45	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos 26 genes deletados em estirpes *S. cerevisiae* BY mutantes derivados da *EUROSCARF* contendo um constructo de resistência à Canamicina (*KanMX*) no lugar de cada ORF de interesse empregados neste estudo e suas respectivas funções de acordo com o banco de dados de *S. Cerevisiae*.28

Tabela 2 - *SNV* detectada nos genes *GSY1* (*YFR015C*), *DEG1*(*YFL001W*), *AIP5* (*YFR016C*), *QCR6* (*YFR033C*), *PHO4* (*YFR034C*), *ROG3* (*YFR022W*), *GCN20* (*YFR009W*), *PES4* (*YFR023W*), *CSS2* (*YFR020W*), *CMK1* (*YFR014C*), *YFR006w*, *YFR018c*, *RRT5* (*YFR032C*) no parental inferior (P2.5A), no parental superior (B8.20D) com seus respectivos aminoácidos codificado e *SNV* detectada no *pool*, superior em suas respectivas posições do cromossomo VI.47

LISTA DE SIGLAS

Proálcool	Programa Nacional do Álcool
RenovaBio	Política Nacional de Biocombustíveis
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
HK	Hexoquinase;
PGI	Fosfoglicoisomerase
PFK	Fosfofrutoquinase
FBPA	Frutose bifosfato aldolase
TPI	Triose fosfato isomerase
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
PGK	Fosfoglicerato quinase
PGM	Fosfogliceromutase
ENO	Enolase
Al ³⁺	Alumínio
PtdIns	Fosfatidilinositol
Kb	Kilobases
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
PSMs	Membranas Pró-Esporos
QTL	Quantitative trait <i>loci</i>
BSA	Segregantes Agrupados
HMM	Hidden Markov Model
SNV	Variação de nucleotídeo único
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetros
pH	Potencial Hidrogeniônico
pb	Pares De Base

Sumário

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Processamento do Bioetanol	11
1.2	Aspectos gerais da levedura <i>S. cerevisiae</i>	12
1.3	A importância da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.4	Análise poligênica por meio de mapeamento de <i>QTL</i>	15
1.5	Análise de segregantes agrupados	17
2	CONTEXTUALIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DAS CEPAS UTILIZADAS	19
3	OBJETIVO GERAL	23
3.1	Objetivos Específicos.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Meio de cultura para crescimento das cepas selecionadas.....	24
4.2	Cultivos das cepas mutantes presentes no <i>QTL</i> de resistência ao alumínio.....	24
4.3	Identificação de variantes genéticas nos genes que apresentaram tolerância ao alumínio	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1	Caracterização da região genômica correspondente ao <i>QTL</i> identificado como envolvido na tolerância ao alumínio em <i>S. cerevisiae</i>	26
5.2	Seleção dos mutantes tolerantes ao alumínio (Al^{3+})	35
5.3	Variantes genéticas observadas nos genes que apresentaram tolerância ao alumínio	44
6	CONCLUSÕES	61
7	PERSPECTIVAS.....	62
8	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Processamento do Bioetanol

O bioetanol, também denominado como álcool etílico, tornou-se o biocombustível mais utilizado no setor de transportes no Brasil (AZHAR *et al.*, 2017) desde o desenvolvimento do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) decretado em 14 de novembro de 1975 (CORTEZ, 2018).

O PROÁLCOOL, foi uma estratégia política para substituir os combustíveis derivados do petróleo, objetivando contornar os altos preços deste combustível (STOLF; OLIVEIRA, 2020) e reduzir o impacto ambiental (BOLÍVAR-TELLERIA *et al.*, 2018) gerado pela utilização de combustíveis fósseis em veículos (HALDER *et al.*, 2019). Embora o programa tenha encerrado-se em 2015 (CORTEZ, 2018), a segurança energética e a proteção ambiental continuam imprescindíveis na atualidade mundial (SINGH *et al.*, 2022).

Em dezembro de 2017 foi criado no Brasil a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio), introduzindo uma metodologia que determina compromissos ambientais e incentiva a expansão da produção de biocombustíveis e, embora o programa não tenha sido implementado integralmente, na meta 2019/2020 já foram evitadas a emissão de 14,5 milhões de toneladas de dióxido de carbono pelo setor de transportes (GRANGEIA *et al.*, 2021).

Atualmente, a produção do bioetanol tem um importante papel na economia de vários países, sendo os Estados Unidos, Brasil e China os maiores produtores mundiais (MUSSATTO *et al.*, 2010). Além disso, o bioetanol é um combustível renovável. Estudos tem demonstrado uma diminuição considerável no lançamento de poluentes na atmosfera com o seu uso (AGARWAL, 2007; CHEN *et al.*, 2011; GHAZIKHANI *et al.*, 2013; YAO *et al.*, 2013; BILLAH *et al.*, 2014), apresentando assim um papel significativo em relação à preservação do meio ambiente, uma vez que ameniza o efeito do aquecimento global e conserva os combustíveis fósseis (MALAV *et al.*, 2020).

O processamento do bioetanol de primeira geração ocorre por meio da ação fermentativa de leveduras em matérias-primas compostas principalmente por açúcares fermentáveis ou carboidratos (HALDER *et al.*, 2019), no qual, a cana-de-açúcar é a principal matéria-prima utilizada para a produção do bioetanol no Brasil por apresentar maior eficiência fermentativa e menor custo (CARPIO, R. R. 2019).

Neste processo, as leveduras utilizadas para fermentar o caldo da cana-de-açúcar são *Saccharomyces cerevisiae*, estas são recuperadas por centrifugação, submetidas a um tratamento com ácido e reutilizadas em novo ciclo fermentativo (AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. e LOPES, M. L. 2009).

1.2 Aspectos gerais da levedura *S. cerevisiae*

De acordo com a classificação taxonômica, a *S. cerevisiae* pertence ao Reino Fungi, Divisão Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Sacaromicetal, Família Saccharomycetaceae, Gênero *Saccharomyces Meyen* e Espécie *Saccharomyces cerevisiae* (CARDOSO, L. H. 2022).

Possui DNA genômico com 12.068 kilobases (kb) organizado em 16 cromossomos com cerca de 6.000 genes, dos quais, 5.570 são previstos para serem genes codificadores de proteínas (PARAPOULI, M. *et al.*, 2020). Em condições adequadas de crescimento, se replicam por brotamento antecedido por processo mitótico, dando origem a uma nova geração de células. Contudo, quando há ausência de nutrientes essenciais, as células diploides (EZOV *et al.*, 2010) sofrem meiose e esporulam (Figura 1). (PIEKARSKA *et al.*, 2010).

A esporulação envolve dois processos: a meiose e a morfogênese, no qual a meiose está relacionada a duas fases que ocorrem em sequência: meiose S e fase pré-meiótica S. As células sofrem duas divisões nucleares, meiose I e meiose II, resultando na formação de quatro esporos. Os quatro núcleos haploides formados são empacotados por membranas pró-esporos (PSMs). As PSMs sofrem uma expansão na meiose II, sendo que no momento da divisão nuclear, cada membrana envolve o núcleo celular formado, o qual será ancorado via corpo polar do fuso. A maturação ocorre com a formação da parede celular, a qual confere resistência aos esporos que são capazes de sobreviver por longos períodos em condições de estresse (PIEKARSKA *et al.*, 2010).

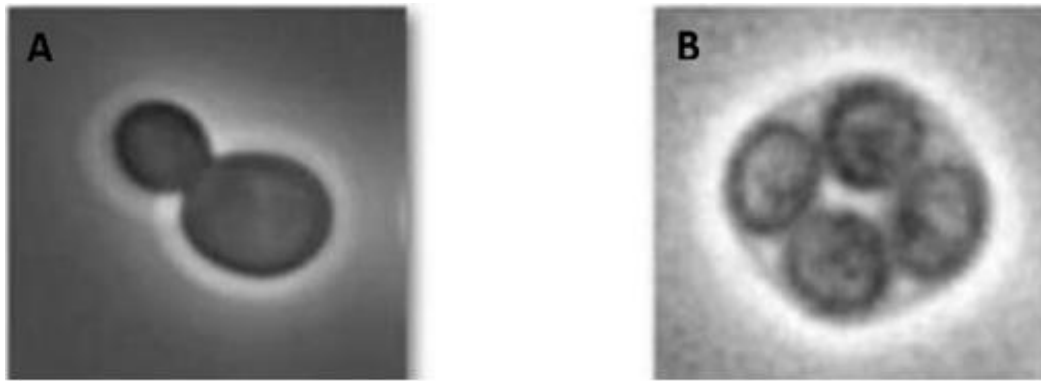


Figura 1 – Multiplicação celular de *S. cerevisiae* na presença de nutrientes, no qual a multiplicação ocorre por brotamento (A) e na ausência de nutrientes, no qual passam pelo processo de esporulação e formam ascos (B). Fonte: adaptado (KNOP, 2011).

Os esporos podem apresentar *mating type* opostos, sendo denominados Mat a ou Mat α . As células haplóides Mat a (células do tipo de acasalamento a) e Mat α (células do tipo de acasalamento α), podem dimerizar para formar o fator de transcrição Mat a/ α (ROBERTSON, C. G., CLARK-COTTON, M. R., LEW, D. J. 2021).

Mortimer (2000), acredita que a maioria das leveduras *S. cerevisiae* são homotáticas e a formação de híbridos e a capacidade de esporulação das cepas favorecem a diversidade e a evolução das espécies.

1.3 A importância da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A *S. cerevisiae* é a levedura mais empregada no setor do bioetanol, em virtude do efeito *Crabtree*, que baseia-se no fato de que mesmo em condições aeróbicas a *S. cerevisiae* não utiliza a maquinaria respiratória para metabolizar sacarídeos e promover o crescimento de biomassa, mas sim produzir etanol e outros compostos de dois carbonos, por meio da via da glicólise (PARAPOULI *et al.*, 2020), no qual, para cada molécula de glicose oxidada, duas moléculas de piruvato são produzidas, o piruvato é, então, reduzido a etanol com a liberação de CO₂ (Figura 2) (BAI, F. W.; ANDERSON, W. Q.; MOO-YOUNG, M. 2008).

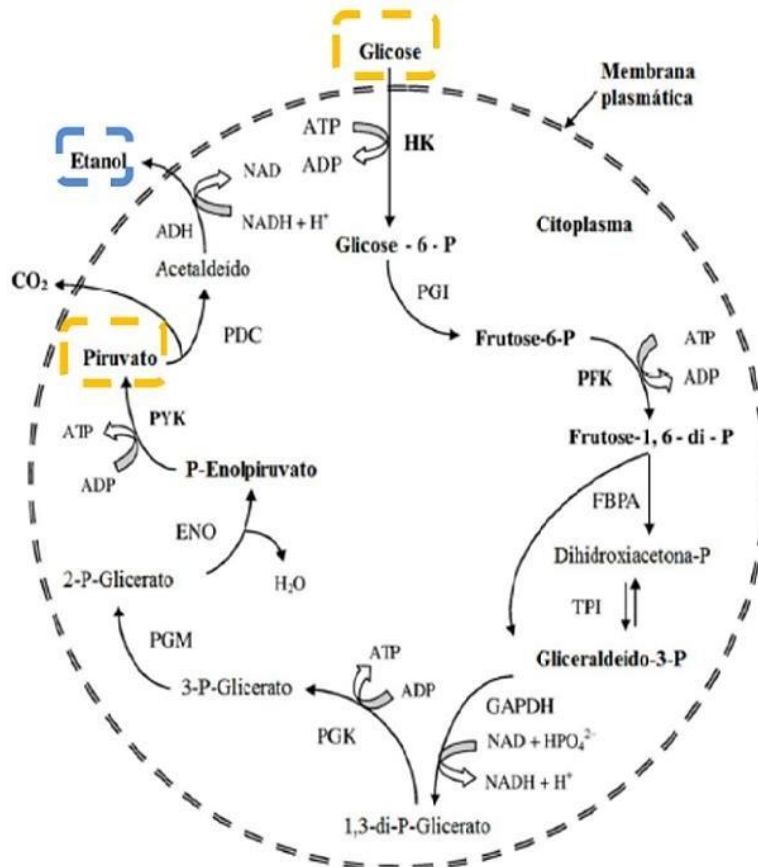


Figura 2 - Rota metabólica utilizada para fermentação do etanol em *S. cerevisiae* (Abreviações: HK: Hexoquinase; PGI: Fosfoglicoisomerase; PFK: Fosfofrutoquinase; FBPA: frutose bifosfato aldolase; TPI: triose fosfato isomerase; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK: Fosfoglicerato quinase; PGM: Fosfogliceromutase; ENO: Enolase. Fonte: Adaptado (BAI *et al.*, 2008).

No entanto, durante o processamento do bioetanol as células da levedura encontram-se sujeitas a numerosos estresses físico-químicos que podem influenciar na eficiência da fermentação, como pH, acidez do mosto, altas temperaturas, concentração elevada de etanol, alta concentração de açúcares (CARDOSO, L. H. 2022) e níveis tóxicos de alumínio (Al^{3+}) (AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. e LOPES, M. L. 2009).

O alumínio é o metal mais abundante na crosta terrestre, e pelo fato de seus íons serem mobilizados e solubilizados na forma de cátion trivalente bioativo Al^{3+} quando em pH inferior a 5,0, apresentam toxicidade para organismos vivos, plantas e microrganismos (CHEN *et al.*, 2020).

Em *S. cerevisiae* o alumínio tem como alvo vários locais celulares que resultam na ruptura da estrutura e função da parede celular, membrana plasmática, citoesqueleto e via de transdução de sinal (LI, X *et al.*, 2011). Estudos tem sido

realizados para entender como a levedura responde ao estresses a nível celular. Até o momento, sabe-se que a *S. cerevisiae* modula seu metabolismo e reprograma seus padrões de expressão gênica através das vias de proteína quinase ativada por estresse (KIM *et al.*, 2013). Mecanismos subjacentes também são apresentados, como o sistema de fosforilação com os fosfatidilinositois (PtdIns) que iniciam detecção de sinais de estresse específicos por meio de proteínas sensoras de membrana plasmática. Contudo, o mecanismo pelo qual o Al^{3+} exerce seus efeitos tóxicos em *S. cerevisiae* ainda não está muito claro (DOVE, STEPHEN *et al.*, 1997).

Embora cepas industriais de *S. cerevisiae* produzam bioetanol a partir de cana-de-açúcar com alto rendimento e produtividade, a demanda urgente de maior produção e custos mínimos ainda é desafiadora (WANG, Z.; QI, Q.; LIN, Y. *et al.*, 2019). Desse modo é essencial entender as bases genéticas por trás da tolerância ao alumínio para acelerar o desenvolvimento de uma cepa mais tolerante aos efeitos tóxicos dos íons de Al^{3+} .

1.4 Análise poligênica por meio de mapeamento de *QTL* (*Quantitative traits loci*)

O mapeamento de *QTL* é uma poderosa abordagem para identificar variantes/genes envolvidos com características quantitativas. Essa estratégia tem sido utilizada em leveduras (LITI, G.; WARRINGER, J.; BLOMBERG, A. 2017), como para a identificação de regiões envolvidas com tolerância ao etanol (SWINNEN, SCHAERLAEKENS, *et al.*, 2012; PAIS *et al.*, 2013), a altas temperaturas (MARULLO *et al.*, 2009), e a produção de composto aromáticos em bebidas (DE CARVALHO *et al.*, 2017).

O mapeamento de *QTL* tornou-se uma abordagem importante para entender mais profundamente a complexidade genômica de *S. cerevisiae* e permite investigações de características industrialmente relevantes, que permitem a descoberta de variantes genéticas envolvidas nos fenótipos de interesse (EDER *et al.*, 2020).

Características quantitativas são aquelas que possuem variação fenotípica mensurável, seja em virtude de influências genéticas, ambientais, ou ambas. No geral, envolvem participação de dois ou mais genes, no qual todos os genes atuam juntos para manifestar o fenótipo de interesse em um ou muitos *loci* simultaneamente (PAIS, T. M.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. 2014).

Porém, para localizar todos os *loci* simultaneamente o mapeamento de *QTL* necessita do emprego da técnica de segregantes agrupados (*Bulk Segregant Analysis* - BSA). (MICHELMORE, R. W., PARAN, I., KESSELI, R. 1991).

1.5 Análise de segregantes agrupados

A análise de segregantes agrupados corresponde ao agrupamento de indivíduos que apresentem o fenótipo de interesse com conseqüente componente genético responsável por tal fenótipo (PAIS *et al.*, 2014).

A análise de agrupamentos de segregantes, consiste na comparação entre dois grupos de amostras de DNA genômico de segregantes meióticos oriundos de um único híbrido e tem como finalidade, identificar marcadores moleculares em regiões específicas do genoma (MICHELMORE, R. W., PARAN, I., KESSELI, R. 1991). Essa técnica inicia-se com a seleção de duas linhagens parentais haploides, uma que possua a característica de interesse, denominada parental de fenótipo superior, e outra linhagem que não possua a característica alvo, denominada parental de fenótipo inferior. As duas linhagens devem ser cruzadas e, logo após a obtenção do híbrido diploide, são submetidas à esporulação para geração de segregantes geneticamente diferentes, resultantes de eventos de recombinação meiótica. Desse modo, os segregantes apresentarão fenótipo superior quando possuírem os determinantes genéticos para tal (BHATIA *et al.*, 2014; PAIS *et al.*, 2014; WILKENING *et al.*, 2014).

Os segregantes meióticos são classificados de acordo com a característica fenotípica. Nesse sentido, os segregantes que possuem o fenótipo de interesse são agrupados à linhagem parental superior, denominados *pool* superior, já para agrupar a linhagem inferior e *pool* inferior, um número significativo de segregantes são selecionados independentemente de seu fenótipo, de modo que ao comparar os genomas do *pool* superior, parental superior, parental inferior e *pool* randômico é possível observar os polimorfismos (DUITAMA, 2014) que geralmente são abundantes em número e permitem a cobertura completa do genoma (SWINNEN, S., THEVELEIN, J. M., NEVOIGT, E., 2012).

Os polimorfismos identificados são utilizados como marcadores para diferenciar os alelos do parental inferior dos alelos do parental superior, quando há um aumento superior a 50% na frequência de *SNVs*, indica que a característica está relacionada a uma região genômica ligada ao parental superior, em contraste, diminuição da frequência das *SNVs* abaixo de 50% indica associação com o parental inferior (EHRENREICH *et al.*, 2010; SWINNEN, THEVELEIN, *et al.*, 2012; PAIS *et al.*, 2014).

JUSTIFICATIVA

A produção de etanol combustível representa um importante papel na economia de vários países, sendo os Estados Unidos, Brasil e China os maiores produtores mundiais. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é considerada hoje como a levedura mais empregada na indústria para fermentação do etanol. Contudo, vários fatores podem influenciar em sua eficiência fermentativa, dentre eles a presença de níveis tóxicos de alumínio. Até o momento o mecanismo pelo qual o Al^{3+} exerce seus efeitos tóxicos em *S. cerevisiae* ainda não está muito claro. Dessa forma, mostra-se essencial entender as bases genéticas envolvidas com a tolerância ao alumínio para desenvolver uma cepa mais tolerante ou menos susceptível ao alumínio, demonstrando assim uma alta performance fermentativa.

2 CONTEXTUALIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DAS CEPAS UTILIZADAS

O presente grupo de pesquisa (LBCM), com o intuito de identificar as bases genéticas envolvidas na tolerância ao alumínio em *S. cerevisiae* realizou a análise poligênica da tolerância ao alumínio em *S. cerevisiae* por mapeamento de *QTL* (MEZADRI, 2018).

Neste trabalho, foram selecionadas 120 cepas isoladas de dornas de fermentação de cachaça, armazenadas na coleção do LBCM e 720 cepas isoladas das mais diversas fontes, oriundas do laboratório de Leuven na Bélgica. Todas essas cepas foram testadas quanto a sua capacidade de crescer em meio contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona bacteriológica, 2% de glicose, 1,5% de ágar e 5 mM de Al^{3+} . As cepas que apresentaram melhor crescimento, foram submetidas a um ensaio fermentativo em meio contendo extrato 1% de extrato de levedura, 2% de peptona bacteriológica, 20% de sacarose e 17 mM de Al^{3+} . As cepas que apresentaram melhor desempenho fermentativo foram esporuladas, foi realizada a análise de tétrades, ensaio fermentativo e o cruzamento dos parentais selecionados. Posteriormente, para checar a ploidia dessas cepas, realizou-se a análise de citometria de fluxo. E, por fim o segregante 8.20D foi selecionado como parental superior e o segregante P5A como parental inferior.

Para o mapeamento dos *QTLs* envolvidos com a resistência ao alumínio foi realizado um cruzamento entre os segregantes haploides 8.20D e P5A dando origem a um híbrido que foi esporulado e submetido a análise de tétrades e analisado quanto a sua capacidade de fermentar. Os 30 segregantes que apresentaram melhor desempenho fermentativo foram selecionados para compor o grupo superior. Para compor o grupo randômico, foram selecionados 120 segregantes aleatoriamente. Estes *pools*, juntamente com os parentais superior (8.20D) e inferior (P5A), tiveram seu DNA genômico isolado e sequenciado por meio da plataforma Illumina HiSeq pela empresa *Beijing Genomics Institut* (BGI, Hong Kong, China).

Na abordagem do mapeamento do *QTL*, as *SNVs* foram utilizadas como marcadores moleculares para identificar os *loci* genômicos envolvidos com a tolerância ao alumínio. Para isso, a frequência de *SNVs* foi inferida e plotada contra a posição cromossômica, no qual o aumento da frequência de *SNVs* acima de 50% indica que essa característica está associada a uma região genômica relacionada ao parental superior. A redução da frequência dos *SNVs* abaixo de 50% associação dessa

região com o parental inferior. Para confirmar a associação genética, empregou-se algoritmos estatísticos, para tal, um marcador foi identificado como significativo quando sua probabilidade atribuída foi maior ou igual a 95%. O mapa com a frequência da variação dos SNVs foi plotado utilizando o programa R, que possibilitou estimar a significância (valor de p) da associação, e indicar se a *SNV* apresentava alguma relação com a característica e com qual parental os alelos estavam relacionados. Ao analisar o mapeamento genético envolvido com a tolerância ao alumínio, foi observada associação de um *locus* no cromossomo VI, apresentado na Figura 3.

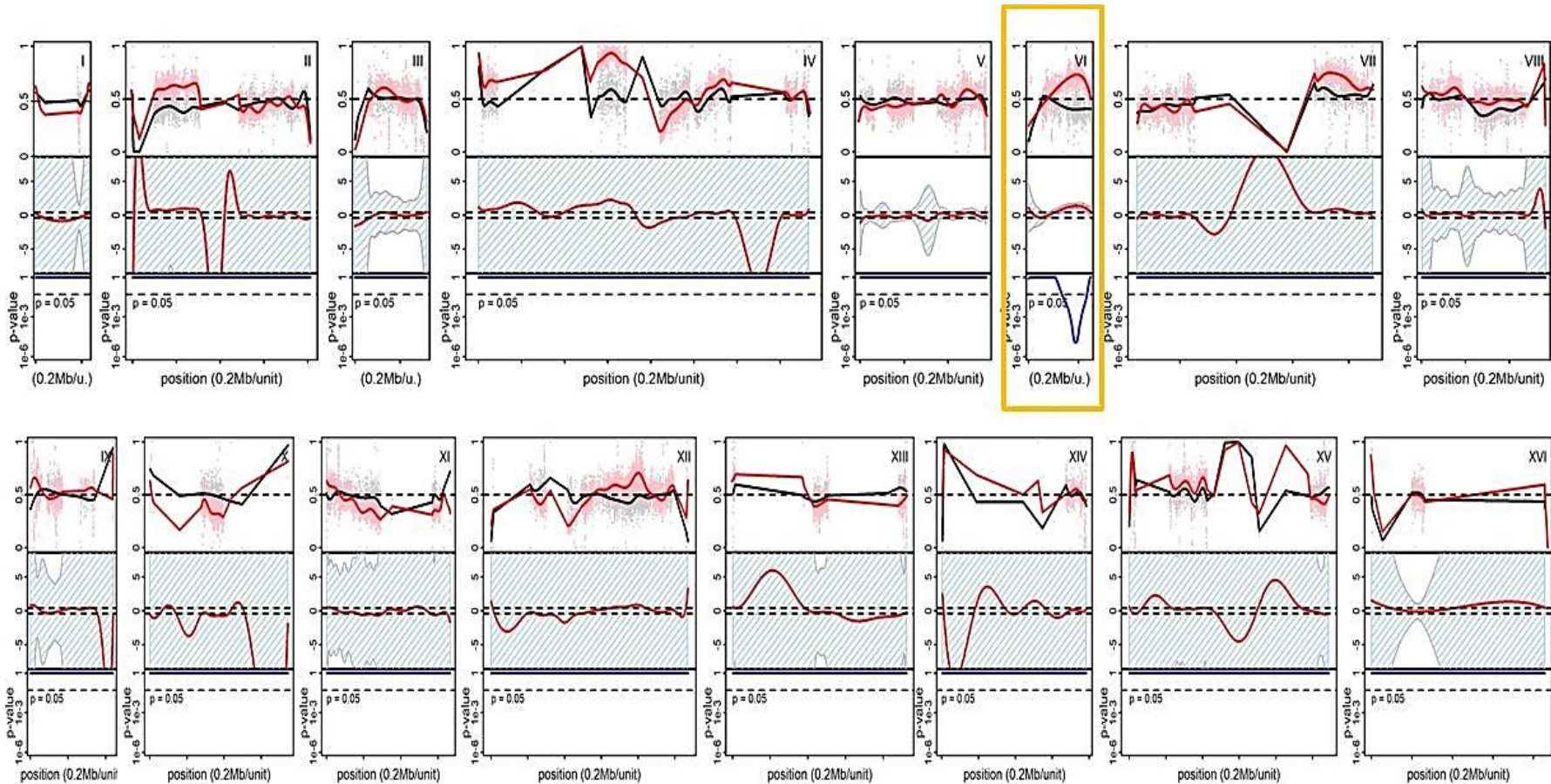


Figura 3 - Mapeamento genético dos *QTLs* envolvidos com a tolerância ao alumínio. O número do cromossomo é apresentado no canto direito de cada conjunto de gráficos. O *pool* randômico está representado pela linha preta e a linha vermelha representa o *pool* superior. Quando o valor de P é menor ou igual a 0,05, há associação entre o *locus* e o fenótipo. Os valores de P calculados a partir desses dados de frequência foram plotados contra as posições dos respectivos cromossômicos. Valores de p menor ou igual a 0,05 (indicados por linha pontilhada) são considerados estatisticamente significativos. A linha azul representa o valor de p observado.

Fonte: Adaptado Mezadri (2018)

Na região central do *QTL*, o valor de *p* observado foi o mais significativo. Por essa razão, optou-se pela deleção do gene do ponto central do *QTL*, que se encontra próximo à posição 185.000 pb do cromossomo VI. O gene nesta região é o gene *FABI* (*YFR019W*). Com base na análise de reciprocidade hemizigótica os autores observaram que o gene *FABI* exerce um importante papel no mecanismo de tolerância ao alumínio em células de *S. cerevisiae*, mas pode não ser o único gene envolvido com este fenótipo.

Assim, o objetivo da presente dissertação foi avaliar se há outros genes, dentro deste *QTL* no cromossomo VI, envolvidos com a tolerância ao alumínio em *S. cerevisiae*. Para o desenvolvimento *in vitro* deste trabalho empregou-se a estirpe industrial PE-2 e a estirpe laboratorial BY4741 (*S288C: Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0*) e cepas mutantes que possuem genes substituídos pelo cassete KANMX4, presentes no cromossomo VI provenientes da coleção *EUROSCARF* (*European Saccharomyces cerevisiae Archive for Functional Analysis*).

3 OBJETIVO GERAL

Identificar genes envolvidos com a tolerância ao alumínio em *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1 Objetivos Específicos

- Localizar e selecionar os genes presentes na região do QTL no cromossomo VI apontados por Mezadri (2018), envolvidos na tolerância ao alumínio em *S. cerevisiae*;
- Analisar a descrição dos genes presentes no QTL de resistência ao alumínio por meio do banco de dados SGD;
- Avaliar a tolerância ao alumínio das cepas mutantes por meio de testes de crescimento em meio contendo diferentes concentrações de alumínio;
- Identificar variantes genéticas nos genes que apresentaram crescimento significativo em meio contendo diferentes concentrações de alumínio que podem estar envolvidas com o fenótipo de interesse.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no LBCM (Laboratório de Biologia Celular e Molecular) do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.1 Meio de cultura para crescimento das cepas selecionadas

Utilizou-se o meio YP para cultivo das cepas de leveduras, sendo este composto por extrato de levedura 1% (p/v) e peptona de carne 2% (p/v). Como fonte de carbono adicionou-se ao meio 2% (p/v) de glicose. E estes foram submetidos a esterilização por calor úmido durante vinte minutos.

Para seleção das cepas com maior tolerância ao alumínio preparou-se meio de cultivo contendo 1,5% (p/v) de ágar, 1% (p/v) de extrato de levedura, 2% (p/v) de peptona de carne, 2% (p/v) de glicose e diferentes concentrações de alumínio, sendo elas 1,2 mM, 1,7 mM, 10 mM, 14 mM e 20 mM, posteriormente realizou-se a esterilização em autoclave por 20 minutos, em seguida transferiu-se para placas de petri de plástico estéreis com 20 cm de diâmetro.

4.2 Cultivos das cepas mutantes presentes no *QTL* de resistência ao alumínio

Dos 60 genes presentes no *QTL* de resistência ao alumínio, o nosso laboratório continha em sua coleção 26 cepas mutantes que possuem genes substituídos pelo cassete *KANMX4*, presentes no cromossomo VI provenientes da coleção *EUROSCARF* (*European Saccharomyces cerevisiae Archive for Functional Analysis*). Essas cepas foram pré-cultivadas em 4 mL de YPD (contendo 2% de glicose) líquido a 30 °C por 24 horas sob agitação a 200 rpm. Posteriormente, foi lida a absorbância inicial de cada estirpe a 600 nm em espectrofotômetro (DU-68 Spectrophotometer-Beckman). Ajustou-se a absorbância inicial a 600 nm (A_{600}) para 0.30 de todas as culturas e após 4 horas foram centrifugadas a 3000 x g durante 5 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 5 mL de água destilada estéril, leu-se a absorbância a 600

nm e ajustou-se A600 para 1.0. Transferiu-se cerca de 1 mL para os tubos *ependorf* e iniciou-se as diluições seriadas em água destilada até diluição 10^{-4} .

Alíquotas de 5 mL das amostras diluídas em série foram transferidas sobre o meio YPD (2%) sólido contendo 1,2 mM, 1,7 mM, 10 mM, 14 mM e 20 mM de alumínio. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 30°C durante 72 horas para avaliar qualitativamente a presença ou ausência do crescimento das amostras nas concentrações citadas. Vale ressaltar que todo o ensaio foi realizado em duplicata.

4.3 Identificação de variantes genéticas nos genes que apresentaram tolerância ao alumínio

Com intuito de verificar se os genes candidatos a estarem envolvidos com a tolerância ao alumínio carregavam variantes genéticas que poderiam estar associadas ao fenótipo de interesse, as sequências de nucleotídeos desses genes foram analisadas. Para isto, a sequência consenso de nucleotídeos referente aos genes de interesse foi recuperada do genoma sequenciado da estirpe 8.20D (parental superior) e P5A (parental inferior) utilizando a ferramenta *IGV* (2.10) (HELGA, T., JAMES, T. R., JILL, P. M. 2013). E, também foram recuperadas as sequências consenso referentes aos genes de interesse do genoma da estirpe utilizada como referência BY4741, depositadas no banco de dados *Saccharomyces Genome Database (SGD)* (CHERRY, J. M. *et al.*, 1998). Posteriormente, foi feito alinhamento múltiplo entre as sequências gênicas dessas três cepas (sendo um alinhamento múltiplo para cada gene). O alinhamento foi realizado a nível de DNA por meio da ferramenta online Clustal Omega (disponível em <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/> Copyright © EMBL 2022) para visualização e análise do alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos utilizou-se o programa Jalview 2.11.2.4. (WATERHOUSE, A. M. *et al.*, 2009). Para análise mais acurada e visualização das variantes genéticas no resultado do mapeamento do *QTL*, utilizou-se o programa *The Integrative Genomics Viewer (IGV)* (JAMES *et al.*, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da região genômica correspondente ao *QTL* identificado como envolvido na tolerância ao alumínio em *S. cerevisiae*

O *QTL* identificado por Mezdri e colaboradores (2018) como envolvido na tolerância ao alumínio em *S. cerevisiae* está localizado no cromossomo VI, coordenadas 132.654 - 228.843 pb.

Por meio do banco de dados *SGD* foi possível visualizar todos os genes localizados nesta região. Como apresentado na Figura 4, essa região contém 60 genes descritos até o momento, dos quais oito são genes essenciais. Dentre os demais 52 genes candidatos, o LBCM continha em sua coleção 26 cepas *S. cerevisiae* BY mutantes derivados da *EUROSCARF* contendo um constructo de resistência à Canamicina (*KanMX*) no lugar de cada ORF de interesse (Figura 4 e Tabela 1).

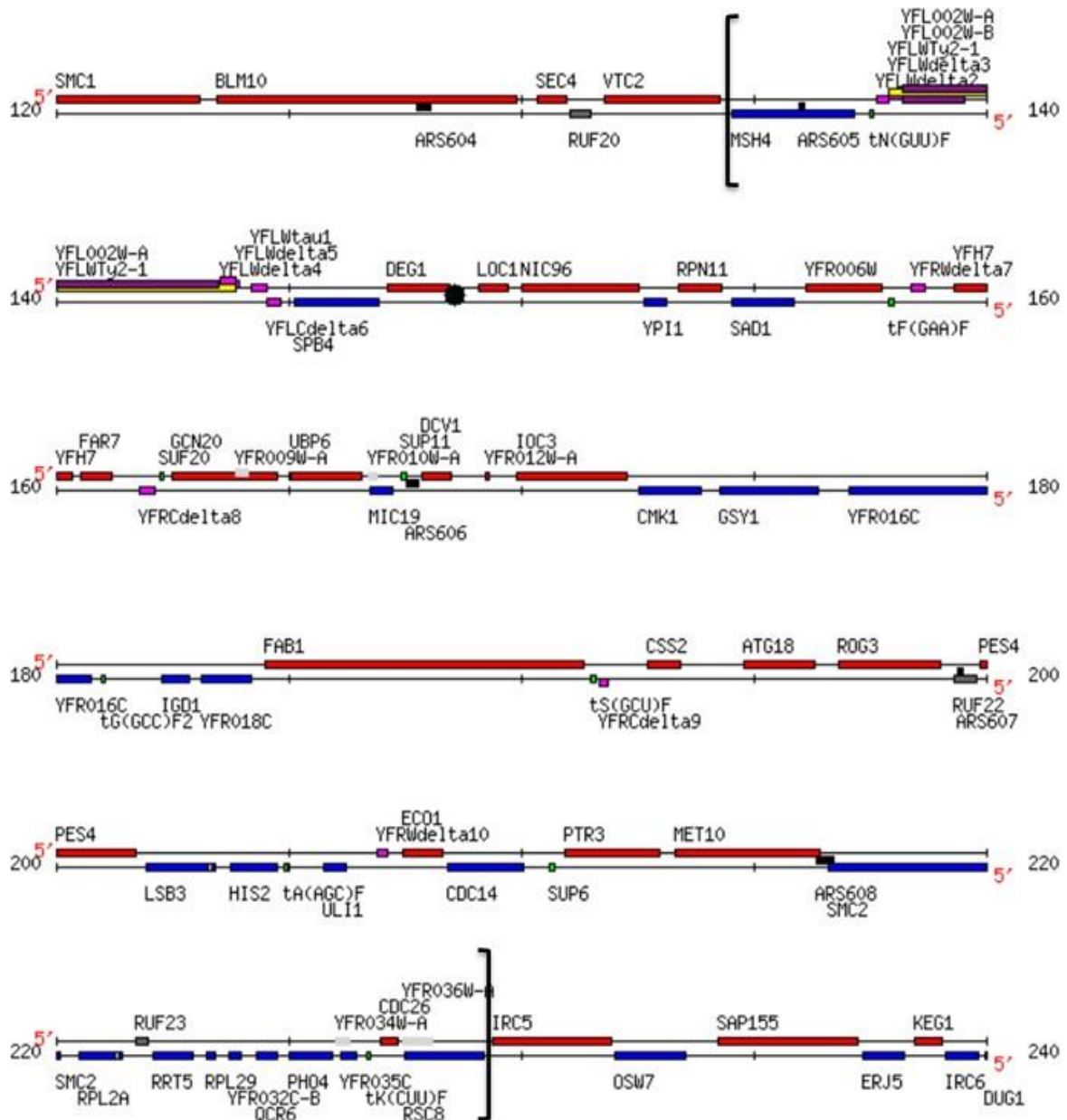


Figura 4 – Genes contido no *QTL* envolvidos com a tolerância ao alumínio nas coordenadas CHR VI 132,654 à 228.843 pb.

Fonte: Adaptado SGD (2022).

Tabela 1 - Descrição dos 26 genes deletados em *cepas S. cerevisiae* BY mutantes derivados da *EUROSCARF* contendo um constructo de resistência à Canamicina(KanMX) no lugar de cada ORF de interesse empregados neste estudo e suas respectivas funções de acordo com o banco de dados de *S. Cerevisiae*.

Nome Sistemático	Nome Padrão	Coordenadas	Função Molecular (Baseado no SGD)
<i>YFR001W</i>	<i>LOC1</i>	149110 à 149724	Gene codificador de proteína nucleolar envolvida na localização assimétrica do mRNA de ASH1; liga-se cooperativamente com She2p ao elemento de código postal E3 no 3'-UTR do mRNA; constituinte das partículas pré-ribossômicas 66S envolvidas no processamento pré-rRNA e na exportação nuclear da subunidade 60S; pode facilitar o carregamento do Rpl43p; pós-transcricionalmente necessário para retrotransposição eficiente; a ausência resulta em diminuição dos níveis de proteína Ty1 Gag: GFP; realocaliza do núcleo para o citoplasma após estresse na replicação do DNA
<i>YFL001W</i>	<i>DEG1</i>	147131 à 148459	Gene não essencial; mutante nulo não tem pseudouridilatação de alguns RNAs; em estudos sistemáticos, os mutantes mostram botões anormalmente alongados, níveis anormais de vários aminoácidos livres; aumento da sensibilidade a alguns produtos químicos, incluindo MMS, cafeína, vermelho do Congo, rapamicina e aumento da resistência a vários outros produtos químicos, incluindo cicloheximida, camptotecina, fenpropimorph, fluconazol, tunicamicina, bleomicina
<i>YFR006W</i>	<i>YFR006W</i>	156145 à 157752	Putativa quinase com semelhança com a subfamília PRK / URK / PANK quinase; a subfamília PRK / URK / PANK das cinases de loop P também é conhecida como fosforibulocinase / uridina cinase / pantotenato cinase bacteriana
<i>YFR007W</i>	<i>YFH7</i>	159299 à 160360	Putativa quinase com semelhança com a subfamília PRK / URK / PANK quinase; a subfamília PRK / URK / PANK das cinases de loop P também é conhecida como fosforibulocinase / uridina cinase / pantotenato cinase bacteriana

YFR008W	<i>FAR7</i>	160535 à 161200	Proteína envolvida na recuperação da parada do ciclo celular induzida por feromônios; atua em um caminho independente de Far1p; interage com Far3p, Far8p, Far9p, Far10p e Far11p; abundância de proteínas aumenta em resposta ao estresse de replicação do DNA
YFR009W	<i>GCN20</i>	162488 à 164746	Regulador positivo da atividade da Gcn2p quinase; forma um complexo com Gcn1p; proposto para estimular a ativação de Gcn2p por um tRNA ^{2,3} não carregado
YFR010W	<i>UBP6</i>	165067 à 166566	Protease específica da ubiquitina; situado no subcomplexo de base do proteassoma 26S, libera ubiquitina livre de cadeias de polubiquitina ramificada em bloco, em vez da ponta distal da cadeia; regula negativamente a degradação de proteínas ubiquitinadas pelo proteassoma; trabalha em oposição à atividade de alongamento da polubiquitina Hul5p; mutante tem tolerância aneuploidia; homólogo humano <i>UBP14</i> complementa levedura mutante nulo
YFR012W	<i>DCVI</i>	167888 à 168496	Proteína de função desconhecida; o mutante de deleção mostra forte interação genética com o mutante <i>cdc28-as1</i> na presença de 1-NM-PP1; O <i>DCVI</i> possui um paralog, <i>YOL019W</i> , que surgiu de toda a duplicação do genoma.
YFR014C	<i>CMK1</i>	172537 à 173877	Proteína quinase dependente de calmodulina; podem desempenhar um papel na resposta ao estresse, muitos substratos de fosforilação dependentes de Ca ⁺⁺ / calmodulina demonstraram in vitro, sequência de aminoácidos semelhante à Cam Kinase II de mamífero; <i>CMK1</i> tem um paralog, <i>CMK2</i> , que surgiu de toda a duplicação do genoma
YFR015C	<i>GSY1</i>	174265 à 176391	Glicogênio sintase; expressão induzida por limitação de glicose, falta de nitrogênio, estresse ambiental e entrada em fase estacionária; <i>GSY1</i> tem um paralog, <i>GSY2</i> , que surgiu de toda a duplicação do genoma; realocaliza do núcleo para o foco citoplasmático após estresse na replicação do DNA
YFR016C	<i>AIP5</i>	177042 à 180743	Proteína que regula positivamente a montagem de actina; forma um homodímero e interage com G-actina; a localização no pescoço e na ponta do broto requer Spa2p;

YFR017C	<i>IGD1</i>	182274 à 182861	Proteína citoplasmática que inibe a atividade de remoção de ramificação de glicogênio Gdb1p; necessário para acúmulo intracelular normal de glicogênio; fosforilado <i>in vivo</i> ; a expressão aumenta durante a fermentação do vinho; a abundância de proteínas aumenta em resposta ao estresse de replicação do DNA; O <i>IGD1</i> tem um paralog, <i>YOL024w</i> , que surgiu de toda a duplicação do genoma
YFR018C	<i>YFR018C</i>	183131 à 184222	Proteína putativa de função desconhecida; as proteínas de fusão SWAT-GFP e GFP sem costura localizam-se no retículo endoplasmático e a proteína de fusão mCherry localiza-se no vacúolo
YFR019W	<i>FAB1</i>		1-fosfatidilinositol-3-fosfato 5-cinase; membrana quinase vacuolar que gera fosfatidilinositol (3,5) P2, envolvida na triagem vacuolar e na homeostase
YFR020W	<i>CSS2</i>	192737 à 193435	Proteína de função desconhecida, secretada quando expressa constitutivamente; A proteína de fusão SWAT-GFP localiza-se no retículo endoplasmático (ER) e na região extracelular, enquanto a proteína de fusão mCherry localiza-se no ER e no vacúolo; mRNA identificado como traduzido por dados de perfil de ribossomo;
YFR021W	<i>ATG18</i>	194812 à 196314	Proteína de ligação a fosfoinositida; necessário para a formação de vesículas na autofagia e na via de direcionamento do citoplasma ao vacúolo (TVC); liga PtdIns (3,5) P2, PI3P e PI4P; Repetição WD-40 contendo proteína e membro da família PROPPIN; realocaliza do vacúolo para o citoplasma após estresse na replicação do DNA; os homólogos de mamíferos incluem: <i>WIPI1</i> , <i>WIPI2</i> , <i>WIPI3</i> e <i>WIPI4</i> / <i>WDR45</i> ; mutações no gene <i>WDR45</i> humano causam encefalopatia estática da infância com neurodegeneração na idade adulta
YFR022W	<i>ROG3</i>	196833 à 199034	Alfa-arrestina envolvida na endocitose dependente de ubiquitina; contribui para a dessensibilização do receptor de fator alfa Ste2p ocupado por agonistas por internalização independente de Rsp5p; A ligação mediada por motivo PPXY da ubiquitina ligase Rsp5p não é necessária para adaptação; a mutação suprime a sensibilidade à temperatura de um mutante duplo <i>mck1 rim11</i> ; As proteínas de fusão SWAT-GFP e mCherry localizam-se no citosol; O <i>ROG3</i> possui um paralog, <i>ROD1</i> , que surgiu de toda a duplicação do

			genoma.
YFR023W	<i>PES4</i>	199874 à 201709	Proteína de ligação de poli (A), supressora da mutação épsilon da DNA polimerase; O <i>PES4</i> possui um paralogo, <i>MIP6</i> , que surgiu de toda a duplicação do genoma
YFR026C	<i>ULI1</i>	205748 à 206257	Proteína de função desconhecida; envolvido e induzido pelo retículo endoplasmático desdobrado em resposta à proteína (UPR);As proteínas de fusão SWAT-GFP e mCherry localizam-se no retículo endoplasmático
YFR032C	<i>RRT5</i>	222090 à 222959	Proteína putativa de função desconhecida; gene não essencial identificado em uma triagem para mutantes com níveis aumentados de transcrição de rDNA; expresso em altos níveis durante a esporulação
YFR033C	<i>QCR6</i>	224326 à 224769	Subunidade 6 do complexo ubiquinol citocromo-c redutase; o complexo, também conhecido como complexo do citocromo bc (1) ou Complexo III, é um componente da cadeia de transporte de elétrons da membrana interna mitocondrial; proteína altamente ácida; necessário para a maturação do citocromo c1; pode ser pouco associado ao complexo, uma vez que é facilmente liberado no espaço intermembranar.
YFR034C	<i>PHO4</i>	225020 à 225958	Fator básico de transcrição helix-loop-helix (bHLH) da família myc; ativa a transcrição cooperativamente com Pho2p em resposta à limitação de fosfato; a ligação ao motivo 'CACGTG' é regulada por restrição de cromatina, ligação competitiva de Cbf1p ao mesmo motivo de ligação ao DNA e cooperação com Pho2p; A função é regulada pela fosforilação em vários locais e pela disponibilidade de fosfato
YFR035C	<i>YFR035C</i>	226121 à 226465	Proteína putativa de função desconhecida; mutante de deleção exibe fenótipo sintético com alfa-sinucleína
YFR036W	<i>CDC26</i>	226963 à 227337	Subunidade do Complexo Promotor de Anáfase / Ciclossomo (APC / C); que é uma ligase de ubiquitina-proteína necessária para a degradação de inibidores da anáfase, incluindo ciclinas mitóticas, durante a transição metáfase / anáfase; realocaliza-se no citosol em resposta à hipóxia

YFR031C-A	<i>RPL2A</i>	220507 à 221418	Proteína L2A da subunidade ribossômica 60S; homóloga à proteína ribossômica L2 de mamífero e L2 bacteriana; O RPL2A possui um paralelo, o RPL2B, que surgiu de toda a duplicação do genoma
YFR032C-A	<i>RPL29</i>	223258 à 223437	Proteína L29 da subunidade ribossômica 60S; não é essencial para a tradução, mas necessário para a junção adequada de subunidades grandes e pequenas de ribossomos e para a taxa de tradução normal; homólogo à proteína ribossômica L29 de mamífero, sem homólogo bacteriano
YFR007W	<i>YFH7</i>	159299 à 160360	Putativa quinase com semelhança com a subfamília PRK / URK / PANK quinase; a subfamília PRK / URK / PANK das cinases de loop P também é conhecida como fosforibulocinase / uridina cinase / pantotenato cinase bacteriana
YFR008W	<i>FAR7</i>	160535 à 161200	Proteína envolvida na recuperação da parada do ciclo celular induzida por feromônios; atua em um caminho independente de Far1p; interage com Far3p, Far8p, Far9p, Far10p e Far11p; abundância de proteínas aumenta em resposta ao estresse de replicação do DNA
YFR009W	<i>GCN20</i>	162488 à 164746	Regulador positivo da atividade da Gcn2p quinase; forma um complexo com Gcn1p; proposto para estimular a ativação de Gcn2p por um tRNA ^{2,3} não carregado
YFR010W	<i>UBP6</i>	165067 à 166566	Protease específica da ubiquitina; situado no subcomplexo de base do proteassoma 26S, libera ubiquitina livre de cadeias de polubiquitina ramificada em bloco, em vez da ponta distal da cadeia; regula negativamente a degradação de proteínas ubiquitinadas pelo proteassoma; trabalha em oposição à atividade de alongamento da polubiquitina Hul5p; mutante tem tolerância aneuploidia; homólogo humano <i>UBP14</i> complementa levedura mutante nulo
YFR012W	<i>DCVI</i>	167888 à 168496	Proteína de função desconhecida; o mutante de deleção mostra forte interação genética com o mutante <i>cdc28-as1</i> na presença de 1-NM-PP1; O <i>DCVI</i> possui um paralog, <i>YOL019W</i> , que surgiu de toda a duplicação do genoma.
YFR014C	<i>CMK1</i>	172537 à 173877	Proteína quinase dependente de calmodulina; podem desempenhar um papel na resposta ao estresse, muitos substratos de fosforilação dependentes de Ca ⁺⁺ / calmodulina demonstraram <i>in vitro</i> , sequência de aminoácidos semelhante à Cam Kinase II de mamífero; <i>CMK1</i> tem um paralog <i>CMK2</i> , que surgiu de toda a duplicação do genoma
YFR015C	<i>GSY1</i>	174265 à 176391	Glicogênio sintase; expressão induzida por limitação de glicose, falta de nitrogênio, estresse ambiental e entrada em fase estacionária; <i>GSY1</i> tem um paralog, <i>GSY2</i> , que surgiu de toda a duplicação do genoma; realocaliza do núcleo para o foco citoplasmático após estresse na replicação do DNA

YFR016C	<i>AIP5</i>	177042 à 180743	Proteína que regula positivamente a montagem de actina; forma um homodímero e interage com G-actina; a localização no pescoço e na ponta do broto requer Spa2p;
YFR017C	<i>IGD1</i>	182274 à 182861	Proteína citoplasmática que inibe a atividade de remoção de ramificação de glicogênio Gdb1p; necessário para acúmulo intracelular normal de glicogênio; fosforilado <i>in vivo</i> ; a expressão aumenta durante a fermentação do vinho; a abundância de proteínas aumenta em resposta ao estresse de replicação do DNA; O <i>IGD1</i> tem um paralog, <i>YOL024w</i> , que surgiu de toda a duplicação do genoma
YFR018C	<i>YFR018C</i>	183131 à 184222	Proteína putativa de função desconhecida; as proteínas de fusão SWAT-GFP e GFP sem costura localizam-se no retículo endoplasmático e a proteína de fusão mCherry localiza-se no vacúolo
YFR019W	<i>FAB1</i>	184502 à 191338	1-fosfatidilinositol-3-fosfato 5-cinase; membrana quinase vacuolar que gera fosfatidilinositol (3,5) P2, envolvida na triagem vacuolar e na homeostase
YFR020W	<i>CSS2</i>	192737 à 193435	Proteína de função desconhecida, secretada quando expressa constitutivamente; A proteína de fusão SWAT-GFP localiza-se no retículo endoplasmático (ER) e na região extracelular, enquanto a proteína de fusão mCherry localiza-se no ER e no vacúolo; mRNA identificado como traduzido por dados de perfil de ribossomo;
YFR021W	<i>ATG18</i>	194812 à 196314	Proteína de ligação a fosfoinositida; necessário para a formação de vesículas na autofagia e na via de direcionamento do citoplasma ao vacúolo (TVC); liga PtdIns (3,5) P2, PI3P e PI4P; Repetição WD-40 contendo proteína e membro da família PROPPIN; realoca do vacúolo para o citoplasma após estresse na replicação do DNA; os homólogos de mamíferos incluem: <i>WIPI1</i> , <i>WIPI2</i> , <i>WIPI3</i> e <i>WIPI4</i> / <i>WDR45</i> ; mutações no gene <i>WDR45</i> humano causam encefalopatia estática da infância com neurodegeneração na idade adulta
YFR022W	<i>ROG3</i>	196833 à 199034	Alfa-arrestina envolvida na endocitose dependente de ubiquitina; contribui para a dessensibilização do receptor de fator alfa Ste2p ocupado por agonistas por internalização independente de Rsp5p; A ligação mediada por motivo PPXY da ubiquitina ligase Rsp5p não é necessária para adaptação; a mutação suprime a sensibilidade à temperatura de um mutante duplo <i>mck1 rim11</i> ; As proteínas de fusão SWAT-GFP e mCherry localizam-se no citosol; O <i>ROG3</i> possui um paralog, <i>ROD1</i> , que surgiu de toda a duplicação do genoma.
YFR023W	<i>PES4</i>	199874 à 201709	Proteína de ligação de poli (A), supressora da mutação epsilon da DNA polimerase; O <i>PES4</i> possui um paralog, <i>MIP6</i> , que surgiu de toda a duplicação do genoma

YFR026C	<i>ULH1</i>	205748 à 206257	Proteína de função desconhecida; envolvido e induzido pelo retículo endoplasmático desdobrado em resposta à proteína (UPR).
YFR032C	<i>RRT5</i>	222090 à 222959	Proteína putativa de função desconhecida; gene não essencial identificado em uma triagem para mutantes com níveis aumentados de transcrição de rDNA; expresso em altos níveis durante a esporulação
YFR033C	<i>QCR6</i>	224326 à 224769	Subunidade 6 do complexo ubiquinol citocromo-c redutase; o complexo, também conhecido como complexo do citocromo bc (1) ou Complexo III, é um componente da cadeia de transporte de elétrons da membrana interna mitocondrial; proteína altamente ácida; necessário para a maturação do citocromo c1; pode ser pouco associado ao complexo, uma vez que é facilmente liberado no espaço intermembranar.
YFR034C	<i>PHO4</i>	225020 à 225958	Fator básico de transcrição helix-loop-helix (bHLH) da família myc; ativa a transcrição cooperativamente com Pho2p em resposta à limitação de fosfato; a ligação ao motivo 'CACGTG' é regulada por restrição de cromatina, ligação competitiva de Cbf1p ao mesmo motivo de ligação ao DNA e cooperação com Pho2p; A função é regulada pela fosforilação em vários locais e pela disponibilidade de fosfato.
YFR035C	<i>YFR035C</i>	226121 à 226465	Proteína putativa de função desconhecida; mutante de deleção exibe fenótipo sintético com alfa-sinucleína
YFR036W	<i>CDC26</i>	226963 à 227337	Subunidade do Complexo Promotor de Anáfase / Ciclossomo (APC / C); que é uma ligase deubiquitina-proteína necessária para a degradação de inibidores da anáfase, incluindo ciclinas mitóticas, durante a transição metáfase / anáfase; realocaliza-se no citosol em resposta à hipóxia.
YFR031C-A	<i>RPL2A</i>	220507 à 221418	Proteína L2A da subunidade ribossômica 60S; homóloga à proteína ribossômica L2 de mamífero e L2 bacteriana; O RPL2A possui um paralelo, o RPL2B, que surgiu de toda a duplicação do genoma.
YFR032C-A	<i>RPL29</i>	223258 à 223437	Proteína L29 da subunidade ribossômica 60S; não é essencial para a tradução, mas necessário para a junção adequada de subunidades grandes e pequenas de ribossomos e para a taxa de tradução normal; homólogo à proteína ribossômica L29 de mamífero, sem homólogo bacteriano.

5.2 Seleção dos mutantes tolerantes ao alumínio (Al³⁺)

O crescimento das cepas controle BY4741, PE-2 e os 26 mutantes que possuem genes substituídos pelo cassete *KANMX4* foram avaliados visualmente analisando o crescimento das colônias em meio YPD (2%) sólido, na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio (Al³⁺). A estirpe controle laboratorial BY4741, assim como a estirpe controle industrial PE-2 apresentaram um bom crescimento nas concentrações de 1,2 e 1,7 mM de Al³⁺ em todas as diluições testadas. Contudo, nas concentrações de 10, 14 e 20 mM de Al³⁺ o crescimento das colônias foi inibido pelo alumínio. Ao comparar as cepas controle com a estirpe BY4741Δ*fab1* foi possível observar que a deleção do gene *FAB1* na BY4741 atribuiu a estirpe uma maior tolerância ao alumínio na concentração de 10 mM de Al³⁺, uma vez que houve crescimento até diluição 10⁻² nas mesmas condições analisadas, como apresentado na Figura 5. Este resultado corrobora com o que foi apresentado por Mezdari (2018), no qual o gene *FAB1* mostrou-se envolvido com a tolerância ao alumínio.

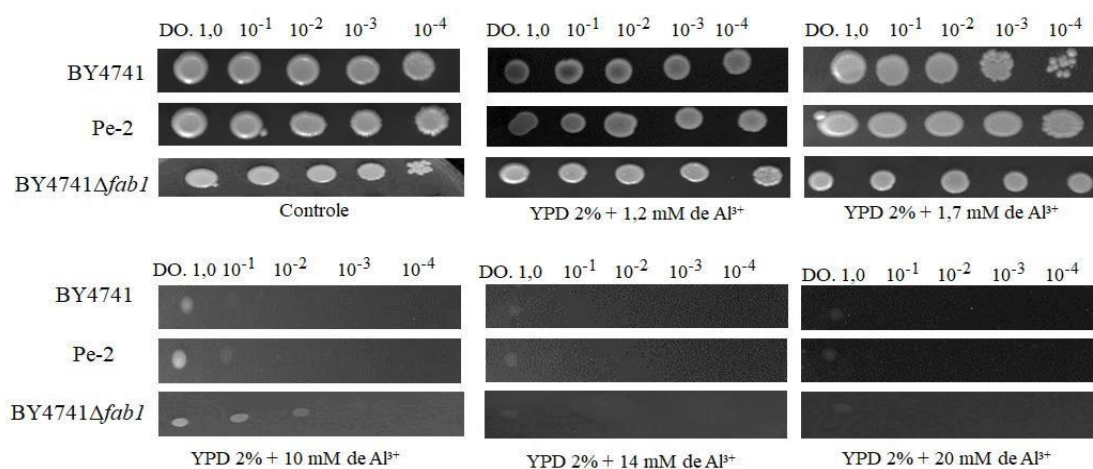


Figura 5 - Teste de crescimento com as cepas controle BY4741 e PE-2 e BY4741Δ*fab1* na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio em meio sólido, incubadas a 30 °C por 72 horas. O teste de tolerância a alumínio demonstra que a deleção do gene *FAB1* na cepa laboratorial BY4741 atribuiu capacidade de crescimento da cepa BY4741 em meio contendo 10 mM de Al³⁺ até diluição 10⁻²

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Ao analisar o crescimento das cepas com genes substituídos/deletados (BY4741Δ*deg1*, BY4741Δ*yfr006w*, BY4741Δ*yfh7*, BY4741Δ*far7*, BY4741Δ*gcn20*, BY4741Δ*ubp6*, BY4741Δ*dcv1*, BY4741Δ*cmk1*, BY4741Δ*gsy1*, BY4741Δ*aip5*,

BY4741 Δ *igd1*, BY4741 Δ *yfr018c*, BY4741 Δ *css2*, BY4741 Δ *atg18*, BY4741 Δ *rog3*, BY4741 Δ *pes4*, BY4741 Δ *uli1*, BY4741 Δ *rrt5*, BY4741 Δ *qcr6*, BY4741 Δ *pho4*, BY4741 Δ *yfr035c*, BY4741 Δ *cdc26*, BY4741 Δ *rpl2a* e BY4741 Δ *rpl29*) nas mesmas condições da cepa controle BY4741 e PE-2, foi possível verificar que todas as cepas foram capazes de crescer em baixas concentrações de alumínio (1,2 e 1,7 mM de Al³⁺) em todas as diluições realizadas, como apresentado nas figuras a seguir (6, 7, 8, 9 e 10). Entretanto, dentre as 26 cepas, 18 demonstraram maior nível de tolerância. A deleção dos genes *AIP5*, *QCR6*, *DCVI* atribuíram à estirpe BY4741 capacidade de crescimento em meio contendo 10 mM de Al³⁺ até diluição 10⁻³ e a deleção do gene *CMK1* conferiu à estirpe BY4741 capacidade de crescimento em meio contendo 20 mM de Al³⁺ até diluição 10⁻¹ (Figura 6).

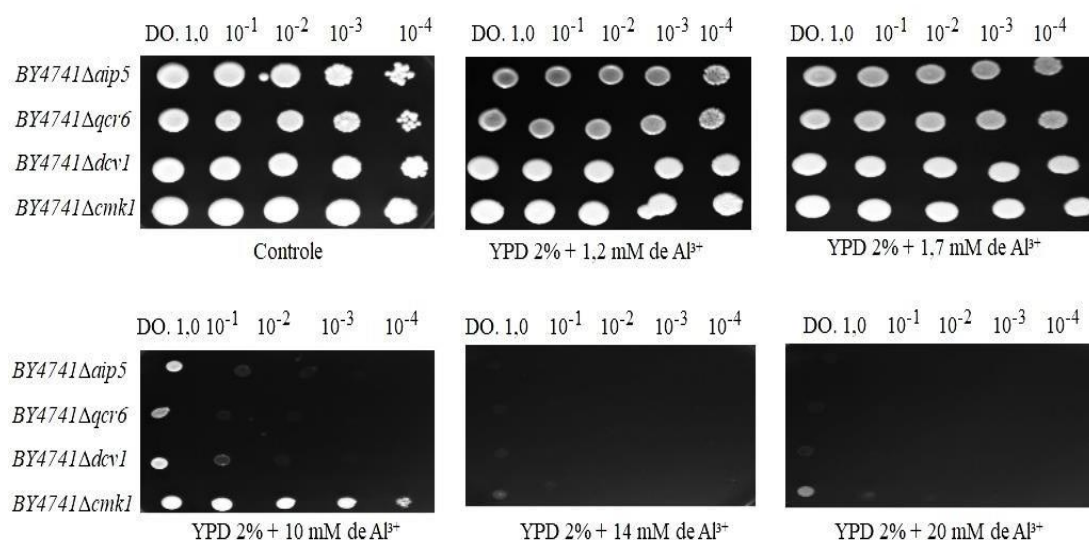


Figura 6 - Teste de crescimento com as cepas BY4741 Δ *aip5*, BY4741 Δ *qcr6*, BY4741 Δ *dcv1*, BY4741 Δ *cmk1* na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio em meio sólido incubadas a 30 °C por 72 horas. O teste de tolerância demonstra que a deleção dos genes *AIP5*, *QCR6*, *DCVI* atribuíram a cepa capacidade de crescer em meio contendo 10 mM de Al³⁺ até diluição 10⁻², a deleção do gene e *CMK1* atribuiu a cepa capacidade de crescer em meio contendo 20 mM de Al³⁺ até diluição 10⁻¹.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

No entanto, o crescimento das cepas BY4741 Δ *atg18*, BY4741 Δ *smc2* e BY4741 Δ *uli1*, mostrou-se semelhante ao crescimento das cepas controle (Figura 7).

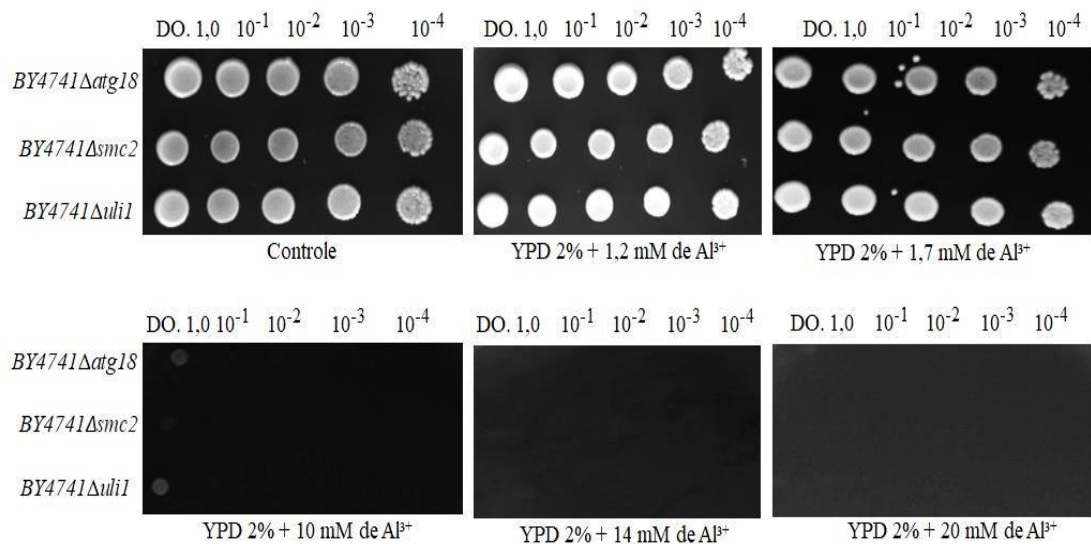


Figura 7 - Teste de crescimento com as cepas *BY4741Δatg18*, *BY4741Δsmc2* e *BY4741Δuli1* na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio em meio sólido incubadas a 30 °C por 72 horas. O teste de tolerância ao alumínio demonstra que o perfil de crescimento apresentou semelhante ao crescimento da estirpe controle laboratorial *BY4741*.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O crescimento das cepas *BY4741Δcdc26*, *BY4741Δyfr018c*, *BY4741Δubp6e* e *BY4741Δrog3* demonstrou que a deleção do gene *CDC26* não alterou o perfil de crescimento da estirpe quando comparado com os controles. Porém, a deleção do gene *YFR018c* atribuiu a estirpe *BY4741* capacidade de crescer em meio contendo 10 mM de alumínio diluição 10^{-1} , a deleção de *ROG3* atribuiu capacidade de crescimento em 10 mM diluição 10^{-2} e a deleção do gene *UBP6* conferiu a estirpe capacidade de crescer em 20 mM de alumínio até diluição 10^{-3} , apresentado na Figura 8.

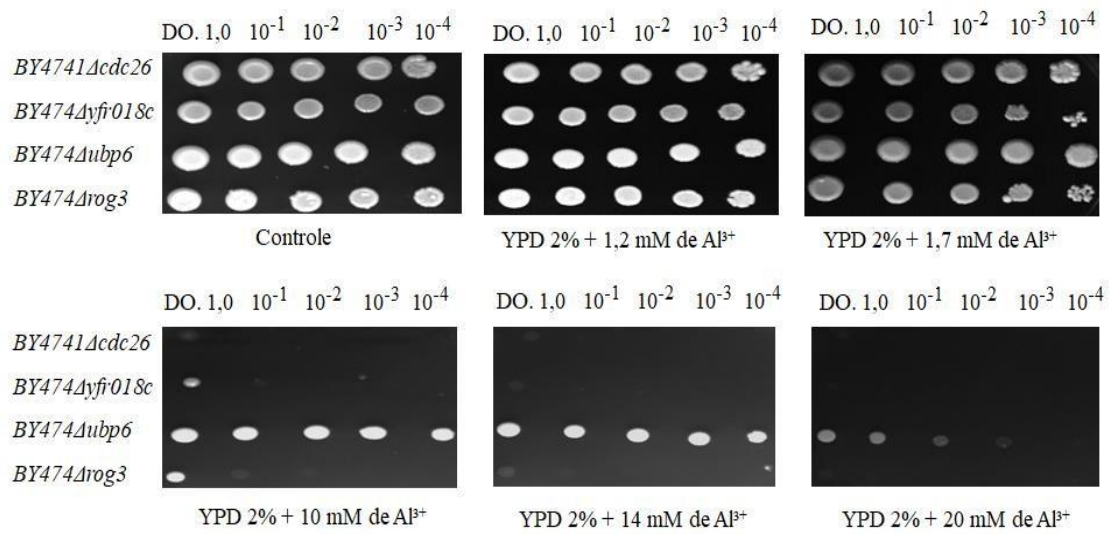


Figura 8 - Teste de crescimento com as cepas *BY4741Δcdc26*, *BY4741Δyfr018c*, *BY4741Δubp6* e *BY4741Δrog3* na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio em meio sólido incubadas a 30 °C por 72 horas. O teste de tolerância a alumínio demonstra a deleção do gene *CDC26* não apresentou alteração no fenótipo quando comparado com os controles. Contudo, a deleção dos genes *YFR018c* e *ROG3* atribuíram a cepa capacidade de crescer em meio contendo 10 mM de alumínio diluição 10^{-1} e diluição 10^{-2} respectivamente. A deleção do gene *UBP6* conferiu a cepa capacidade de crescer em 20 mM de Al^{3+} diluição 10^{-3}

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O crescimento das cepas *BY4741Δrrt5*, *BY4741Δigd1*, *BY4741Δgsy1* e *BY4741Δdeg1* em meio contendo 10 mM de alumínio diluição até 10^{-2} demonstraram envolvimento dos genes *RRT5*, *IGD1*, *GSY1* e *DEG1* no fenótipo em estudo, Figura 9.

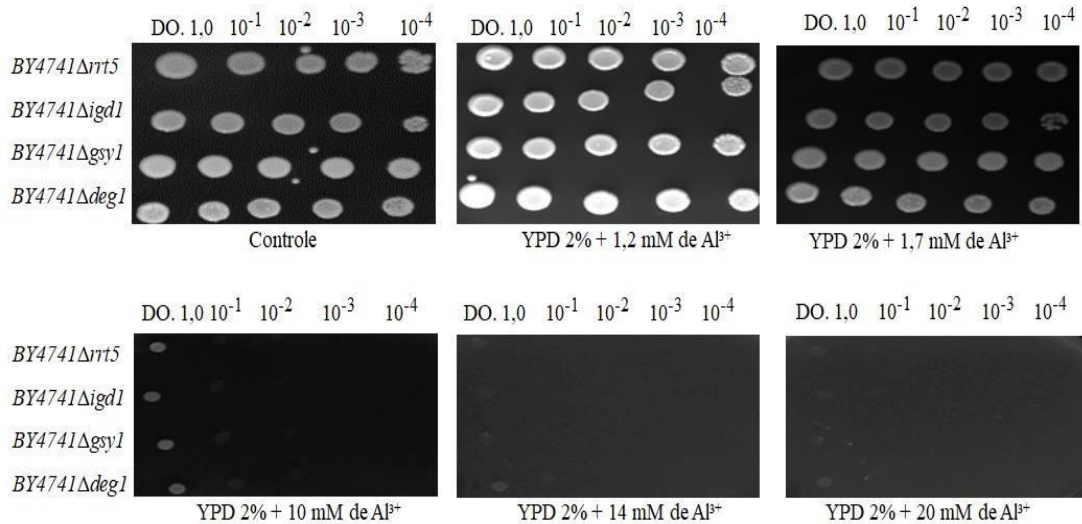


Figura 9 - Teste de tolerância das cepas *BY4741Δrrt5*, *BY4741Δigd1*, *BY4741Δgsy1* e *BY4741Δdeg1* na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio em meio sólido incubadas a 30 °C por 72 horas. O teste de tolerância a alumínio demonstra que a deleção dos genes *RRT5*, *IGD1*, *GSY1* e atribuíram a cepa capacidade de crescer em meio contendo 10 mM de alumínio diluição 10^{-2} .

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

As cepas *BY4741Δgcn20*, *BY4741Δpes4* e *BY4741Δcss2* apresentaram crescimento em meio contendo 10 mM até diluição 10^{-2} e a estirpe *BY4741Δrpl29* exibiu crescimento em 10 mM até diluição 10^{-4} (Figura 10).

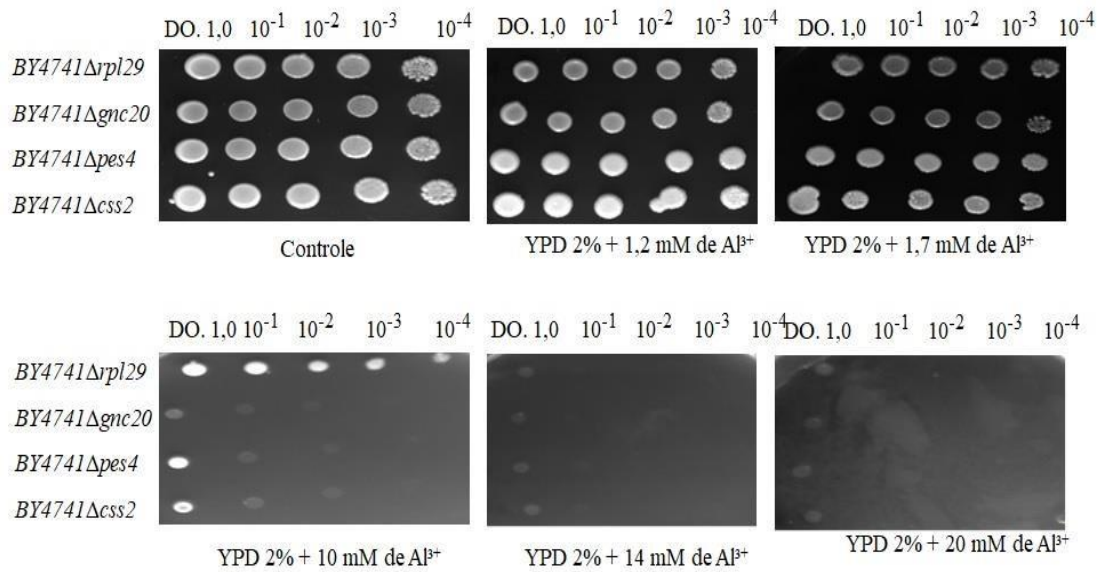


Figura 10 - Teste de crescimento com as cepas BY4741Δrpl29, BY4741Δgnc20, BY4741Δpes4 e BY4741Δcss2 na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio em meio sólido incubadas a 30 °C por 72 horas. O teste de tolerância ao alumínio demonstra a deleção dos genes *RPL29*, *GCN20*, *PES4* atribuíram a cepa capacidade de crescer em meio contendo 10 mM de alumínio diluição 10⁻² e a deleção do gene *RPL29* conferiu a cepa capacidade de crescer em 10 mM de alumínio até diluição 10⁻⁴.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

As cepas *BY4741Δyfh7*, *BY4741Δsmc1* e *BY4741Δloc1* apresentaram perfil semelhante ao crescimento das cepas controle (Figura 11).

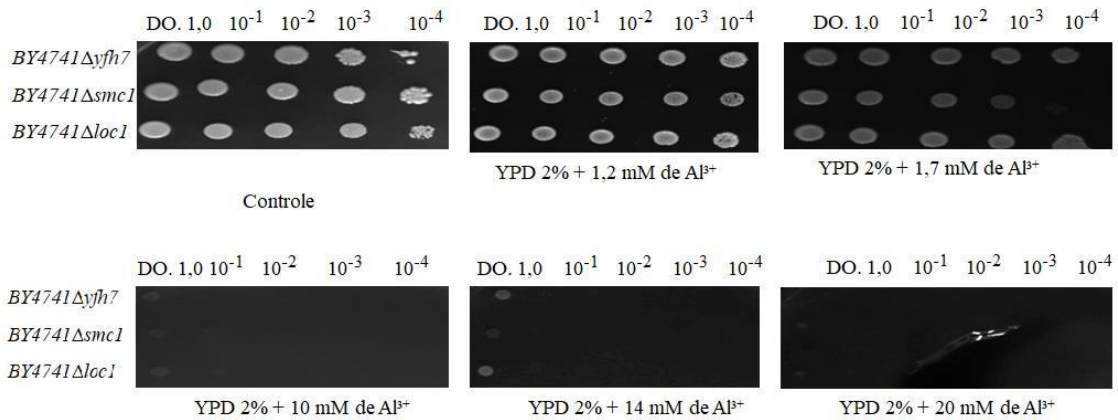


Figura 11 - Teste de crescimento com as cepas *BY4741Δyfh7*, *BY4741Δsmc1* e *BY4741Δloc1* na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio em meio sólido incubadas a 30 °C por 72 horas. O teste de tolerância ao alumínio demonstra a deleção dos genes *YFH7*, *SMC1* e *LOC1* não influenciaram na capacidade de crescimento das cepas.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Já as cepas *BY4741Δyfr006w*, *BY4741Δpho4*, e *BY4741ΔYFR035c* apresentaram crescimento em meio contendo 10 mM de alumínio diluição até 10⁻¹. Demonstrando envolvimento dos genes *YFR006w*, *PHO4* e *YFR035c* na tolerância ao alumínio (Figura 12).

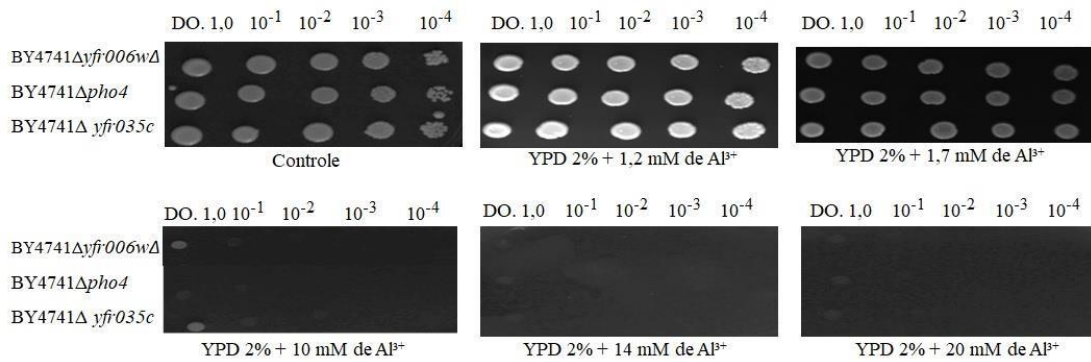


Figura 12 - Teste de crescimento com as cepas BY4741Δyfr006w, BY4741Δpho4, e BY4741Δyfr036w na ausência e na presença de diferentes concentrações de alumínio em meio sólido incubadas a 30 °C por 72 horas. O teste de tolerância ao alumínio demonstra que a deleção dos genes *YFR006w*, *PHO4* e *YFR035c* demonstra envolvimento no fenótipo.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Na análise anterior, cujo as cepas com genes inativos foram submetidas a crescimento em meio contendo alumínio, as cepas mutantes BY4741Δyfr006w, BY4741Δyfr018c, BY4741Δyfr035c e BY4741Δpho4 cresceram em meio contendo 10 mM de Al³⁺ diluição 10⁻¹, BY4741Δigd1, BY4741Δgsy1, BY4741Δdeg1, BY4741Δrog3, BY4741Δgcn20, BY4741Δpes4, BY4741Δcss2 e BY4741Δrrt5, cresceram em meio contendo 10 mM de Al³⁺ diluição 10⁻², BY4741Δaip5, BY4741Δqcr6, BY4741Δdvc1 cresceram em meio contendo 10 mM de Al³⁺, diluição 10⁻³, a cepa mutante BY4741Δrpl29 cresceu em meio contendo 10 mM de Al³⁺ diluição 10⁻⁴, BY4741Δcmk1 cresceu em meio contendo 20 mM de Al³⁺ diluição 10⁻¹ e BY4741Δubp6 cresceu em meio contendo 20 mM de Al³⁺ até diluição 10⁻³. Esses resultados apontam o envolvimento de 18 genes na tolerância ao alumínio, uma vez que na ausência dos mesmos as cepas foram capazes de crescer.

Vale ressaltar que nossos resultados demonstraram a identificação de dois genes com tolerância mais significativa que o *FABI*, apresentado por Mezadri (2018), sendo eles *UBP6* e *CMK1* e confirma a metodologia apresentada por Pais *et al.*, (2014), no qual características quantitativas envolvem participação de dois ou mais genes.

Além disso, ao analisar a função do genes, observamos que três dos genes identificados, codificam proteínas quinases (*GCN20*, *DVC1* e *CMK1*). De acordo Schott e Gardner (1997), as proteínas quinases desempenham um papel importante na resposta ao estresse, atuam na regulação da síntese da parede celular, no ciclo celular durante a privação de nutrientes e é uma importante via para interromper o ciclo celular sob

condições de fome e adaptação à crescimento em condições hiposmóticas e em alta temperatura. Embora o mecanismo envolvido na resposta ao alumínio, não esteja bem esclarecido, Nay e seus colaboradores (2014) demonstraram que a expressão de genes que codificam proteína quinases são indesejáveis para células sob exposição ao Al^{3+} .

Essa relação inversa justifica tolerância significativa apresentada pelos genes *GCN20* e *DVCI* em especial o *CMKI* que apresentou hipertolerância ao Al^{3+} (Figura 6), corroborando com o estudo realizado por Jin *et al* (2008), no qual a deleção de um gene que codifica a subunidades da proteína quinase, conferiu a cepa uma hipertolerância Al^{3+} .

5.3 Variantes genéticas observadas nos genes que apresentaram tolerância ao alumínio

A análise das variantes genéticas dos genes que apresentaram tolerância ao alumínio foi realizada por meio do programa Jalview 2.11.2. e, posteriormente, analisadas mais detalhadamente por análise visual utilizando o programa *The Integrative Genomics Viewer* (IGV). Os genes analisados foram *IGD1* (*YFR017C*), *GSY1* (*YFR015C*), *DEG1* (*YFL001W*), *AIP5* (*YFR016C*), *QCR6* (*YFR033C*), *DVC1* (*YFR012W*), *PHO4* (*YFR034C*), *ROG3* (*YFR022W*), *GCN20* (*YFR009W*), *PES4* (*YFR023W*), *CSS2* (*YFR020W*), *CMK1* (*YFR014C*), *UBP6* (*YFR10W*), *RPL29* (*YFR032C-A*), *YFR006w*, *YFR018c*, *RRT5* (*YFR032C*) e *YFR035C*.

Não foi observada variante genética na sequência dos genes *UBP6*, *DEG1*, *YFR035* e *RPL29*. Vale mencionar, que as cepas contendo a deleção desses genes apresentaram tolerância ao alumínio. Desta forma, a não observação de variantes genéticas não exclui o envolvimento desses genes no fenótipo. A análise foi feita focando somente na região codificante desses genes. As regiões intergênicas, 5'-UTR's e 3'-UTR's não foram analisadas. Além disso, fatores epigenéticos, sítios de ligação de fatores de transcrição, entre outros, não foram investigados.

O alinhamento do gene *IGD1* na cepa BY4741, na parental superior e no parental inferior apresentou um percentual de identidade de 99,49% e uma variação de nucleotídeo único (SNV) do tipo missense. Ao buscar por essa variação na cepa parental superior, no *pool* superior e no parental inferior com auxílio do IGV, observou-se a variação gênica na posição 182.368 pb do cromossomo VI. Foi observado que 100% das *reads* no parental inferior possuem o alelo G, 100% das *reads* no parental superior possuem alelo C, no *pool* superior 71% das *reads* apresentam o alelo igual ao parental superior e 29% das *reads* apresentaram alelo igual ao parental inferior, como apresentado na Figura 13.

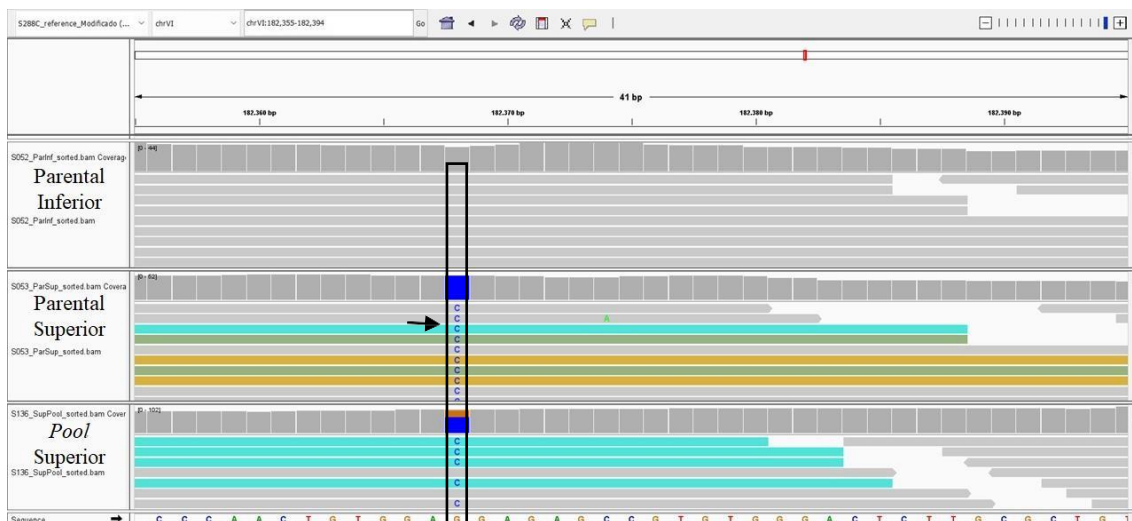


Figura 13: SNV detectada no gene *IGD1* na posição 182.368 pb do cromossomo VI. A estirpe parental inferior apresenta 100% das *reads* contendo alelo G, o parental superior apresenta 100% das *reads* contendo alelo C, o *pool* superior apresenta 71% das *reads* contendo alelo C e 29% das *reads* contendo alelo o G. Visualização por meio do programa IGV (*The Integrative Genomics Viewer*).

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A variante observada nesse gene ocasionou a substituição de um aminoácido de glicina (GGA) no parental inferior, para um aminoácido de arginina (CGA) no parental superior. Considerando o fato que sua deleção aumentou a tolerância ao alumínio, o aminoácido arginina demonstrou grande potencial para o estudo de modificação de SNV uma vez que promoveria uma melhor eficiência dos processos fermentativos em cepas industriais. Pesquisas tem sido realizadas para entender como *S. cerevisiae* lidam com os efeitos de estresse como alta concentração de etanol, variações de pH e temperatura (WANG *et al.*, 2019). Porém, ainda não foi descrito na literatura o envolvimento do gene *IGD1* com a tolerância ao alumínio. Ainda são necessários mais estudos para confirmar o envolvimento deste gene com o fenótipo de interesse. Porém, este é o primeiro trabalho a apontar o gene *IGD1* como candidato a tolerância ao alumínio em leveduras numa concentração de 10 mM de Al³⁺.

Até o momento, sabe-se que o gene *IGD1* está localizado na posição 182.274 à 182.861 pb do cromossomo VI. Codifica uma proteína citoplasmática de 21,8 kDa exclusiva de *Saccharomyces* que possui 587 pb (WALKEY *et al.*, 2011).

Para apresentar as variantes genéticas observadas nos outros 13 genes candidatos a estarem envolvidos com a característica de tolerância ao alumínio, elaborou-se a Tabela 2.

Tabela 2 - SNV detectada nos genes *GSY1* (YFR015C), *DEG1*(YFL001W), *AIP5* (YFR016C), *QCR6* (YFR033C), *PHO4* (YFR034C), *ROG3* (YFR022W), *GCN20* (YFR009W), *PES4* (YFR023W), *CSS2* (YFR020W), *CMK1* (YFR014C), *YFR006w*, *YFR018c*, *RRT5* (YFR032C) no parental inferior (P2.5A), no parental superior(B8.20D) com seus respectivos aminoácidos codificado e SNV detectada no pool, superior em suas respectivas posições do cromossomo VI.

<i>Nome do gene</i>	Posição no cromossomo VI	Alelo no parental inferior	Aminoácido Codificado no parental inferior	Alelo no parental superior	Aminoácido Codificado no parental superior	Alelo no pool Superior
<i>GSY1</i>	174.519	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	Q	100% das <i>reads</i> apresentam alelo A	Q	68% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 32% apresentam alelo G
	174.556	98% das <i>reads</i> apresentam alelo C	Q	100% das <i>reads</i> apresentam alelo T	Stop códon	70% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 30% apresentam alelo G
	174.682	98% das <i>reads</i> apresentam alelo G	V	100% das <i>reads</i> apresentam alelo A	I	63% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 37% apresentam alelo G
	174.712	98% das <i>reads</i> apresentam alelo G	A	100% das <i>reads</i> apresentam alelo A	T	64% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 36% apresentam alelo G
	175.908	98% das <i>reads</i> apresentam alelo G	G	100% das <i>reads</i> apresentam alelo T	G	70% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 30% apresentam alelo G

DEGI	148.135	100% das <i>reads</i> apresentam alelo T	Y	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	D	57% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 43% <i>reads</i> apresentam alelo T
	148.136	98% das <i>reads</i> apresentam alelo A	Y	100% das <i>reads</i> apresentam alelo T	F	57% das <i>reads</i> apresentam alelo T e 43% <i>reads</i> apresentam alelo A
AIP5	177.606	94% das <i>reads</i> apresentam alelo T e 6% das <i>reads</i> apresentam alelo G	I	100% das <i>reads</i> apresentam alelo C	D	61% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 39% apresentam alelo T
	178.012	97% das <i>reads</i> apresentam alelo T e 3% das <i>reads</i> apresentam alelo A	F	98% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 2% das <i>reads</i> apresentam alelo T	N	61% das <i>reads</i> apresentam alelo A, 37% apresentam alelo T e 1% apresenta alelo C
	178.069	100% das <i>reads</i> apresentam alelo T	S	100% das <i>reads</i> apresentam alelo C	P	59% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 41% apresentam alelo T
	178.096	97% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 3% das <i>reads</i> apresentam alelo A	P	100% das <i>reads</i> apresentam alelo T	S	60% das <i>reads</i> apresentam alelo T e 40% apresentam alelo C
	178.373	100% das <i>reads</i> apresentam alelo A	E	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	G	68% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 32%

					apresentam alelo A
178.261	87% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 13% apresentam alelo C	N	89% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 11% apresentam alelo A	H	63% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 36% apresentam alelo A
178.452	100% das <i>reads</i> apresentam alelo A	V	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	V	62% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 38% apresentam alelo A
178.649	100% das <i>reads</i> apresentam alelo T	F	100% das <i>reads</i> apresentam alelo C	S	70% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 30% apresentam alelo T
179.773	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	A	98% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 2% apresentam alelo G	P	69% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 31% apresentam G
179.813	100% da <i>reads</i> apresentam alelo C	A	100% das <i>reads</i> apresentam alelo T	V	73% das <i>reads</i> apresentam alelo T e 27% apresentam alelo C
179.957	100% das <i>reads</i> apresentam alelo T	L	100% das <i>reads</i> apresentam alelo C	S	71% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 29% apresentam alelo T
QCR6	224.361	G	97% <i>reads</i> apresentam alelo T e 3% apresentam alelo A	G	69% das <i>reads</i> T apresentam alelo e 31% apresentam alelo C;
	224.384	M	100% das <i>reads</i>	T	67% das <i>reads</i> C

		apresentam alelo T		apresentam alelo C		apresentam alelo e 33% apresentam alelo T
CMKI	172.592	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	R	100% das <i>reads</i> apresentam alelo A	K	67% das <i>reads</i> A apresentam alelo e 33% apresentam alelo G;
	172.905	97% das <i>reads</i> T apresentam alelo e 3% apresentam alelo C	I	98% das <i>reads</i> C e apresentam alelo e 2% apresentam alelo T	I	67% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 33% apresentam alelo T;
YFR006W	156.464	97% <i>reads</i> apresentam alelo A e 3% apresentam alelo apresentam alelo G	E	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	G	68% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 32% apresentam alelo A
	156.537	100% das <i>reads</i> apresentam alelo apresentam alelo T	D	100% das <i>reads</i> apresentam alelo C	D	23% das <i>reads</i> apresentam alelo T e 77% das <i>reads</i> apresentam alelo C;
PHO4	225.450	100% das <i>reads</i> apresentam alelo A	T	98% das <i>reads</i> apresentam alelo T e 2% apresentam alelo A	T	69% das <i>reads</i> apresentam alelo T e 31% apresentam alelo A;
	225.676	100% das <i>reads</i> apresentam alelo T	R	96% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 4% apresentam alelo A	R	67% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 33% apresentam alelo A
	225.767	100% das <i>reads</i>	S	97% das <i>reads</i>	Y	68% das <i>reads</i>

		apresentam alelo C		apresentam alelo A e 3% apresentam alelo C		apresentam alelo C e 32% apresentam alelo A
ROG3	197.794	100% das <i>reads</i> apresentam alelo C	P	97% das <i>reads</i> apresentam alelo T e 3% apresentam alelo A	S	73% das <i>reads</i> apresentam alelo T e 27% apresentam alelo C
	198.516	100% da <i>reads</i> apresentam alelo A	I	98% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 2% apresentam alelo A	M	67% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 33% apresentam alelo A
	198.631	100% das <i>reads</i> apresentam alelo C	Q	95% das <i>reads</i> apresentam alelo T e 5% apresentam alelo C	Stop códon	50% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 50% apresentam alelo T
GNC20	162.925	100% das <i>reads</i> apresentam alelo A	T	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	A	67% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 33% apresentam alelo A
	163.549	97% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 3% apresentam alelo A	G	98% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 2% apresentam alelo C	R	80% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 20% apresentam alelo G
	163.093	100% das <i>reads</i> apresentam alelo C	H	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	D	85% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 15% apresentaram alelo C
	163.321	100% das <i>reads</i> apresentam alelo T	C	100% das <i>reads</i> apresentam alelo C	R	71% das <i>reads</i> apresentam alelo C, 28% apresentaram alelo T e 1%

						apresenta alelo G
CSS2	192.937	100% das apresentam alelo <i>reads</i> A	I	97% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 3% apresentam alelo A	V	67% <i>reads</i> apresentam alelo G e 33% apresentam alelo A
	193.039	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	A	100% das <i>reads</i> apresentam alelo A	T	71% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 29% apresentam alelo G
	193.175	98% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 2% apresentam alelo A	X	98% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 2% apresentam alelo T		80% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 20% apresentam alelo G
	193.319	98% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 2% apresentam alelo G	Q	97% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 3% apresentam alelo A	R	68% das <i>reads</i> apresentam alelo G; e 21% apresentam alelo A
	193.344	94% das <i>reads</i> apresentam alelo A, 4% apresentam alelo G, e 2% apresentam alelo T	Stop códon	98% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 2% apresentam alelo A	W	71% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 29% apresentam alelo A
	193.346	94% das <i>reads</i> apresentam alelo A, 4% apresentam alelo C e 2% apresentam alelo G	Y	98% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 2% apresentam alelo A	S	70% das <i>reads</i> apresentam alelo C, 29% apresentam alelo A e 1% apresenta alelo T
YFR018C	183.500	100% das <i>reads</i> apresentam alelo C	A	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	G	63% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 38%

						apresentam alelo C
	183.626	97% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 3% apresentam alelo A	G	100 % das <i>reads</i> apresentam alelo A	D	62% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 36% apresentam alelo G
<i>RRT5</i>	222.306	100% das <i>reads</i> apresentam alelo A	Stop códon	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	Stop códon	66% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 34% apresentam alelo A
	222.359	100 % das <i>reads</i> apresentam alelo T	L	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	R	73% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 27% apresentam alelo T
	222.369	97% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 3% apresentam alelo A	M	100% das <i>reads</i> apresentam alelo A	I	71% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 36% apresentam alelo G
	222.373	100% das <i>reads</i> apresentam alelo C	P	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	A	70% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 30% apresentam alelo C
	222.381	98% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 2% apresentam alelo A	G	100% das <i>reads</i> apresentam alelo A	G	69% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 31% apresentam alelo G
	222.408	98% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 2% apresentam alelo T	A	100% das <i>reads</i> apresentam alelo T	A	70% das <i>reads</i> apresentam alelo T e 30% apresentam alelo G
	222.940	100% das <i>reads</i>	L	100% das <i>reads</i>	L	63% das <i>reads</i>

	apresentam alelo T		apresentam alelo C		apresentam alelo C e 37% apresentam alelo T	
PES4	199.872	98% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 2% apresentam alelo C	K	93% das <i>reads</i> apresentam alelo C 3 % apresentam alelo G e 2% apresentam alelo A	N	82% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 18% apresentam alelo A
	199.933	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	E	100% das <i>reads</i> apresentam alelo A	K	86% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 14% apresentam alelo G
	200.310	91% das <i>reads</i> apresentam alelo A 7 % apresentam alelo G e 2% apresentam alelo T	Stop códon	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	W	100% das <i>reads</i> apresentam alelo T
	200.563	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	E	97% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 3% apresentam alelo G	K	71% das <i>reads</i> apresentam alelo A e 29% apresentam alelo G
	200.644	94% das <i>reads</i> apresentam alelo C e 6% apresentam alelo T	Q	100% das <i>reads</i> apresentam alelo T	Stop códon	81% das <i>reads</i> apresentam alelo T e 19% apresentam alelo C
DCVI	168.345	100% das <i>reads</i> apresentam alelo T	T	62% das <i>reads</i> apresentam alelo T e 38% apresentam alelo A	T	73% das <i>reads</i> apresentam alelo C, 14% apresentam alelo A e 8% apresentam alelo T

168.348	100% das <i>reads</i> apresentam alelo G	L	50% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 50% apresentam alelo T	L	73% das <i>reads</i> apresentam alelo G, 23% apresentam alelo T e 5% apresentam alelo C
168.352	77% das <i>reads</i> apresentam alelo G e 23% apresentam alelo C	A	55% das <i>reads</i> apresentam alelo G, 36% apresentam alelo C e 9% apresentam alelo A	A/P	76% das <i>reads</i> apresentam alelo G, 16% apresentam alelo A e 8% apresentam alelo C

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

(*)A: alanina; L: leucina; G: glicina; V: valina; I: isoleucina; P: prolina; F: fenilalanina; S: serina; T: treonina; Y: tirosina; N: asparagina; Q: glutamina; D: aspartato; E: glutamato; R: arginina; K: lisina; H: histidina; M: metionina e W: triptofano.

AIP5 possui 3.701pb, está localizado na posição 177.042 pb à 180.743 pb do cromossomo VI. Codifica uma grande proteína de 1.233 aminoácidos (GLOMB, O. BAREIS, L. JOHNSON, N. 2019). Foi observada 99,08% de identidade no alinhamento múltiplo entre as sequências consenso e variantes genéticas em cinco posições, as quais ocasionaram a mudança de 11 aminoácidos (mutações missenses), sendo eles aminoácido isoleucina no parental inferior, para aspartato no parental superior na posição 177.606 pb, fenilalanina no parental inferior, para asparagina no parental superior na posição 178.012 pb, serina no parental inferior, para prolina no parental superior na posição 178.069 pb, prolina no parental inferior, para serina no parental superior na posição 178.096 pb, glutamato no parental inferior, para glicina no parental superior na posição 178.373 pb, asparagina no parental inferior, para histidina no parental superior na posição 178.261 pb, fenilalanina no parental inferior, para serina no parental superior na posição 178.649 pb, alanina no parental inferior, para prolina no parental superior na posição 179.773 pb, alanina no parental inferior, para valina no parental superior na posição 179.813 pb, leucina no parental inferior, para serina no parental superior na posição 179.957 pb.

QRC6 possui 443 pb e está localizado na posição 224.326 pb à 224.769 pb do cromossomo VI. Codifica a subunidade 6 do complexo ubiquinol citocromo-c redutase, um componente da cadeia de transporte de elétrons da membrana interna mitocondrial (YANG, M. TRUMPOWER, B. L. 1994). Foram observadas duas variantes alélicas, no qual um alelo não modificou o aminoácido (sinônima) (224.361 pb) e uma variante alélica alterou o aminoácido metionina no parental inferior para aminoácido treonina (missense) no parental superior na posição 224.384 pb.

RRT5 possui 869 pb está localizada na posição 222.090 à 222.959 pb do cromossomo VI. Até o momento tem função desconhecida. As mutações observadas foram do tipo sinônimas e missense, as variantes alélicas ocasionaram alteração do aminoácido leucina no parental inferior para arginina no parental superior na posição 222.359 pb, metionina no parental inferior para isoleucina no parental superior na posição 222.369 pb e prolina para no parental inferior para alanina parental superior na posição 222.373 pb.

CKMI possui 1.340 pb está localizado na posição 172.537 à 173.877 pb do cromossomo VI. Codifica uma proteína quinase dependente de calmodulina e pode desempenhar um papel na resposta ao estresse. Nesse gene, as mutações observadas foram do tipo sinônimas e missense, as variações alélicas ocasionaram mudança do

aminoácido arginina no parental inferior para lisina no parental superior na posição 172.592 pb .

O gene *YFR006W* possui 1.607pb, está localizado na posição 156.145 à 157.752 do cromossomo VI, codifica uma proteína de fusão de proteína fluorescente verde (GFP) localizada no citoplasma. As mutações observadas foram do tipo sinônimas e missense, as variantes alélicas alteram o aminoácido glutamato no parental inferior para glicina no parental superior na posição 156.464 pb.

PES4 possui 1.835 pb está localizado na posição 199.874 à 201.709 pb do cromossomo VI, é regulador do comprometimento meiótico com função redundante com MIP6. As mutações nesse gene foram do tipo sinônimas, missense e sem sentido. As variantes alélicas resultaram em a alteração da lisina no parental inferior para asparagina no parental superior na posição 199.872 pb, glutamato no parental inferior para lisina no parental superior na posição 199.933 pb, um códon de parada observado no parental inferior codificou o triptofano no parental superior na posição 200.310 pb, glutamato no parental inferior para lisina no parental superior na posição 200.563 pb e a alteração alélica na posição 200.644 pb ocasionou alteração do aminoácido glutamina no parental inferior para um códon de parada.

O gene *PHO4* contém 938 pb está localizado na posição 225.020 à 225.958 pb do cromossomo VI, ativa a transcrição cooperativamente com Pho2p em resposta à limitação de fosfato. Foi observada 99,15% de identidade no alinhamento múltiplo entre as sequências consenso. As mutações observadas foram do tipo sinônimas e missense, as variantes resultaram na alteração de arginina no parental inferior para treonina no parental superior na posição 225.676 pb e serina no parental inferior para treonina no parental superior na posição 225.767 pb.

ROG3 possui 2.201pb, está localizado na posição 196.833 à 199.034 pb e codifica a proteína α -arrestina que está envolvida na endocitose dependente de ubiquitina. O alinhamento do gene *ROG3* na cepa BY4741, na parental superior e no parental inferior apresentou um percentual de identidade de 99,55%. As mutações observadas foram do tipo missense e sem sentido. Esse gene apresentou as variantes genéticas em três posições que provocaram na alteração do aminoácido prolina no parental inferior para serina no parental superior na posição 197.794 pb, isoleucina no parental inferior para metionina no parental superior na posição 198.516 pb e glutamina no parental inferior para um códon de parada no parental superior na posição 198.631 pb.

GNC20 possui 2.258 pb está localizado na posição 162.488 à 164.746 pb do cromossomo VI, é regulador positivo da atividade da quinase Gcn2p. Foi observada 99,82% de identidade no alinhamento múltiplo da sequência desse gene entre a cepa BY4741, a parental superior e a parental inferior. As mutações observadas foram do tipo missense, com variante genética na posição 162.925 pb que alterou o aminoácido treonina no parental inferior para alanina no parental superior, glicina no parental inferior para arginina no parental superior, na posição 163.549 pb, histidina no parental inferior para aspartato no parental superior, na posição 163.093 pb e cisteína no parental inferior para arginina no parental superior, na posição 163.321 pb.

CSS2 possui 698 pb, está localizado na posição 192.737 à 193.435 pb e codifica uma proteína de função desconhecida. Foi observada 99,28% de identidade no alinhamento múltiplo da sequência desse gene entre a cepa BY4741, a parental superior e a parental inferior. As mutações observadas foram do tipo missense e sem sentido, com variantes genéticas em cinco posições, na qual, o aminoácido isoleucina no parental inferior para valina no parental superior, na posição 192.937 pb, alanina glutamina no parental inferior para tirosina no parental superior, na posição 193.039 pb, glutamina no parental inferior para arginina no parental superior, na posição 193.319 pb, e o códon de parada no parental inferior codificou o triptofano no parental superior, na posição 193.344 pb.

O gene *DVCI* tem função desconhecida, possui 608 pb e está localizado na posição 167.888 à 168.496 pb do cromossomo VI. Foi observada 99,34% de identidade no alinhamento múltiplo da sequência desse gene entre a cepa BY4741, a parental superior e a parental inferior. As mutações observadas foram do tipo sinônimas, as variantes alélicas observadas na sequência desse gene foram representadas pelas letras K, W e S (Figura 14). Essas letras representam ambiguidade, no qual a letra K observada pode representar T ou G, a letra W observada pode ser T ou A e a letra S pode ser C ou G. Nas posições 168.345 pb e 168.343 a alteração dos alelos não modificaram o aminoácido, contudo na posição 168.352 pb a ambiguidade pode codificar o aminoácido alanina (GCA) ou prolina (CCA) para o parental superior.

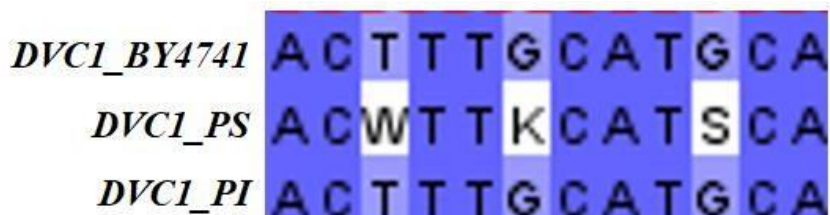


Figura 14: Variantes alélicas observadas no gene *DVC1* representadas pelas letras K, W e S nas posições 168.345 pb e 168.343 e 168.352 do cromossomo VI. Essas letras representam ambiguidade, no qual a letra K observada pode representar T ou G, a letra W observada pode ser T ou A e a letra S pode ser C ou G. Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Em síntese, foi possível identificar SNVs em 18 genes candidatos a estarem envolvidos com a tolerância ao alumínio em *S. cerevisiae*. Sabe-se que qualquer variante genética tem potencial para alterar o fenótipo de um organismo, independente da localização que se encontre. Neste contexto, no presente trabalho, focou-se em descrever todas as variantes observadas a região codificante dos genes candidatos que apresentassem: alelo de maior frequência do *pool* superior igual ao alelo de maior frequência do parental superior e, diferente do alelo de maior frequência no parental inferior. Foram observadas três variantes nas quais o alelo presente no parental inferior gerava um stop códon (proteína truncada), enquanto no parental superior o alelo codificava um resíduo de aminoácido que potencialmente permitia a produção da proteína na sua forma ativa.

Segundo Adachi e Yu (2020), a término da tradução resultante de mutações sem sentido em alguns genes geram uma proteína truncada que geralmente é não funcional e às vezes até prejudicial às células. No entanto, no experimento *in vitro* realizado neste trabalho, as cepas carregando os genes *CSS2*, *GSY1* e *PES4* inativos, foram tolerantes a concentração de 10 mM até diluição 10^{-2} de alumínio. Ou seja, a ausência da proteína codificada por esses genes levou ao aumento da tolerância ao alumínio.

Foram observadas 38 variantes alélicas do tipo missense (aquelas que alteraram o aminoácido). Essas mutações missenses representam uma classe importante do código genético (QI *et al*, 2021), pois a mudança de um único aminoácido é capaz de romper uma rede de interações intramoleculares, afetando não só a forma como uma proteína se dobra, mas também sua estabilidade, dinâmica, função e fenótipos

(RODRIGUES, C. H.;PIRES, D. E.; E ASCHER, D. B. 2021). Essas variantes serão melhor investigadas no futuro, porém indicam alelos que podem estar envolvidos com a tolerância ao alumínio.

Além disso foram observadas variações que alteraram a sequência dos nucleotídeos mas não alteraram o aminoácido (variantes sinônimas). Embora codifiquem o mesmo aminoácido, segundo Culverhouse, (2018), o padrão de utilização dos códons sinônimos pode divergir entre as espécies, resultando em um viés de uso de códon que pode aumentar a expressão gênica em até 1000 vezes ou diminuir (se a substituição for para um código no qual o RNA transportador é produzido em baixa frequência naquela espécie). Isto que em partes, explica a capacidade de variações sinônimas alterarem a taxa de tradução do gene, alterando sua concentração sem alterar a conformação da proteína.

Na análise de variantes genéticas não foram encontradas variantes nos genes *RPL29* e *UBP6*. Contudo, ficou claro que, nas condições analisadas, ambos os genes têm um efeito significativo na resistência ao alumínio quando deletado, desse modo faz-se necessário avaliar as regiões intergênicas, 5'-UTR's e 3'-UTRs desses genes.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho aponta 18 genes sendo eles, *IGD1*, *GSY1*, *DEG1*, *AIP5*, *QCR6*, *DVC1*, *PHO4*, *ROG3*, *GCN20*, *PES4*, *CSS2*, *CMK1*, *UBP6*, *RPL29*, *YFR006w*, *YFR018c*, *RRT5* e *YFR035C* envolvidos com a tolerância ao alumínio em *S. cerevisiae*. Os resultados obtidos confirmam a hipótese de que outros genes dentro do *QTL* VI, descrito por Mezdri (2018), além do *FABI*, estão envolvidos na tolerância ao alumínio.

Assim, combinar a deleção do gene *FABI* com os genes candidatos apresentados neste estudo é altamente promissor para bioprospecção de leveduras para produção de bioetanol.

7 PERSPECTIVAS

- Confirmar a tolerância ao alumínio dos genes candidatos por meio da análise de reciprocidade hemizigótica;
- Introduzir os genes/alelos identificados em cepas industriais visando melhorar a eficiência do processo fermentativo para produção do bioetanol;
- Deletar toda a região do *QTL* de tolerância ao alumínio e avaliar a contribuição dos genes essenciais.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADACHI, H., e YU, Y. T. (2020). Suppression of nonsense mutations by new emerging technologies. **International Journal of Molecular Sciences** , 21 (12), 4394.

AMORIM, H. V. D., BASSO, L. C., e LOPES, M. L. (2009). Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. **The alcohol textbook**.

ARGAWAL, A. (2007). Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 33, p. 233-271.

AZHAR, S. H. M., ABDULLA, R., JAMBO, S. A., MARBAWI, H., GANSAU, J. A., FAIK, A. A. M., e RODRIGUES, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and biophysics reports**, 10, 52-61.

BAI, F. W., ANDERSON, W. A., & MOO-YOUNG, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology advances**, 26(1), 89-105.

BILLAH, M. M.; HASSAN, M. H.; KALAM, M. A.; PALASH, S. M.; HABIBULLAH, M. (2014). Effect of alcohol-gasoline blends optimization on fuel properties and their effect on SI engine performance and emission. **Journal of Cleaner Production**, v. 86, n. 1, p. 230-237.

BOLIVAR-TELLERIA, M., TURBAY, C., FAVARATO, L., CARNEIRO, T., DE BIASI, R. S., FERNANDES, A. A. R., e FERNANDES, P. (2018). Second-generation bioethanol from coconut husk. **BioMed Research International**.

CARDOSO, L. H. (2022). Avaliação do impacto da inativação de genes associados ao estresse celular em *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (Mestrado), Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu.

CARPIO, R. R. (2019) Otimização do processo de produção de etanol de segunda geração em um sistema integrado à primeira geração/Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2019. XVIII, 225 p.: il.; 29,7cm. Tese (doutorado) UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Química.

CHEN, R. H.; CHIANG, L. B.; CHEN, C. N.; LIN, T. H. (2011). Cold-start emissions of an SI engine using ethanol-gasoline blended fuel. **Applied Thermal Engineering**, v. 31, n. 8-9, p. 1463-1467.

CHERRY, J. M., ADLER, C., BALL, C., CHERVITZ, S. A, DWIGHT, S. S, HESTER, E. T, e BOTSTEIN, D. (1998). SGD: Banco de dados do genoma de *Saccharomyces*. **Nucleic acid research** , 26 (1), 73-79.

CHRISTOPHER J. WALKEY, ZONGLI LUO, CHRISTOPH H. BORCHERS, VIVIEN MEASDAY, HENNIE JJ VAN VUUREN. (2011) The *Saccharomyces cerevisiae* fermentation stress response protein Igd1p/Yfr017p regulates glycogen levels by inhibiting the glycogen debranching enzyme **FEMS Yeast Research** , Volume 11, Issue 6 , setembro de 2011, páginas 499–508, <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00740>.

CULVERHOUSE, R. C., SACCONI, N. L., HORTON, A. C., MA, Y., ANSTEY, K. J., BANASCHEWSKI, T., e BIERUT, L. J. (2018). Collaborative meta-analysis finds no evidence of a strong interaction between stress and 5-HTTLPR genotype contributing to the development of depression. **Molecular psychiatry**, 23(1), 133-142.

DE CARVALHO, B. T. et al. Identification of novel alleles conferring superior production of rose flavor phenylethyl acetate using polygenic analysis in yeast. **MBio**, v. 8, n. 6, p. e01173-17, 2017. ISSN 2150-7511. DUITAMA et al., 2014

DIALLINAS, G., MARTZOUKOU, O. (2019) Transporter membrane traffic and function: lessons from a mould. **FEBS J.** Dec;286(24):4861-4875. doi:10.1111/febs.15078. Epub 2019 Oct 17. PMID: 31583839.

DOVE, S. K., COOKE, F. T., DOUGLAS, M. R., SAYERS, L. G., PARKER, P. J., e MICHELL, R. H. (1997) Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3, 5-bisphosphate synthesis. **Nature** 390(6656), 187-192.

DUAN, F., DUITAMA, J., AL SEESI, S., AYRES, C. M., CORCELLI, S. A., PAWASHE, A. P., e SRIVASTAVA, P. K. (2014). Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity. **Journal of Experimental Medicine**, 211(11), 2231-2248.

GHAZIKHANI, M., HATAMI, M., SAFARI, B.; GANJI, D. D. (2013). Experimental investigation of performance improving and emissions reducing in a two stroke SI engine by using ethanol additives. **Propulsion and Power Research**, v. 2, n.4, p. 276-283.

GLOMB O, BAREIS L, JOHANSSON N.(2019) YFR016c/Aip5 is part of an actin nucleation complex in yeast. **Biol Open**. doi: 10.1242/bio.044024. PMID: 31362951; PMCID: PMC6737964.

GRANGEIA, C., SANTOS, L., e LAZARO, L. L. B. (2022). The Brazilian biofuel policy (RenovaBio) and its uncertainties: An assessment of technical, socioeconomic and institutional aspects. **Energy Conversion and Management: X**, 13, 100156.

HELGA THORVALDSDÓTTIR, JAMES T. ROBINSON, JILL P. MESIROV.(2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. **Briefings in Bioinformatics** 14, 178-192 (2013).

HOLYOAK CD, THOMPSON S, ORTIZ CALDERON C, HATZIXANTHIS K, BAUER B, KUCHLER K, PIPER PW, COOTE PJ. Loss of Cmk1 Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase in yeast results in constitutive weak organic acid resistance, associated with a post-transcriptional activation of the Pdr12 ATP-binding cassette transporter. **Mol Microbiol**. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02017.x. PMID: 10931353

JIN, L., ZHANG, K., STERNGLANZ, R., e NEIMAN, A. M. (2017). Predicted RNA binding proteins Pes4 and Mip6 regulate mRNA levels, translation, and localization during sporulation in budding yeast. **Molecular and cellular biology**, 37(9), e00408-16

JIN, Y. H., DUNLAP, P. E., MCBRIDE, S. J., AL-REFAI, H., BUSHEL, P. R., FREEDMAN, J. H. (2008). Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. **PLoS Genet**. doi: 10.1371/journal.pgen.1000053. PMID: 18437200; PMCID: PMC2278374.

KATZ EZOV, T. A. L., CHANG, S. L., FRENKEL, Z. E., SEGRE, A. V., BAHALUL, M., MURRAY, A. W. e KASHI, Y. (2010). Heterothallism in *Saccharomyces cerevisiae* isolates from nature: effect of HO locus on the mode of reproduction. **Molecular ecology**, 19(1), 121-131.

KNOP, M. Yeast cell morphology and sexual reproduction - A short overview and some considerations. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 334, n. 8–9, p. 599–606, 2011.

LI, X., QIAN, J., WANG, C., ZHENG, K., YE, L., FU, Y., HAN, N., BIAN, H., PAN, J., WANG, J., ZHU, M. (2011)Regulating cytoplasmic calcium homeostasis can reduce aluminum toxicity in yeast. **PLoS One**. doi: 10.1371/journal.pone.0021148. Epub 2011 Jun 15. PMID: 21698264; PMCID: PMC3115986.

LI, Y., LIU, C., WANG, N. *et al.* Fine mapping of a QTL locus (*QNFSP07-1*) and analysis of candidate genes for four-seeded pods in soybean. **Mol Breeding** 41, 71 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11032-021-01265-6>

LITI G, WARRINGER J, BLOMBERG A. Mapping Quantitative Trait Loci in Yeast. **Cold Spring Harb Protoc.** 2017 Aug 1;2017(8):pdb.prot089060. doi: 10.1101/pdb.prot089060. PMID: 28765293

MALAV, L. C., YADAV, K. K., GUPTA, N., KUMAR, S., SHARMA, G. K., KRISHNAN, S., ... e BACH, Q. V. (2020). A review on municipal solid waste as a renewable source for waste-to-energy project in India: Current practices, challenges, and future opportunities. **Journal of Cleaner Production**, 277, 123227.

MICHELMORE, R. W., PARAN, I., e KESSELI, R. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the national academy of sciences**, 88(21), 9828-9832.

MUSSATTO, S. I., DRAGONE, G., GUIMARÃES, P. M., SILVA, J. P. A., CARNEIRO, L. M., ROBERTO, I. C., ... & TEIXEIRA, J. A. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology advances**, 28(6), 817-830.

NAY, M. T., PATRICK, J. O., ZHONG-HUA, C., XI-YANG, W., TREVOR, D. B., CINDY. K., MING, J. W., (2014). Identification of aluminium transport-related genes *via* genome-wide phenotypic screening of *Saccharomyces cerevisiae*, **Metalomics**, Volume 6, Issue 8, Pages 1558–1564, <https://doi.org/10.1039/c4mt00116h>

OHYA, Y., KAWASAKI, H., SUZUKI, K., LONDESBOROUGH, J., & ANRAKU, Y.(1991). Dois genes de levedura que codificam proteínas quinases dependentes de calmodulina. Isolamento, sequenciamento e expressões bacterianas de CMK1 e CMK2. **Journal of Biological Chemistry** , 266 (19), 12784-12794.

PAIS T. M., FOULQUIÉ-MORENO, M. R., THEVELEIN J. M. (2014) QTL mapping by pooled-segregant whole-genome sequencing in yeast. **Methods Mol Biol.** 2014;1152:251-66. doi: 10.1007/978-1-4939-0563-8_15. PMID: 24744038.

PARAPOULI, M., VASILEIADIS, A., AFENDRA, A. S., HATZILOUKAS, E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS Microbiol.** 2020 Feb

11;6(1):1-31. doi: 10.3934/microbiol.2020001. PMID: 32226912; PMCID: PMC7099199

PELTIER, E., FRIEDRICH, A., SCHACHERER, J., & MARULLO, P. (2019). Quantitative trait nucleotides impacting the technological performances of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Frontiers in Genetics**, 10, 683.

PIEKARSKA, I., RYTKA, J., e REMPOLA, B. (2010). Regulation of sporulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Biochimica Polonica**, 57(3), 241-50.

QI, T., WU, Y., ZENG, J., et al (2020). Identifying gene targets for brain-related traits using transcriptomic and methylomic data from blood. **Nat Commun**. Jun 11;9(1):2282. doi: 10.1038/s41467-018-04558-1. PMID: 29891976; PMCID: PMC5995828.

ROBERTSON CG, CLARK-COTTON MR, LEW DJ. Mechanisms that ensure monogamous mating in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Biol Cell**. 2021 Apr 15;32(8):638-644. doi: 10.1091/mbc.E20-12-0757. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33596113; PMCID: PMC8108519.

ROBINSON, J. T., THORVALDSDÓTTIR, H., WINCKLER, W., GUTTMAN, M., LANDER, E. S., GETZ, G., & MESIROV, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. **Nature biotechnology**, 29(1), 24-26.

SCHOTT, E., GARDNER, R. (1994) Aluminum-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **254**, 63–72 (1997). <https://doi.org/10.1007/s004380050391>

SWINNEN, S. THEVELEIN, J. M., NEVOIGT, J. (2012). Genetic mapping of quantitative phenotypic traits in *Saccharomyces cerevisiae*, **FEMS Yeast Research**, Volume 12, Issue 2, March 2012, Pages 215–227, <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00777.x>

WANG, Z., QI, Q., LIN, Y. *et al.* (2019). QTL analysis reveals genomic variants linked to high-temperature fermentation performance in the industrial yeast. **Biotechnol Biofuels** **12**, 59 <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1398-7>

WATERHOUSE, A.M., PROCTER, J.B., MARTIN, D.M.A, CLAMP, M. AND BARTON, G. J. (2009). Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and 50 analysis workbench Bioinformatics doi: 10.1093/bioinformatics/btp033

XU, H., FANG, T., YAN, H. *et al.*, (2019). The protein kinase Cmk2 negatively regulates the calcium/calcineurin signalling pathway and expression of calcium pump genes *PMR1* and *PMCI* in budding yeast. **Cell Commun Signal**. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0320>

YAO, Y. C.; TSAI, J. H.; WANG, I. T. (2013). Emissions of gaseous pollutant from motorcycle powered by ethanol–gasoline blend. **Applied Energy**, v. 102, n .1, p. 93-100.

