

**GENÉTICA E MELHORAMENTO DE *Candida* sp PARA A  
PRODUÇÃO DE COALHO MICROBIANO**

**MARIA HELENA PELEGRINELLI FUNGARO**

**Biomédica**

**Orientador: Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner**

Tese apresentada à Escola Superior de  
Agricultura "Luiz de Queiroz", da  
Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Doutor em  
Agronomia. Área de concentração:  
Genética e Melhoramento de Plantas

**PIRACICABA**

**ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL**

**NOVEMBRO DE 1990**

GENÉTICA E MELHORAMENTO DE *Candida* sp PARA A  
PRODUÇÃO DE COALHO MICROBIANO

Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Aprovada em: 05.02.1991.

Comissão julgadora:

Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner	ESALQ/USP
Prof. Dr. João Lucio de Azevedo	ESALQ/USP
Prfa. Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira	ESALQ/USP
Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato	UNICAMP/Campinas
Dr. Tobias José Barreto de Menezes	ITAL/Campinas

*Aline A. Pizzirani-Kleiner*

Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

Orientadora

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,  
nunca tem medo e nunca se arrepende"

Leonardo da Vinci

A Maria Helena Pelegrinelli,  
pelo exemplo de dedicação e bondade  
que tanto aprendi a admirar.  
A minha mãe, Maria Teresa, pelo amor  
que sempre soube nos transmitir

**DEDICO**



## AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner e ao Prof. Dr. Cláudio Lopes de Souza Jr., pelos trabalhos de orientação e coorientação, que permitiram a realização desta tese.

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pelas inúmeras sugestões apresentadas.

Ao Dr. Tobias José B. de Menezes e a MS Terezinha de Jesus G. Salva, pesquisadores do Instituto de Tecnologia de Alimentos, pela concessão do material biológico e informações transmitidas.

A Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira, pelas valiosas sugestões e colaboração prestadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao doutorando Luciano L. Nass e ao Prof. João A.C. Andrade, pelo auxílio na redação das metodologias genético-estatísticas.

A doutoranda Cláudia Barros Monteiro e a mestranda Isabel Cristina dos Santos pela revisão dos originais.

A todos os professores do Instituto de Genética da ESALQ, pela contribuição na minha formação científica.

Aos funcionários do Departamento de Genética da ESALQ, em especial ao Sr. Antônio José Rocha Campos, Carlos Alberto Nolasco, Sandra E. R. C. Wehr e Elisabete A. Leone Rodrigues, pela ajuda e atenção.

A Universidade Estadual de Londrina, em particular ao Departamento de Biologia Geral, pela oportunidade concedida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos, Olívia M. N. Arantes, Marisa V. Queiroz, Vitor Warwar, Marina E. Vega, Marcelo A. Vallim, José Odair Pereira, Salete A. Gaziola, José Sebastião C. Fernandes, Sílvia Molina, Mônica Labate, Gustavo H. Goldman, Cláudio Costa, João A. Pamphile, Sônia A. V. Pileggi e Marcos Pileggi, pelo agradável período de convivência.

A minha querida Angélica, pela compreensão, estímulo e amor que sempre me ofereceu. Ao meu cunhado e amigo Marcos Stringhetta, pelo apoio constante.

## INDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISAO DA LITERATURA.....	4
2.1. O coelho microbiano.....	6
2.2. O uso do método de mutação-seleção para o melhoramento de caracteres quantitativos.....	19
2.3. Parassexualidade em leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	23
3. MATERIAL E METODOS.....	33
3.1. Material biológico.....	33
3.2. Meios de cultura e soluções.....	34
3.3. Curva de sobrevivência à luz ultravioleta.....	41
3.4. Curva de sobrevivência ao EMS.....	41
3.5. Curva de crescimento em meio YEPD.....	42
3.6. Obtenção de mutantes auxotróficos.....	42
3.7. Caracterização dos mutantes auxotróficos.....	43
3.8. Teste de reversão.....	44
3.9. Obtenção e regeneração de protoplastos.....	44
3.10. Fusão de protoplastos.....	45
3.11. Procedimentos utilizados para a seleção de	

produtos de fusão nuclear .....	46
3.12. Coloração de núcleos.....	46
3.13. Obtenção de genótipos recombinantes.....	47
3.14. Avaliação da atividade coagulante (AC).....	48
3.15. Avaliação da atividade proteolítica (AP).....	49
3.16. Metodologias utilizadas para o melhoramento genético e estimativas de parâmetros genético-estatísticos.....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSAO.....	59
4.1. Melhoramento genético de <i>Candida</i> sp para a produção de coalho microbiano.....	60
4.2. Parassexualidade em <i>Candida</i> sp.....	82
5. CONCLUSOES.....	99
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	100
APENDICES.....	112

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 01. Relação de fungos descritos na literatura como produtores de enzimas coagulantes do leite.....	12
Tabela 02. Relação das reninas fúngicas de uso comercial.....	14
Tabela 03. Literatura a respeito de tipos de queijos preparados com reninas fúngicas comerciais.....	14
Tabela 04. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AC para a população CO, segundo o delineamento experimental em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).....	60
Tabela 05. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AP para a população CO, segundo o delineamento inteiramente casualizado, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).....	61
Tabela 06. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância agrupada dos dados de AC para a população C1, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).....	62
Tabela 07. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AP para a população C1, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).....	62
Tabela 08. Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos	

para a população C1, para os caracteres AC e AP.....	65
Tabela 09. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância agrupada dos dados de AC da população C2, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).....	69
Tabela 10. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AP para a população C2, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).....	69
Tabela 11. Estimativa de parâmetros genéticos e fenotípicos para a população C2, para os caracteres AC e AP.....	70
Tabela 12. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância agrupada dos dados de AC da população C3, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).....	72
Tabela 13. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AP para a população C3, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).....	73
Tabela 14. Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos para a população C3, para os caracteres AC e AP.....	73
Tabela 15. Médias e porcentagens relativas para o caráter AC, apresentadas pelas colônias selecionadas.....	75
Tabela 16. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância com regressão linear, das colônias selecionadas nos diferentes ciclos para o caráter AC, segundo o delineamento inteiramente casualizado, média geral, coeficiente de variação experimental (CV%) e coeficiente de	

determinação ( $R^2$ ).....	76
Tabela 17. Médias e porcentagens relativas para o caráter AP apresentadas pelas colônias selecionadas.....	78
Tabela 18. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância com regressão linear das colônias selecionadas nos diferentes ciclos para o caráter AP, segundo o delineamento inteiramente casualizado, média geral, coeficiente de variação experimental (CV%) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).....	79
Tabela 19. Frequência de obtenção de mutantes auxotróficos de <i>Candida</i> sp, através dos métodos de isolamento total e enriquecimento com nistatina.....	84
Tabela 20. Porcentagem de conversão de células em protoplastos e de regeneração, em três molaridades de TSP (média de três repetições).....	89
Tabela 21. Comprimentos celulares e diâmetros nucleares do produto de fusão e das linhagens auxotróficas parentais (média de 15 repetições).....	92
Tabela 22. Diâmetros nucleares e respectivos desvios padrão das linhagens recombinantes, parentais e produto de fusão nuclear (média de 15 repetições).....	95

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01. Recombinação mitótica em <i>Candida albicans</i> .....	26
Figura 02. Características celulares da <i>Candida</i> sp, quando cultivada em meio BDA líquido (x.1000).....	34
Figura 03. Coagulação do leite pela ação do Renital.....	50
Figura 04. Histograma de frequência dos dados de atividade coagulante para a população C1, sendo N=537; Média geral=103,902; Amplitude de variação= 33,03 a 238,67.....	64
Figura 05. Histograma de frequência dos dados de atividade proteolítica para a população C1, sendo N=537; Média geral=2,675; Amplitude de variação= 1,85 a 4,44.....	64
Figura 06. Regressão linear para o caráter atividade coagulante em função dos ciclos de seleção.....	77
Figura 07. Regressão linear para o caráter atividade proteolítica em função dos ciclos de seleção.....	80
Figura 08. Curva de sobrevivência de <i>Candida</i> sp à luz ultravioleta.....	83
Figura 09. Curva de sobrevivência de <i>Candida</i> sp aoEMS.....	85
Figura 10. Quadro genealógico dos mutantes auxotróficos obtidos.....	87
Figura 11. Curva de crescimento de <i>Candida</i> sp em meio YEPD.....	89



Figura 12. Protoplastos de <i>Candida</i> sp, em tampão fosfato-sorbitol 1,2 M.....	91
Figura 13. Coloração de núcleos do mutante pab <sup>-</sup> bio <sup>-</sup> de <i>Candida</i> sp.....	93

## GENÉTICA E MELHORAMENTO DE *Candida* sp PARA A PRODUÇÃO DE COALHO MICROBIANO

Autor: Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Orientador: Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-kleiner

### RESUMO

O coalho é uma mistura enzimática responsável pelo processo de coagulação do leite que é usado na fabricação de queijos. Ele é tradicionalmente isolado do quarto estômago de bezerros. O grande aumento no consumo mundial de queijos, associado ao alto custo do coalho animal, estimulou a busca de novas fontes de coalho.

O presente trabalho teve como objetivo básico, desenvolver uma metodologia para o melhoramento genético de uma linhagem de *Candida* sp, uma levedura isolada do solo, a qual mostrou-se promissora para a produção de um substituto do coalho animal.

As metodologias utilizadas para o melhoramento genético envolveram três ciclos de mutação-seleção, com o objetivo de aumentar a atividade coagulante e diminuir a atividade de outras proteases não específicas, que são responsáveis por causar sabor amargo ao queijo.

A indução de variabilidade genética foi feita utilizando-se de irradiação ultravioleta em doses que permitiam 5% de sobrevivência. No primeiro ciclo de seleção, foram avaliadas 179 colônias (população C1); uma única colônia foi selecionada para dar origem, após mutagênese, à população C2, constituída de 70 colônias; este método foi repetido mais uma vez para dar origem ao terceiro ciclo seletivo.

Ao final do terceiro ciclo de seleção, foi obtido um aumento de 98% para o caráter atividade coagulante e uma redução de 20% para o caráter atividade proteolítica. As metodologias utilizadas também permitiram estimar as variâncias genéticas e covariâncias ao nível das populações. Herdabilidade, progresso esperado com seleção e coeficiente de correlação genética entre atividade coagulante e atividade proteolítica foram igualmente estimados.

Foi também objetivo deste trabalho, descrever o ciclo parassexual em *Candida* sp, uma vez que esta levedura não apresenta o ciclo sexual.

Mutantes com duplas marcas auxotróficas foram obtidos após tratamento com a luz ultravioleta. Dois métodos foram utilizados para a seleção destes mutantes: o de enriquecimento com nistatina e o de isolamento total. O primeiro método mostrou rendimento cerca de quatro vezes maior em relação ao de isolamento total.

As condições de obtenção e regeneração de protoplastos foram estabelecidas utilizando-se, inicialmente, a linhagem selvagem de *Candida* sp. Posteriormente, foi feita a fusão de protoplastos entre linhagens auxotróficas (**pab bio** e **ura arg**) com polietileno glicol. As colônias prototróficas formadas, foram selecionadas por complementação em meio mínimo.

A partir de um produto de fusão nuclear selecionado, foram obtidos vários recombinantes monoauxotróficos, os quais apresentaram diâmetros nucleares semelhantes aos parentais. Este fato sugeriu que estes recombinantes auxotróficos se originaram por perdas cromossômicas.

O ciclo parassexual descrito neste trabalho poderá ser útil, em futuros programas de melhoramento genético de *Candida* sp.

## GENETIC AND BREEDING OF *Candida* sp FOR MICROBIAL RENNET PRODUCTION

Author: Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Adviser: Dr. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

### SUMMARY

Rennet is an enzymatic mixture responsible for the milk clotting process used in cheese manufacture. It is normally isolated from the fourth stomach of unweaned calves. The increasing world consumption of cheese and the high prices of calf rennet, stimulated the search for a suitable substitute for rennet. The basic aim of this research was to develop a method for genetic improvement of a strain of *Candida* sp, a soil isolated yeast, which showed good potential as a rennet substitute.

The methodologies used for genetic breeding involved three cycles of mutagenesis and selection. The objective was to select strains producing specific coagulating activity with only low levels of non-specific proteinases, that are responsible for the bitter flavour of cheese.

Genetic variability was induced by using ultra violet rays as a mutagenic agent. The treatment times were chosen to give 5% survival. On the first selection cycle, 179 colonies were evaluated (C<sub>1</sub> population); to prepare cell populations for the second cycle of mutagenesis, one colony was selected; in this and in the subsequent cycle of selection, 70 colonies were picked for assay. At the end of the third cycle, a near 98% increase in coagulating activity was achieved and a 20% decrease in proteolytic activity was obtained. The methodology used also allowed the estimation of genetic and phenotypic

variances and covariances at the population level. Heritability, genetic progress through selection, coefficient of genetic correlation between clotting activity and proteolytic activity were also estimated.

The objective of this work was also to describe the parasexual cycle of *Candida* sp, which is generally considered to exist in the asexual state. Double auxotrophic mutants were selected from U.V. mutagenized cultures. Two methods were used to recover them, such as, nistatin enrichment and total isolation. The enrichment method was shown to be four times better than the total isolation method. The conditions for protoplast isolation and regeneration were established for the wild-type strain of *Candida* sp. Protoplasts prepared from the auxotrophic strains (*pab<sup>bio</sup>* and *ura<sup>arg</sup>*) were fused with polyethylene glycol. Prototrophic derivatives formed by this fusion protocol were selected by complementation on minimal medium.

From a selected nuclear fusion product, several monoauxotrophic recombinants were obtained, whose nuclear diameter remained similar to the parental ones. This fact suggested that the auxotrophic recombinants arose from chromosome loss.

The parasexual cycle described by this research may be useful in future for genetic improvement programmes of *Candida* sp.

## 1. INTRODUÇÃO

Embora o homem faça uso da microbiologia aplicada há milhares de anos, na fabricação do pão, vinho, cerveja e queijos, o conhecimento científico a respeito das reações bioquímicas envolvidas nos processos de fermentação é relativamente recente. É decorrente desse conhecimento, o advento da utilização deliberada de microrganismos para a produção de outras substâncias específicas, tais como vitaminas, antibióticos, hormônios, enzimas, etc.

No que diz respeito particularmente à produção de enzimas, elas podem ser obtidas de microrganismos, de animais e de vegetais. Entretanto, atualmente existe por parte da indústria uma tendência de substituir as enzimas de origem vegetal e animal por aquelas de origem microbiana. A preferência pelas enzimas microbianas fundamenta-se nos seguintes pontos: a) existe a possibilidade de obtenção de grandes populações celulares produtoras de enzima; b) pode-se praticar a seleção de linhagens de alta

produtividade por manipulações genéticas; c) os procedimentos envolvidos na extração das enzimas são, em geral, mais simples e econômicos; d) o produto não é sazonal.

Uma situação bastante ilustrativa desta tentativa de substituição pelas enzimas microbianas, é o que vem ocorrendo com a enzima utilizada na manufatura de queijos: o coalho é uma mistura enzimática extraída do quarto estômago de bezerros, que é utilizada pelas indústrias de laticínios para transformar o leite em um coágulo. Esta mistura enzimática foi durante muitos anos, o único agente coagulante empregado na fabricação de queijos. Entretanto, com o aumento da demanda do consumo da carne e do queijo, ocorreu a escassez do coalho de bezerros no mercado e tornou-se necessária a busca de fontes alternativas de enzimas coagulantes.

Uma das alternativas viáveis e que vem sendo empregada nos Estados Unidos e alguns países da Europa, é a utilização de enzimas coagulantes obtidas a partir de microrganismos. Nesse sentido, pesquisadores brasileiros tem direcionado seus esforços e, na década de 70, a Seção de Fermentações do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, Campinas, SP), isolou uma levedura de solo, *Candida* sp, que produz um coalho com atividade coagulante comparável aqueles coalhos fúngicos já comercializados no exterior. Este produto enzimático foi denominado Renital e, atualmente, os pesquisadores do ITAL vem conduzindo uma série de estudos visando aprimorar a tecnologia de sua produção.

Assim, dentro de uma perspectiva de colaborar com a viabilização da comercialização do Renital, este trabalho teve por finalidade desenvolver metodologias para o melhoramento genético de *Candida* sp, visando aumentar a atividade coagulante e diminuir a atividade proteolítica (indesejada por causar sabor amargo ao queijo) do complexo enzimático Renital.

Este trabalho teve ainda por objetivo, descrever o ciclo parassexual em *Candida* sp. A utilização deste processo de recombinação poderá permitir a prática de cruzamentos entre linhagens selecionadas e conseqüentemente a obtenção de recombinantes, os quais poderão ser aproveitados em futuros programas de melhoramento genético desta levedura.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

O melhoramento genético de microrganismos pode basear-se em dois métodos principais, o da mutação-seleção e o da recombinação seguida de seleção.

O método da mutação-seleção implica em avaliar uma população de colônias sobreviventes a um tratamento mutagênico e proceder a seleção daquelas colônias mais promissoras para o caráter desejado. Esta é a metodologia que tem, até o momento, produzido os maiores avanços em termos de melhoramento microbiano, tanto para caracteres de natureza simples, ou qualitativos como para os quantitativos.

O método recombinacional consiste em fazer a transferência de material genético entre linhagens contrastantes, obter recombinantes e proceder a seleção para o caráter de interesse. Esta transferência de material

genético em fungos pode ser feita através de cruzamentos sexuais e parassexuais ou utilizando-se da tecnologia do DNA recombinante.

Em um programa de melhoramento, a opção por uma ou outra técnica de transferência de material genético dependerá de certas características biológicas (como ciclo de vida, por exemplo) do microrganismo envolvido, assim como da base genética do caráter a ser melhorado.

A tecnologia do DNA recombinante é interessante quando se deseja o melhoramento de um caráter simples pois permite apenas a transferência de um ou poucos genes. Por outro lado, quando se utilizam as técnicas de cruzamentos sexuais ou parassexuais é possível a transferência de inúmeros genes e portanto podem ser úteis tanto para programas de melhoramento de caracteres qualitativos como quantitativos. Não são muitos os exemplos de programas de melhoramento que fizeram uso do ciclo sexual, porque esta técnica é limitada evidentemente a espécies perfeitas, o que é pouco frequente entre os fungos de interesse industrial que são na maioria imperfeitos. Em função disso, o método recombinacional de melhoramento para caracteres quantitativos em fungos industriais tem se restringido ao uso do ciclo parassexual.

Considerando-se o contexto deste trabalho onde o objetivo principal foi obter linhagens melhoradas para um caráter quantitativo em uma espécie imperfeita, a revisão da literatura a ser apresentada a seguir consistirá de três tópicos: (a) uma abordagem geral sobre o produto microbiano a ser melhorado, (b) uma relação de trabalhos que fizeram uso do método mutação-seleção para o melhoramento microbiano para caracteres quantitativos e (c) uma discussão sobre o processo parassexual descrito em algumas espécies do gênero *Candida*.

## 2.1. O Coalho microbiano

As origens do queijo datam da história antiga, quando os povos nômades da África e Oriente deslocavam-se em caravanas transportando o leite em bolsas feitas com o couro do estômago de animais. O contato do leite com substâncias do couro fazia, eventualmente, com que o leite coagulasse. A massa coagulada foi degustada e apreciada, e desta forma estes povos perceberam que haviam chegado a uma excelente maneira de conservar o leite, ou seja as proteínas lácticas. Com o passar dos tempos, o homem resolveu colocar a massa coagulada em formas, adicionar-lhe sabores e maturá-la, chamando o produto resultante de queijo, do latim *caseum*, nome dado à proteína do leite. Posteriormente, foram desenvolvidos diferentes processos de fabricação, maturação e de utilização de ingredientes especiais, o que originou diferentes tipos de queijos. Independente da imensa variedade de queijos existente, algumas características são comuns à fabricação de todos eles: a coagulação do leite, por exemplo, é uma etapa fundamental no processo de elaboração de todos os tipos de queijos.

Durante muitos anos, o coalho de bezerros foi o principal preparo enzimático utilizado para coagular o leite destinado para a fabricação de queijos. Tradicionalmente, o coalho é extraído do quarto estômago de bezerros e comercializado na forma líquida ou em pó. A enzima renina, recentemente denominada quimosina, é o componente do coalho responsável pela coagulação do leite.

O processo de biossíntese da quimosina ocorre em etapas: inicialmente, é formada uma proteína precursora de 381 aminoácidos denominada preproquimosina. Na ocasião da secreção, a preproquimosina é processada originando a proquimosina que contém 365 aminoácidos

(FOLTMANN *et al.*, 1977; MOIR *et al.*, 1982). A proquimosina é enzimaticamente inativa porém, em condições de pH ácido, é ativada por um processo de clivagem originando assim uma proteína ativa de 323 aminoácidos, a quimosina ( PEDERSON *et al.*, 1979). A quimosina é uma haloproteína de 31.000 daltons pertencente ao grupo das proteases ácidas, estável em pH ácido (5,3 - 6,3), inativa em pH básico (aproximadamente 7,5) e é desnaturada em pH 8,0.

O mecanismo de coagulação do leite sob a ação da quimosina tem sido estudado por diversos autores ( OHMIYA *et al.*, 1987; FOX, 1989). De uma maneira geral, a coagulação pela quimosina envolve a hidrólise da ligação peptídica entre os aminoácidos de posição 105 (fenilalanina) e 106 (metionina) na cadeia da caseína-K. Esta reação leva à desestabilização das micelas de caseína na presença de íons cálcio. Posteriormente, estas micelas de caseína desestabilizadas se agregam formando grumos. Por fim, estes grumos aumentam de tamanho para formar o leite coagulado.

A formação da quimosina ocorre durante as primeiras semanas de vida do bezerro, sendo mais tarde paulatina e principalmente substituída pela pepsina. Esta é a razão pela qual para a obtenção da quimosina deve-se sacrificar preferencialmente o animal ainda muito jovem, entre a segunda e a quarta semana de vida.

Com o aumento da demanda da carne bovina e do consumo de queijos começou a ocorrer a escassez do coalho de bezerros e tornou-se necessária a busca de fontes alternativas de enzimas coagulantes do leite.

Nos últimos anos, vários substitutos da renina animal foram encontrados e, atualmente, alguns deles vêm sendo utilizados comercialmente para coagular o leite destinado à fabricação de certos tipos de queijos. Os trabalhos de revisão da literatura (SCOTT,1973; SARDINAS,1969;

STERNBERG,1976) mostram que estes substitutos podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana. Neste sentido, os produtos que merecem destaque são: as proteases microbianas, a mistura em igual proporção de renina e pepsina bovina, a pepsina de galinha e a pepsina de porco.

As reninas microbianas são enzimas proteolíticas, capazes de induzir a coagulação do leite de modo similar à renina de bezerros. O uso de microrganismos oferece grandes vantagens para a substituição da renina de bezerros porque permite a obtenção de um produto que não é sazonal, em grande quantidade e a baixo custo. Atualmente, o uso de reninas microbianas como substituto da renina de bezerros está bem estabelecido industrialmente. A título de exemplo, podemos citar o que ocorreu nos Estados Unidos no ano de 1974 quando 60% da produção de queijos foi decorrente da utilização de coalhos microbianos ( STERNBERG,1976 ).

Dentre os problemas mais comumente encontrados com os substitutos da renina de bezerros, podemos destacar a pronunciada atividade proteolítica do coalho microbiano que pode causar sabor amargo não desejado, sinérese prolongada e desenvolvimento de textura não apropriada. Este fator indesejado tem sido contornado através da seleção de linhagens que produzam proteases com atividade altamente específica para a coagulação porém, com baixos níveis de proteases não específicas. Portanto, um substituto da renina de bezerros, apropriado para a manufatura de queijos, deve apresentar alta atividade coagulante e baixa atividade proteolítica não específica. Desta forma, o estabelecimento de uma relação entre atividade coagulante (AC) e atividade proteolítica (AP) exprime com melhor precisão a potencialidade de um microrganismo para a produção de renina. Esta relação AC/AP tem sido utilizada por diversos pesquisadores como um parâmetro para a seleção de amostras microbianas promissoras para a produção de

renina (ARIMA *et al.*, 1967; SHRINIVASAN *et al.*, 1964; MENEZES & NAGATO, 1974; D' SOUZA & PEREIRA, 1982). Quanto maior a relação AC/AP, mais promissora será a linhagem produtora de enzimas com elevada atividade coagulante e com menor risco de imprimir características indesejáveis resultantes de uma proteólise pronunciada.

Segundo a revisão de SARDINAS (1976), a produção de enzimas coagulantes por bactérias foi descrita pela primeira vez em 1892. A partir desta data, muitas bactérias foram descritas como produtoras de renina. Embora o autor cite que 18 espécies de bactérias tenham sido descritas, somente algumas tiveram seus produtos avaliados na produção de queijos. Isso se deve ao fato de que a maioria das enzimas produzidas por estes organismos apresentaram uma baixa relação AC/AP. Dentre as bactérias que tiveram seus produtos avaliados para a produção de queijos, o autor menciona os *Bacillus cereus*, *B. mesentericus*, *B. polymyxa* e *B. subtilis*. Os queijos produzidos com os complexos enzimáticos de *B. cereus* e de *B. mesentericus* mostraram-se de má qualidade, por apresentarem problemas de textura e sabor. Por outro lado, o produto enzimático obtido de *B. polymyxa* foi de boa qualidade, seu uso foi patenteado e tem sido vendido por um laboratório dos Estados Unidos sob o nome de "Micozyme". O produto enzimático elaborado pelo *B. subtilis* também deu origem a queijos de boa qualidade, entretanto não tem sido vendido em escala comercial.

D' SOUZA & PEREIRA (1982) isolaram 63 microrganismos do solo e do leite e procederam a avaliação destas culturas para a produção de enzimas coagulantes. Um dos critérios de seleção utilizado para escolher o melhor isolado baseou-se em baixa atividade proteolítica e alta atividade coagulante, o que resultou na escolha de uma linhagem de *Bacillus licheniformis*. Embora tenham sido conduzidos uma série de estudos visando aumentar a produção,

purificar e estabelecer propriedades bioquímicas da enzima obtida de *B. licheniformis*, nenhum tipo de avaliação quanto à qualidade do queijo produzido por esta renina microbiana foi realizado.

Apesar de um grande número de fungos terem sido descritos como produtores de enzimas coagulantes (Tabela 01), somente três reninas fúngicas têm sido comercialmente utilizadas para a produção de queijos. Estes produtos são derivados dos fungos *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* e *M. pusillus*.

Alguns estudos têm relatado propriedades bioquímicas gerais, tais como, peso molecular, composição de aminoácidos, ponto isoelétrico e termoestabilidade, do principal componente proteolítico contido nos caldos de fermentação dos fungos *Endothia parasitica* (SARDINAS, 1969), *Mucor pusillus* (SARDINAS, 1969) e *Mucor miehei* (STERNBERG, 1971). A tabela 02 sumariza os nomes dos microrganismos produtores, dos produtos comerciais e das indústrias fornecedoras dos coalhos fúngicos comerciais. Estas três reninas fúngicas têm sido utilizadas na elaboração de muitas variedades de queijos (Tabela 03). O sabor, a textura e a aparência dos queijos derivados por estes processos são, em geral, similares aos queijos preparados com a renina animal (STERNBERG, 1976).

Também no Brasil, alguns trabalhos foram conduzidos no sentido de buscar um substituto para a renina animal. MENEZES & NAGATO (1974), da Seção de Fermentações Industriais do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas - SP, isolaram 358 amostras de microrganismos do solo, das quais 25 de bactérias, 11 de fungos filamentosos e uma de levedura, produziram filtrados capazes de coagular o leite. Dentre estes microrganismos a linhagem de levedura (*Candida* sp) foi aquela que apresentou atividade coagulante mais elevada. O produto obtido da levedura *Candida* sp apresentou-se com alta relação AC/AP e ativo por um longo período de tempo, o que é bastante

importante quando se visa a exploração comercial. Segundo os autores deste trabalho, uma outra indicação de que a levedura isolada tem potencial para a produção de renina, foi a boa qualidade dos queijos tipos Minas e Prato, produzidos com o complexo enzimático de *Candida* sp. Este complexo enzimático de *Candida* sp foi denominado de Renital.

A relação AC/AP do Renital foi comparada com as reninas obtidas de *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* e com a de bezerros. As maiores relações foram obtidas com a renina de bezerros (AC/AP = 2.650) e com o Renital (AC/AP = 2.157). As relações AC/AP obtidas para as reninas dos fungos *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* e *M. miehei* foram, respectivamente, 1.290, 1.665 e 1.638 (MENEZES & MENEZES, 1974).

Visando estabelecer um meio de cultura que fosse de baixo custo e que proporcionasse elevado rendimento para a produção de Renital, MENEZES *et al*(1973/4) estudaram diferentes composições de meios de cultura contendo produtos e subprodutos industriais. O meio de cultura constituído de fubá, sacarose e carbonato de cálcio foi o que mostrou melhores resultados para a produção do Renital.

A determinação de uma série de parâmetros bioquímicos e do processo de produção do Renital levou os autores a concluir que o uso do Renital na produção de queijo é viável. Entretanto, essa produção teria maior êxito se o Renital fosse usado na forma imobilizada, depois de purificado em coluna de troca iônica (MENEZES *et al*. 1977; MENEZES & MENEZES, 1977).



Tabela 01. Relação de fungos descritos na literatura como produtores de enzimas coagulantes do leite (\*segundo STERNBERG,1976 e SARDINAS,1976).

Fungo	Autor(es)
<i>Absidia ramosa</i>	SANNABHARDI & SRINIVASAN (1974)*
<i>Agaricales sp.</i>	FEDOROVA & SHIVRINA (1974)*
<i>Aphyllophorales</i>	FEDOROVA & SHIVRINA (1974)*
<i>Aschochyta visa</i>	ARIMA & IWASAKI (1964)*
<i>Aspergillus awamori</i>	LOBAREVA <i>et al</i> (1972)*
<i>Aspergillus fischeri</i>	ABDEL-FATTAH & EL-HAWWARY(1974)*
<i>Aspergillus flavus</i>	ABDEL-FATTAH & EL-HAWWARY(1974)*
<i>Aspergillus fumigatus</i>	BAILEY & SIIKA-AHO (1988)
<i>Aspergillus giganteus</i>	ABDEL-FATTAH & EL-HAWWARY(1974)*
<i>Aspergillus hennenbergii</i>	ABDEL-FATTAH & EL-HAWWARY(1974)*
<i>Aspergillus nidulans</i>	KRISHNAMURTHY <i>et al</i> (1973)*
<i>Aspergillus niger</i>	ABDEL-FATTAH & MABROUK (1971)*
<i>Aspergillus versicolor</i>	ABDEL-FATTAH & EL-HAWWARY(1974)*
<i>Basidiobolus ranerum</i>	ORINGER (1960); WHITEHILL (1960)*
<i>Byssochlamys fulva</i>	CHU <i>et al</i> . (1973); JEDRYCHOWSKI <i>et al</i> . (1974); RYMASZEWSKI <i>et al</i> . (1973)*
<i>Candida lipolytica</i>	YOSRINO <i>et al</i> (1972)*
<i>Candida sp.</i>	MENEZES & NAGATO (1974)
<i>Chaetomium globosum</i>	ORINGER (1960)*
<i>Cladosporium sp.</i>	ABDEL-FATTAH & EL-HAWWARY (1974)
<i>Clamydomyces oryzae</i>	ELLIS <i>et al</i> (1974)*
<i>Colletotrichum atramentarium</i>	ARIMA (1967)*
<i>Coriolus consors</i>	KAWAI & MUKAI (1970)*
<i>Cunninghamella echinulata</i>	ABDEL-FATTAH & EL-HAWWARY(1974)*
<i>Dothiorella ribis</i>	YU <i>et al</i> (1971)*
<i>Endothia parasitica</i>	SARDINAS (1965); SARDINAS (1968)*
<i>Entomophthora epiculata</i>	WHITEHILL (1960); KNIGHT (1966)*
<i>Epicoccum purpureocens</i>	ABDEL-FATTAH & EL-HAWWARY(1974)*
<i>Fomes fomentarius</i>	MUKAI & KAWAI (1970)*
<i>Fomitopsis pinicola</i>	MUKAI & KAWAI (1970)*
<i>Gliocladium roseum</i>	REPSI (1970)*

Tabela 01. Continuação

<i>Humicola stellata</i>	MERENDI (1970)*
<i>Irpex lacteus</i>	KAWAI (1971)*
<i>Leucosporium betulina</i>	MUKAI & KAWAI (1970)*
<i>Monascus anka</i>	ARIMA & IWASAKI (1964)*
<i>Mucor cacinelloides</i>	BAILEY & SIKA-AHO (1988)
<i>Mucor hiemalis</i>	ABDEL-FATTAH & EL-HAWWARY (1974)*
<i>Mucor lamprosporus</i>	WILKEN & BAKKER (1974)*
<i>Mucor miehei</i>	AUNSTRUP (1968)*
<i>Mucor mucedo</i>	SU <i>et al</i> (1972)*
<i>Mucor pusillus</i>	ARIMA (1967)*
<i>Mucor renninus</i>	ZVIAGINTSEV <i>et al</i> (1972)*
<i>Penicillium chrysogenum</i>	ABDEL-FATTAH & EL-HAWWARY (1974)*
<i>Penicillium citricum</i>	ABDEL-FATTAH <i>et al</i> (1972); ABDEL-FATTAH & EL-HAWWARY (1972, 1973)*
<i>Penicillium expansum</i>	ABDEL-FATTAH & EL-HAWWARY (1974)*
<i>Penicillium martensii</i>	ABDEL-FATTAH & EL-HAWWARY (1974)*
<i>Phyfarum polycephalum</i>	FARR (1974), FARR <i>et al</i> (1974)*
<i>Rhizopus arrhizus</i>	ELLIS <i>et al</i> (1974)*
<i>Rhizopus chinensis</i>	ELLIS <i>et al</i> (1974)*
<i>Rhizopus chungkuensis</i>	ELLIS <i>et al</i> (1974)*
<i>Rhizopus hangchao</i>	ELLIS <i>et al</i> (1974)*
<i>Rhizopus microsporus</i>	ELLIS <i>et al</i> (1974)*
<i>Rhizopus nivens</i>	ELLIS <i>et al</i> (1974)*
<i>Rhizopus oligosporus</i>	ELLIS <i>et al</i> (1974)*
<i>Rhizopus oryzae</i>	ELLIS <i>et al</i> (1974)*
<i>Rhizopus rhizopodiformis</i>	ELLIS <i>et al</i> (1974)*
<i>Rhizopus stolonifer</i>	ELLIS <i>et al</i> (1974)*
<i>Schizophyllum commune</i>	MUKAI & KAWAI (1970)*
<i>Sclerotium oryzae-sativa</i>	ARIMA & IWASAKI (1964)*
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	SINGH & VEZINA (1971)*
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	SANNABADTHI <i>et al</i> (1970)*
<i>Torulopsis spp.</i>	TEPLEY (1971)*
<i>Trametes ostreiformis</i>	KOBAYASHI <i>et al</i> (1975)*
<i>Trametes sanguinea</i>	KAWAI & MUKAI (1970)*

Tabela 02. Relação das reninas fúngicas de uso comercial ( STERNBERG, 1976).

Microrganismos	Nome Comercial	Fornecedor
<i>Endothia parasitica</i>	Suparen	Pfizer Internacional
<i>Endothia parasitica</i>	Sure-Curd	Pfizer, Inc.
<i>Mucor miehei</i>	Fromase	Wallerstein Co.
<i>Mucor miehei</i>	Hannilase	Chr. Hansen's Lab. Inc.
<i>Mucor miehei</i>	Marzyme	Miles Lab., Inc.
<i>Mucor miehei</i>	Rennilase	Novo Industri A/S
<i>Mucor pusillus</i> var. <i>Lindt</i>	Emporase	Dairyland Food Lab., Inc.
<i>Mucor pusillus</i> var. <i>Lindt</i>	Meito MR.	Meito Sangyo
<i>Mucor pusillus</i> var. <i>Lindt</i>	Noury Rennet	Vitex

Tabela 03. Literatura a respeito de tipos de queijos preparados com reninas fúngicas comerciais (STERNBERG, 1976).

Renina microbiana	Tipo de queijo	Autor(es)
<i>Endothia parasitica</i>	Cheddar	LAWRENCE <i>et al</i> (1972); POZNANSKI <i>et al</i> (1974)
	Crescenza	CARINI <i>et al</i> (1973,1974)
	Duch	NADASSKY (1971)
	Gouda	CARINI <i>et al</i> (1974)
	Herve	WECKE & VANDERPOOTEN (1973)
	Italico	CARINI <i>et al</i> (1974)
	Kortowski	POZNANSKI <i>et al</i> (1974)
	Robiola	CARINI <i>et al</i> (1974)
	Taleggio	CARINI <i>et al</i> (1974)
	Tilsit	POZNANSKI <i>et al</i> (1974)

Tabela 03. Continuação

<i>Mucor miehei</i>	Bel Paese	DOLEZALEK <i>et al</i> (1974)
	Camembert	RAMET & ALAIS (1972)
	Cheddar	DINESEM <i>et al</i> (1975); LAWRENCE <i>et al</i> (1972); WIGLEY (1974)
	Crescenza	CARINI <i>et al</i> (1973,1974)
	Domiat	HANDY (1972)
	Edam	TOMA (1973)
	Emmental	RAMET & ALAIS (1973)
	Gouda	VANDERPOORTEN & WECKY (1972)
	Italico	CARINI <i>et al</i> (1974)
	Rachkaval	SIPKA <i>et al</i> (1973, 1974); TOMA (1973)
	Saint Paulin	AARNES (1971); RAMET & ALAIS (1973)
	Taleggio	CARINI <i>et al</i> (1974)
	Trapist	SIPKA <i>et al</i> (1973, 1974)
	White Brine	SIPKA <i>et al</i> (1973, 1974); TOMA (1973)
	<i>Mucor pusillus</i>	Cheddar
Crescenza		CARINI <i>et al</i> (1973,1974)
Edam		DE KONING (1972b)
Gouda		DE KONING (1972b); VANDERPOORTEN & WECKY (1972)
Grana		ALBERRINI & NIZZOLA 91974)
Italico		CARINI <i>et al</i> (1974)
Kartowski		POZMANSKI <i>et al</i> (1974)
Robiola		CARINI <i>et al</i> (1974)
Taleggio		CARINI <i>et al</i> (1974)
Tilsit		POZMANSKI <i>et al</i> (1974)

O recente desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, tem proporcionado a produção da quimosina bovina por microrganismos engenheirados. A expressão do gene da proquimosina bovina foi descrita em *Escherichia coli* (EMTAGE *et al.*, 1983; NISHIMORI *et al.*, 1984), *Saccharomyces cerevisiae* (MELLOR *et al.*, 1983; GOFF *et al.*, 1984), *Kluyveromyces lactis* (van den BERG *et al.*, 1990), *Aspergillus nidulans* (CULLEN *et al.*, 1987) e *Trichoderma reesei* (HARKKI *et al.*, 1989).

O gene da proquimosina foi inserido em um plasmídeo bacteriano contendo o promotor do gene triptofano de *E. coli*. Posteriormente, as células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo construído (pCT66) foram avaliadas quanto à expressão do gene que codifica a proquimosina. Após fermentação, cerca de 1 a 5% do total de proteínas presentes nas células de *E. coli* eram de proquimosina. Entretanto, esta proteína foi acumulada na forma de corpos de inclusão e uma série de procedimentos visando a extração, purificação e ativação foi necessária (EMTAGE *et al.*, 1983).

Uma linhagem de *S. cerevisiae* (CGY 189) capaz de sintetizar a proquimosina foi obtida através de transformação genética, utilizando-se o vetor pCGS128. Este plasmídeo carrega a sequência de DNA que codifica a metil-quimosina ligada a um eficiente promotor transcricional de leveduras (Pgal 1, promotor do gene que codifica a galactoquinase). A levedura transformada foi capaz de produzir uma proteína bastante semelhante à quimosina bovina (GOFF *et al.*, 1984).

A princípio, a produção de quimosina tanto em *E. coli* (EMTAGE *et al.* 1983) como em *S. cerevisiae* (GOFF *et al.*, 1984; MELLOR *et al.*, 1983) foi intracelular, resultando em um produto insolúvel que para ser isolado exigia uma série de procedimentos laboriosos. Evidentemente, a recuperação da proteína seria facilitada caso se conseguisse a secreção direta para o meio de

fermentação. Neste particular, Moir *et al*<sup>1</sup>, citado por CULLEN *et al*, 1987 obtiveram uma linhagem transformada de *S. cerevisiae* capaz de secretar a proquimosina. Entretanto, a secreção ocorreu somente em 1% da quantidade total produzida. Apesar das várias tentativas de se melhorar a secreção de quimosina por *S. cerevisiae*, o nível de quimosina produzida extracelularmente é ainda baixo, cerca de 20 mg por litro em uma densidade celular de 25 g por litro. Ao contrário disso, a levedura *Kluyveromyces lactis* mostrou-se um excelente organismo hospedeiro para a produção e secreção de quimosina. Um dos transformantes obtidos foi capaz de secretar para o meio de crescimento mais de 95% da quimosina produzida. Uma das linhagens de *K. lactis* (SL 56) transformada com o plasmídeo pKS 105, foi selecionada para produzir a quimosina em grande escala. A enzima produzida (em uma escala de 41.000 litros) mostrou todas as características da quimosina de bezerras e tem sido utilizada com sucesso na produção de queijos em alguns países (van den BERG *et al.*, 1990)

Os fungos filamentosos também representam uma alternativa possível para a obtenção de quimosina bovina. A expressão e secreção da proquimosina pelo *Aspergillus nidulans* envolveu a construção de plasmídeos contendo diferentes unidades de expressão, compostas do cDNA proquimosina ou do cDNA preproquimosina, flanqueadas por regiões de controle da transcrição, tradução e secreção do gene que codifica a produção de glucoamilase em *A. niger*. A secreção de polipeptídeos idênticos enzimática e imunologicamente à quimosina bovina foi possível após a transformação

---

<sup>1</sup> MOIR, D.T., MAO, J., DUNCAN, M.J., SMITH, R.A., and KOHNO, T. 1985. Production of calf chymosin by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. p. 75-85 In: *Developments in Industrial microbiology*. Vol. 26. Society for Industrial Microbiology, Arlington, VA.

genética de uma linhagem de *A. nidulans*. A maioria da quimosina sintetizada, cerca de 90%, foi secretada para o meio de cultura na forma enzimática ativa (CULLEN *et al.*, 1987).

HAREKI *et al.* (1989) construíram quatro vetores diferentes, a fim de determinar a melhor maneira de ligar o cDNA da quimosina ao promotor e ao terminador do gene que codifica para a enzima celobiohidrolase (cbh 1) de *Trichoderma reesei*. Os quatro plasmídeos foram utilizados para transformar o fungo *T. reesei* e em todos os casos pode-se observar a secreção de um polipeptídeo correspondente à proquimosina. Os resultados obtidos foram particularmente promissores, uma vez que a taxa de secreção foi bastante superior àquelas conseguidas para *S. cerevisiae* e *A. nidulans*. Ao contrário do que foi observado para o *A. nidulans* (CULLEN *et al.*, 1987), a secreção dos polipeptídeos ocorreu tanto na forma de quimosina como na forma de proquimosina porém, os polipeptídeos de proquimosina foram rapidamente processados sob o pH ácido do meio extracelular.

Além disso, a tecnologia do DNA recombinante também vem sendo utilizada para clonar genes que codificam reninas microbianas. YAMASHITA *et al.* (1987) e HIRAMATSU *et al.* (1989) descreveram a clonagem do gene estrutural da renina de *Mucor pusillus* (MPR) em *S. cerevisiae*. Neste hospedeiro, a enzima ativa foi secretada eficientemente no meio de crescimento em uma concentração de 150 mg por litro. A enzima secretada pela levedura recombinante foi mais glicosilada que a enzima nativa de *Mucor*, mas suas propriedades enzimáticas foram quase idênticas àquelas da enzima nativa de *M. pusillus*.

Neste tópico procurou-se dar uma idéia de quais as estratégias que vem sendo utilizadas para se chegar à obtenção de enzimas coagulantes do leite, que sejam de boa qualidade e produzidas a baixo custo. Como pode ser

observado, até a década de 80 os trabalhos limitavam-se a isolar microrganismos produtores de enzimas coagulantes e a estudar as propriedades bioquímicas destas enzimas. A partir da década de 80, o advento da tecnologia do DNA recombinante permitiu que fossem feitos estudos visando a clonagem, expressão e a secreção do gene da quimosina de bezerros em microrganismos hospedeiros.

## **2.2. O uso do método de mutação-seleção para o melhoramento de caracteres quantitativos.**

A indução de mutação, tem se constituído em uma ferramenta valiosa para aumentar a variabilidade genética de caracteres quantitativos de várias espécies de microrganismos. Considerando que os efeitos da mutação induzida em caracteres quantitativos não são facilmente observáveis no fenótipo, as metodologias de análise biométrica e de genética quantitativa são poderosos instrumentos na avaliação e identificação dos efeitos dos agentes mutagênicos nas populações em estudo.

Dentro deste contexto, SIMPSON & CATEN (1979a) estudaram a variação quantitativa da produção de penicilina em populações de *Aspergillus nidulans* tratadas com diferentes doses dos mutagênicos, metano sulfonado de etila (EMS), nitrosoguanidina (NTG) e  $\delta$ -metoxipisoralem ( $\delta$  MOP). Tanto as populações não tratadas quanto as populações tratadas com os mutagênicos, apresentaram distribuição contínua para os dados de produção de penicilina. As médias de produção das populações tratadas foram, em geral, menores do que das populações não tratadas. Por outro lado, a amplitude de variação da



produção de penicilina foi maior para as populações mutagenizadas e, na maioria dos casos, esta amplitude aumentou com o incremento da dose do tratamento mutagênico. Para as populações não mutagenizadas não detectou-se variação genética ( $\sigma_g^2 = 0$ ). Após a indução de mutação, no entanto, a variação genética foi significativa na maioria dos casos. A magnitude da variação genética induzida variou conforme o tipo de mutagênico e a dose utilizados. As comparações estabelecidas entre os três mutagênicos, indicaram que o  $\delta$ -MOP é menos eficiente para induzir variabilidade genética para a produção de penicilina do que os mutagênicos EMS e NTG.

Uma vez conhecida a atuação dos mutagênicos NTG, EMS e  $\delta$ -MOP no que diz respeito à indução de variabilidade genética, um programa de mutação-seleção recorrente foi desenvolvido a fim de se obter linhagens de *Aspergillus nidulans* melhoradas para a produção de penicilina (SIMPSON & CATEN, 1979 b). Os autores partiram de duas linhagens de *A. nidulans*, sendo que para cada uma delas foi desenvolvido um programa de seleção (programa A e B) com seis ciclos de mutação-seleção. O  $\delta$ -MOP foi utilizado no programa A como indutor de mutação, enquanto o EMS foi utilizado no programa B. Com exceção do primeiro ciclo do programa A, onde somente 50 colônias foram avaliadas, os programas de seleção foram idênticos. Em cada programa, 100 colônias sobreviventes ao tratamento mutagênico foram avaliadas quanto à produção de penicilina e, baseando-se em um único teste de produção, as 5 melhores colônias foram selecionadas para darem origem ao próximo ciclo de mutação-seleção. Após realizados os seis ciclos de seleção um experimento envolvendo todas as linhagens selecionadas em cada um dos ciclos, foi conduzido a fim de verificar se houve de fato ganho genético com seleção. Esta metodologia mostrou-se bastante apropriada para o melhoramento do *A.*

*nidulans*, uma vez que em ambos os programas foi conseguido um aumento de aproximadamente 300% na produção de penicilina.

O fungo *Aspergillus niger* é um microrganismo de importância industrial empregado na produção de vários ácidos orgânicos, especialmente ácido cítrico (LOCKWOOD, 1975). Em função disso, SILVA & AZEVEDO (1978) desenvolveram um programa de melhoramento envolvendo três ciclos de mutação-seleção recorrente, com o objetivo de aumentar a produção de ácidos orgânicos. A irradiação gama, em dose que permite 1,6% de sobrevivência, foi utilizada para induzir variabilidade. Em cada um dos ciclos, 50 colônias foram avaliadas quanto a produção de ácidos, e uma intensidade de seleção de aproximadamente 5% foi utilizada para escolher o número de colônias que seria submetido a um novo tratamento mutagênico. A princípio, a avaliação da produção de ácidos foi feita em placas de Petri considerando-se a relação entre diâmetro de halo e o respectivo diâmetro da colônia (unidade ácida). Esta é uma metodologia que embora não seja muito precisa, permite devido a sua praticidade, avaliar um grande número de colônias simultaneamente. Posteriormente, as colônias selecionadas em cada um dos ciclos foram avaliadas em condições de fermentação. Este procedimento, embora seja de natureza mais trabalhosa, representa com maior fidelidade as condições industriais. A análise de variância dos dados referentes a unidade ácida, mostrou que as populações irradiadas apresentavam maior variabilidade do que uma população controle não irradiada. A análise de correlação entre a média de unidade ácida para cada população e os ciclos de seleção (coeficiente de correlação = 0,95647), indicou que houve progresso genético no decorrer dos ciclos de seleção. A média do caráter unidade ácida para a população do 3º ciclo foi 76% maior que a da população controle. Entretanto, o coeficiente de correlação entre unidade ácida e produção de ácidos por

fermentação foi não significativo, indicando que a seleção para o caráter unidade ácida não necessariamente levará a maior produção de ácidos sob condições industriais de fermentação.

Ainda dentro desta linha de trabalho, BARACHO & PEREIRA (1983) submeteram uma linhagem de *A. niger*, usada para a produção de ácido cítrico, a sucessivos ciclos de mutação-seleção. O agente mutagênico utilizado foi a luz ultravioleta, em uma dose que permitia 30% de colônias sobreviventes. Para cada ciclo, trinta colônias foram isoladas ao acaso e então analisadas quantitativamente quanto à produção de ácidos totais. Posteriormente, as colônias mais produtoras eram selecionadas. Foram conduzidos oito ciclos de seleção e as linhagens selecionadas em cada um dos ciclos foram analisadas. Através deste programa, foi possível obter-se um isolado cuja produção de ácido cítrico foi 51,3% maior do que a da linhagem original.

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, vem sendo amplamente utilizado no Brasil para o controle biológico das cigarrinhas de pastagem e de cana-de-açúcar. Considerando-se que a capacidade do fungo em produzir certas enzimas extracelulares está relacionada com a virulência, a obtenção de linhagens geneticamente melhoradas para a produção de enzimas é um dos caminhos para se chegar a linhagens mais eficientes no controle biológico de insetos. Dentro desta idéia, SILVA *et al* (1989) desenvolveram um programa de mutação-seleção recorrente, visando aumentar a produção das enzimas extracelulares do tipo amilase, lipase e protease pelo fungo *M. anisopliae*. O mutagênico utilizado, foi o  $\delta$ -MOP combinado com a luz ultravioleta em doses que permitiam 25% de sobrevivência. A avaliação da produção de enzimas, foi feita através da relação entre o diâmetro do halo formado e o diâmetro da colônia (índice enzimático). Foram realizados dois

ciclos de mutação-seleção sendo que, em cada um dos ciclos, 20 colônias foram avaliadas. A colônia de maior índice enzimático, obtida no primeiro ciclo, foi selecionada para dar origem, após mutagênese, à população do segundo ciclo. Os autores observaram que as populações resultantes dos tratamentos mutagênicos, apresentaram maior variabilidade do que uma população controle, não mutagenizada. As médias das produções de amilase, lipase e protease foram significativamente maiores com o decorrer dos ciclos de seleção. Posteriormente, as colônias de maiores índices enzimáticos foram avaliadas quanto à virulência em ninfas de *Triatoma infestans*. A linhagem de maior índice enzimático para o sistema amilase, foi a que apresentou maior virulência seguida daquela de maior índice para o sistema lipase. Entretanto, a linhagem com maior índice para proteases, mostrou virulência similar à linhagem controle.

Os trabalhos apresentados neste item da revisão, demonstram que o método de mutação-seleção recorrente para o melhoramento de microrganismos pode ser eficiente, conduzindo a obtenção de linhagens de alto valor industrial e/ou econômico.

### **2.3. Parassexualidade em leveduras do gênero *Candida*.**

Existe um grande grupo de microrganismos, chamados deuteromicetos ou fungos imperfeitos, nos quais o ciclo sexual não é conhecido. Incluídos neste grupo estão vários gêneros que apresentam importância médica ou industrial. A ausência de um ciclo sexual em leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, foi durante muito tempo um fator limitante para estudos de ordem genética. No entanto, após a descrição da ocorrência do

ciclo parassexual em algumas espécies do gênero, a genética destas leveduras passou a se desenvolver mais rapidamente.

O ciclo parassexual, cuja ocorrência foi descrita pela primeira vez no fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* (PONTECORVO & ROPER, 1952), permite a obtenção de recombinantes sem o envolvimento de sexualidade e meiose. Este ciclo consiste na única alternativa, para se fazer uma análise genética clássica em fungos imperfeitos. Além disso o ciclo parassexual pode ser de fundamental importância em programas de melhoramento genético de linhagens industriais, que não apresentam ciclo sexual. Os locos que controlam caracteres quantitativos estão distribuídos pelo genoma nos diferentes cromossomos. Quando selecionam-se colônias (linhagens, clones, indivíduos, progenies) estas devem ter diferentes alelos favoráveis nos locos que controlam o caráter considerado. Dessa maneira, o cruzamento entre colônias selecionadas permite que novas combinações gênicas apareçam, e, então variabilidade genética pode ser gerada para ser utilizada em novos ciclos seletivos.

Basicamente, o ciclo parassexual se caracteriza pelas seguintes etapas: a) formação de heterocários em virtude de anastomoses entre células vegetativas de linhagens geneticamente diferentes, b) fusão de núcleos formando diplóides heterozigotos, c) produção de recombinantes. A recombinação pode ocorrer por permutas mitóticas no estágio de quatro fios, sempre envolvendo dois dos quatro fios existentes. Desta maneira, os núcleos filhos são diferentes do diplóide original. Além da permuta mitótica, pode ocorrer também a haploidização. Esta haploidização resulta de uma série de não disjunções mitóticas, onde o diplóide passará por várias fases de aneuploidia e dará origem a haplóides que poderão ser geneticamente diferentes dos parentais (AZEVEDO, 1987)

Um dos primeiros passos, portanto, para a elaboração de cruzamentos parassexuais é a obtenção de mutantes auxotróficos e/ou morfológicos que possam se complementar no heterocáριο. Neste sentido, SARACHEK (1964) foi o primeiro pesquisador a descrever o isolamento e a caracterização de mutantes auxotróficos simples e múltiplos de *Candida albicans*. A partir desta data, utilizando-se diferentes agentes mutagênicos, tais como metano sulfonado de etila, ácido nitroso, nitrosoguanidina e luz ultravioleta, vários mutantes auxotróficos foram obtidos, não só de *C. albicans*, mas também de outras espécies pertencentes ao gênero *Candida* (FOURNIER *et al.*, 1977; WHELAN & MAGEE, 1981; SARACHEK *et al.*, 1981; POULTER *et al.*, 1981; POULTER *et al.*, 1982; KAKAR & MAGEE, 1982; POULTER & RIKKERINK, 1983; GIL *et al.*, 1988).

No que diz respeito a *C. albicans*, WHELAN *et al.* (1980) observaram que algumas linhagens, após tratamento mutagênico, originavam um grande número, não usual, de mutantes auxotróficos, sendo todos de um mesmo tipo. Neste trabalho, entre as 10.059 colônias provenientes da irradiação da linhagem, denominada FC 18, trinta e quatro foram auxotróficas para o aminoácido metionina e um para citosina. Em um estudo posterior, WHELAN & MAGEE (1981) submeteram 16 isolados clínicos de *C. albicans* à irradiação ultravioleta e avaliaram as colônias sobreviventes quanto à auxotrofia. Sete isolados (denominados de classe X) deram origem a mutantes auxotróficos em uma frequência que variou de 0,2 a 1,7%. Esta classe X foi subdividida em três classes: a) X.1, a qual se enquadraram os isolados que deram origem a vários mutantes auxotróficos para metionina, b) X.2, a qual se enquadraram os isolados que deram origem a vários mutantes para isoleucina e adenina, e c) X.3, onde foram enquadrados os isolados que deram origem a vários mutantes para o aminoácido lisina. Dentre os nove isolados restantes, dois produziram

mutantes auxotróficos infreqüentemente (um para triptofano dentre 2722 colônias de um isolado denominado M-N, e um para asparagina entre 2520 colônias do isolado PL) e foram designados de isolados da classe Y. Ainda, uma classe denominada Z incluiu oito isolados que não deram origem a mutantes auxotróficos quando 2500 colônias foram analisadas.

Estes dados foram de grande importância porque a partir deles pôde-se sugerir, pela primeira vez, que a levedura *C. albicans* é um diplóide natural. Os autores sugeriram que os isolados da classe X são diplóides e heterozigotos para um pequeno número de genes recessivos auxotróficos; com a ação da luz ultravioleta, os alelos mutantes e os do tipo selvagem segregam por permuta mitótica dando origem a colônias auxotróficas e prototróficas estáveis (Figura 01). Considerando-se que os isolados das classes Z e Y não diferiram daqueles da classe X quanto ao conteúdo de DNA, os autores concluíram que estes também são diplóides, porém homozigotos.

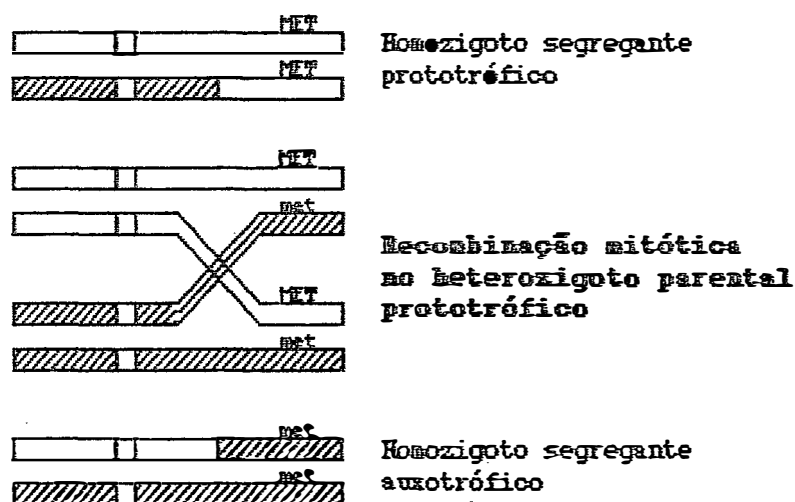


Figura 01. Recombinação mitótica em *Candida albicans* (retirada da revisão de DATTA *et al.*, 1989).

Um outro trabalho que fez uso de mutagênese e veio de encontro com a hipótese de diploidia para *C. albicans*, foi o de POULTER *et al* (1982). Através da exposição de várias linhagens auxotróficas à luz ultravioleta, os autores isolaram colônias revertentes prototróficas. Estas colônias revertentes prototróficas se comportaram como heterozigotas, uma vez que foram mitoticamente instáveis após a exposição à luz ultravioleta. A frequência de aparecimento de auxotróficos para o marcador adenina, a partir de colônias revertentes prototróficas, variou de 0,8 a 7,0 %, dependendo da linhagem em estudo. Isto sugeriu que as colônias revertentes obtidas eram diplóides heterozigotas  $ade^+/ade^-$  e que sob a ação da luz ultravioleta ocorreu permuta mitótica a qual produziu segregantes homozigotos (prototróficos e auxotróficos). É conveniente salientar que, apesar destas evidências, a literatura tem se mostrado controversa com relação ao nível de ploidia de *C. albicans* (OLAIYA & SOGIN, 1979; OLAIYA *et al*. 1980; POULTER *et al*., 1981; SARACHEK *et al*., 1981; SARACHEK & WEBER, 1984). Entretanto, o recente trabalho de revisão elaborado por DATTA *et al* (1989) conclui que a maioria dos isolados naturais de *C. albicans* são, de fato, diplóides, embora ocorram algumas linhagens atípicas haplóides.

Em muitos fungos, células heterocarióticas podem ser normalmente produzidas por cruzamentos de linhagens nutricionalmente compatíveis em um meio seletivo de cruzamento. Entretanto, para algumas espécies isto não é possível e a obtenção de heterocários somente é conseguida através do uso da técnica de fusão de protoplastos. Esta tecnologia, em síntese, permite que se formem heterocários entre células que normalmente não sofrem anastomose. Basicamente, a técnica consiste em se remover a parede celular das linhagens a serem cruzadas, pelo emprego de enzimas que degradam a parede celular. Na presença de um estabilizador osmótico, as células sem parede podem



sobreviver em forma de protoplastos. Estes protoplastos podem ser induzidos à fusão química com o uso de agentes fusogênicos, tais como o polietileno glicol ou física, por ação de pulsos de corrente elétrica em voltagens apropriadas.

Em termos genéticos, os resultados obtidos por fusão de protoplastos são os mesmos daqueles obtidos por cruzamentos convencionais. No caso de leveduras do gênero *Candida*, a fusão de protoplastos tem permitido a formação de heterocários, a qual não é possível quando se utiliza de células intactas. Até o momento, fusões intraespecíficas foram descritas para *C. albicans* (SARACHEK *et al.*, 1981; POULTER *et al.*, 1981; KAKAR & MAGEE, 1982; PESTI & FERENCZY, 1982; SARACHEK & WEBER, 1984; GIL *et al.*, 1988) e *C. tropicalis* (FOURNIER *et al.*, 1977; VALLIN & FERENCZY, 1978). Além disso, fusões interespecíficas e intergenéricas foram descritas entre *C. tropicalis* x *C. albicans* (Kucsera & Ferenczy<sup>1</sup>, citado por HORITSU *et al.*, 1989), *C. lipolytica* x *C. utilis* (HORITSU *et al.*, 1989), *C. tropicalis* x *Pichia guilliermondii* (VALLIN *et al.*<sup>2</sup>, citado por HORITSU *et al.*, 1989) e entre *C. tropicalis* x *Saccharomycopsis fibuligera* (PROVOST *et al.*, 1978).

Em *C. tropicalis*, protoplastos obtidos por tratamento enzimático com helicase foram induzidos à fusão através do uso de polietileno glicol. A frequência de fusão obtida foi de  $3 \times 10^{-5}$ , que é considerada baixa quando comparada com a de outros fungos. Os heterocários formados pelas duas linhagens auxotróficas *cyt<sup>-</sup> ade<sup>-</sup>* e *met<sup>-</sup> his<sup>-</sup>* foram selecionados por

---

<sup>1</sup> J. KUCSERA & L. FERENCZY, Abstracts of Papers, the 5 th Int. Protoplast Symp., Hungary, 1979, p. 52.

<sup>2</sup> C. VALLIN, J. KUCSERA, U. KLINNER and L. FERENCZY, Abstracts of Papers, the Int. Protoplast Symp., Hungary, 1979, p. 59.

complementação em meio mínimo de cultura. Assim que apareceram as colônias prototróficas nas placas contendo meio mínimo de seleção, elas foram transferidas novamente para meio mínimo e pôde-se observar que 30% delas não mais cresceram. Este fato indicou que os núcleos parentais auxotróficos segregaram, ou seja mostrou a instabilidade do heterocáριο. Entretanto, em alguns casos os núcleos parentais no heterocáριο se fundiram dando origem a homocários, que são pelo menos diplóides. Um dos homocários obtidos, foi induzido à haploidização utilizando-se a parafluorfenilalanina (pFA), na concentração de 5 g/l de meio completo líquido. Após 2 dias, as células foram semeadas em meio completo sólido e posteriormente 711 colônias resultantes foram analisadas quanto à auxotrofia. Várias colônias permaneceram prototróficas, porém foi igualmente possível a obtenção de colônias com as seguintes marcas auxotróficas: met<sup>-</sup> his<sup>-</sup> (0,28%); cyt<sup>-</sup> ade<sup>-</sup> (0,28%); his<sup>-</sup> (0,56%); cyt<sup>-</sup> (0,28%); ade<sup>-</sup> (0,16%). O fato de que aparecem recombinantes auxotróficos, é uma prova de que os processos de fusão nuclear e segregação somática ocorrem nesta espécie (FOURNIER *et al.*, 1977).

Com relação a *Candida albicans*, POULTER *et al.* (1981), utilizando a enzima zimoliase, isolaram protoplastos de uma linhagem com dupla auxotrofia, obtida através de tratamento mutagênico com NTG. Os protoplastos das linhagens auxotróficas designadas hOG 2 (ade<sup>-</sup> pro<sup>-</sup>) e hOG 7 (ura<sup>-</sup> lys<sup>-</sup>) foram induzidos à fusão com o polietileno glicol. Os prototróficos derivados, foram selecionados por complementação em meio mínimo. Os produtos de fusão se apresentaram de 2 tipos: algumas colônias no meio de regeneração cresciam rapidamente e outras cresciam lentamente, numa proporção de 1 para 100. Quando amostras de células provenientes de uma das colônias que crescia lentamente, foram semeadas em placas contendo meio mínimo e em meio completo, pode-se observar que o número de colônias que cresceu em

meio completo foi aproximadamente 100 vezes maior do que o obtido em meio mínimo. A análise de auxotrofia das células crescidas em meio completo revelou que as colônias apresentavam a marca dos parentais, ou seja, eram  $ade^- pro^-$  ou  $ura^- lys^-$ . Por outro lado, quando as células provenientes de uma das colônias que crescia rapidamente, foram semeadas em placas contendo meio mínimo e meio completo, pode-se observar um número similar de colônias nos dois tipos de meio, indicando que se tratavam de células prototróficas estáveis. Esta observação permitiu aos autores inferir que as colônias de crescimento lento eram heterocários instáveis que dissociavam os núcleos parentais, enquanto as colônias de crescimento rápido eram resultantes de fusão nuclear. Estes prototróficos tiveram o volume celular duas vezes maior que as linhagens parentais. Este produto de fusão estável foi submetido a um tratamento com anfotericina B, o qual facilita a seleção de células auxotróficas uma vez que tende a eliminar as células em divisão, ou seja as prototróficas. Após este tratamento 1000 colônias foram avaliadas quanto a auxotrofia sendo que 3 auxotróficas simples foram encontradas. Considerando que o volume celular destes recombinantes auxotróficos permaneceram 2 vezes maior que o das linhagens parentais, os autores sugeriram que estes recombinantes auxotróficos originaram-se por permutas mitóticas. Embora nenhuma tentativa tenha sido feita no sentido de se obter recombinantes haplóides através do uso de agentes haploidizantes, este foi um dos primeiros trabalhos a descrever o ciclo parassexual em *C. albicans*.

Resultados bastante similares aos citados acima, foram igualmente encontrados por SARACHEK *et al.* (1981) realizando vários cruzamentos entre linhagens auxotróficas de *C. albicans* via fusão de protoplastos. Além de terem obtido heterocários, diplóides e recombinantes por permuta mitótica, estes autores fizeram tentativas visando obter haplóides a partir de um dos

diploides produzidos. Para isso, uma população de células obtida após 8 a 10 gerações de crescimento em meio completo contendo 5 mg/ml de pFA ou 10 µg/ml de benomil foi avaliada quanto à auxotrofia. Entre 5.000 colônias avaliadas para cada um dos dois tratamentos, nenhum recombinante auxotrófico foi encontrado. Estes resultados indicaram que estes agentes haploidizantes, não foram capazes de induzir perdas cromossômicas em *C. albicans* e comprovam a estabilidade da condição dissômica do produto de fusão durante o crescimento vegetativo. Neste particular, mais recentemente, uma eficiente metodologia capaz de induzir instabilidade mitótica por perdas cromossômicas em *C. albicans* foi descrita por HILTON *et al.* (1985). Esta metodologia consiste em expor células tetraploides de leveduras que se encontram em fase log de crescimento a um breve choque térmico (60 segundos) de 50°C. Várias colônias produzidas após este tratamento mostraram um conteúdo de DNA que indicava o estado diploide. As perdas cromossômicas resultaram na expressão de alelos auxotróficos em estado heterozigoto no tetraploide original.

Segundo os trabalhos de revisão de SHEPHERD *et al.* (1985) e DATTA *et al.* (1989), a utilização do ciclo parassexual em *C. albicans* permitiu detectar 5 grupos de ligação. O cromossomo 1 tem em seu braço esquerdo o caráter **ino** (inositol) e no braço direito **met** (metionina), **ura** (uracila), **arg<sub>1</sub>** (arginina) e **ade<sub>1</sub>** (adenina). O cromossomo 2 tem **pro** (prolina) no braço esquerdo e **lys** (lisina) no braço direito. O cromossomo 3 carrega no mesmo braço **met<sub>2</sub>** e **ade<sub>2</sub>**. No cromossomo 4 estão **asn** (asparagina) no braço esquerdo e **suf** (sulfito redutase) no braço direito. O cromossomo 5 carrega o gene **his** (histidina).

Como pode ser observado neste tópico da revisão, os estudos relativos ao processo parassexual em leveduras do gênero *Candida* são

restritos na literatura. Somente as espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* tiveram seu ciclo parassexual descrito, o que significa a necessidade de se investigar este fenômeno em outras espécies do gênero.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material biológico

O material biológico utilizado neste trabalho foi a levedura *Candida* sp, fornecida pela Seção de Fermentações Industriais do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas-SP. Esta levedura foi classificada como pertencente ao gênero *Candida*. Entretanto, ela não se enquadra em nenhuma das espécies descritas por Lodder, (1971) ou Davenport (1974). As duas espécies que mais se aproximaram da levedura estudada neste trabalho, foram a *C. muscorum* e a *C. scottii*, das quais ela foi diferente com relação a quatro testes de assimilação de carboidrato (MENEZES & MENEZES, 1974).

A título de ilustração, a figura 02 mostra as características celulares da *Candida* sp quando cultivada em meio BDA líquido e observada ao microscópio ótico a fresco.

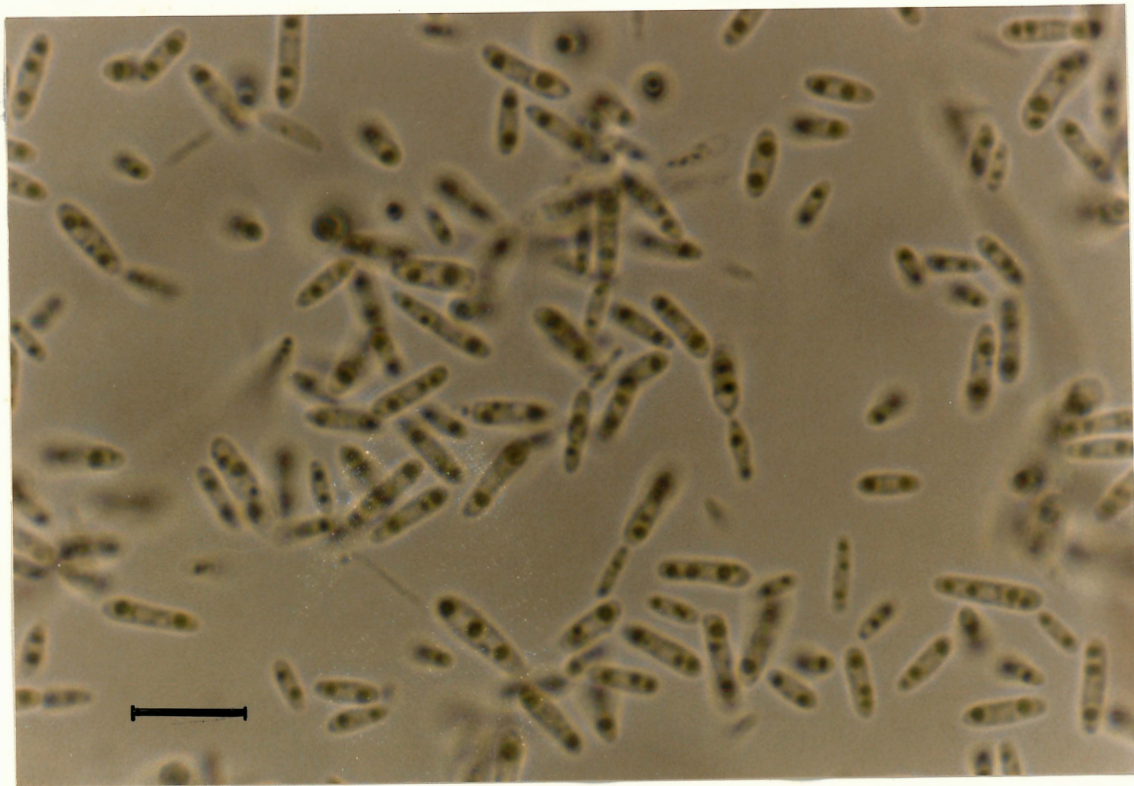


Figura 02. Características celulares da *Candida* sp, quando cultivada em meio BDA líquido. A barra corresponde a 10 micrômetros.

### 3.2. Meios de cultura e soluções

#### 3.2.1. Meio completo, YEPD (MORTIMER & HAWTHORNE, 1969)

Extrato de leveduras	10g
Peptona	20g

Glicose	20g
Água destilada	1000ml

O valor do pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 10% ou HCl 1N. Para o preparo do meio sólido, 15g de ágar foram adicionados.

### 3.2.2. Meio Batata-Glicose-Agar, BDA

Caldo de batata	1000ml
Glicose	20g

Para a obtenção do caldo, 200g de batata foram cozidas por 15 minutos em 1000ml de água. Para o preparo do meio sólido, 15g de ágar foram adicionados.

Eventualmente, soluções de vitaminas, ácidos nucleicos e caseína hidrolisada foram adicionadas (0,5%) a este meio, que desta forma é denominado BDA suplementado.

### 3.2.3. Meio mínimo (REAUME & TATUM, 1949; modificado)

Glicose	20,00g
Asparagina	2,00g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,50g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,50g
Ca Cl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,30g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,00g
KI	100,00mg
Pantotenato de cálcio	1,00mg
Inositol	1,00mg
MnSO <sub>4</sub>	0,02mg
ZnSO <sub>4</sub>	2,00mg
CuSO <sub>4</sub>	0,10mg
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O	0,01mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,02mg



FeSO <sub>4</sub>	0,20mg
Água destilada	1000,00ml

O valor do pH foi ajustado para 5,6 com NaOH 10% ou HCl 1N. Para o preparo do meio sólido, 15g de ágar foram adicionados.

#### 3.2.4. Meio de fubá de milho (MENEZES & MENEZES, 1977)

Este meio foi preparado pela hidrólise ácida de uma mistura de fubá a 50g/l de água, colocando-se 6ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% e HCl 17,5% até o pH atingir 1,5. Em seguida, o meio foi autoclavado a 120°C durante 45 minutos. Após resfriar, foram adicionadas lentamente 10g de CaCO<sub>3</sub> por litro de meio e o valor do pH foi ajustado para 4,5 com NaOH 10%.

#### 3.2.5. Meio YEPD para regeneração de protoplastos

Este meio foi preparado segundo está descrito no item 3.2.1., exceto que a água destilada foi substituída por tampão fosfato 0,2M, pH 5,8 e a estabilidade osmótica do meio foi obtida pela adição de 0,8, 1,0 ou 1,2M de sorbitol.

#### 3.2.6. Meio mínimo para regeneração dos produtos de fusão

Este meio foi preparado segundo está descrito no item 3.2.3., exceto que a água destilada foi substituída por tampão fosfato 0,2M em pH 5,8 e a estabilidade osmótica do meio foi obtida pela adição de 1,2M de sorbitol.

#### 3.2.7. Meio para induzir a haploidização

Caldo de batata	30ml
Glicose	4g
Tampão fosfato 0,2M, pH5,8	170ml

Para a obtenção do caldo, 40g de batata foram cozidas em 30ml de água por 15 minutos. Foram distribuídos 10 ml deste meio em erlenmeyers, procedendo-se a autoclavagem a 1 atm por 20 minutos. Adicionou-se 0,05ml de solução esterilizada de pFA e 0,1ml das soluções estéreis de aminoácidos, de vitaminas e de ácidos nucleicos.

### 3.2.8. Solução de vitaminas

Acido nicotínico	100,0mg
Acido p-aminobenzóico	10,0mg
Biotina	0,2mg
Piridoxina	50,0mg
Riboflavina	100,0mg
Tiamina	50,0mg

A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 20 minutos e mantida em frasco escuro, no refrigerador.

### 3.2.9. Solução de ácidos nucleicos de leveduras

Solução A: 2g de ácidos nucleicos de leveduras diluídas em 15ml de HCl 1N.

Solução B: 2g de ácidos nucleicos de leveduras diluídas em 15ml de NaOH 1N.

Ambas as soluções foram aquecidas em banho-maria a 98°C por 20 minutos. À seguir, as soluções foram misturadas em igual proporção e o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 4%. O volume foi completado para 40ml com água destilada. A solução final, foi esterilizada em banho-maria a 98°C por 20 minutos e mantida em frasco escuro, no refrigerador.

## 3.2.10. Solução de caseína hidrolisada

Caseína hidrolisada	100mg
Água destilada estéril	10ml

A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 20 minutos e conservada em refrigerador.

## 3.2.11. Soluções de requisitos nutricionais

Estes suplementos, foram preparados diluindo-se cada um deles em frascos contendo 10ml de água destilada estéril, nas quantidades discriminadas no Quadro 1. Posteriormente, estas soluções foram aquecidas em banho-maria a 98°C por 20 minutos e conservadas em refrigerador.

Quadro 1. Requisitos nutricionais e respectivas quantidades diluídas em 10ml de água.

---

Prolina, arginina, lisina, triptofano, metionina, histidina, isoleucina, glutamina, homoserina, treonina, cisteína, fenilalanina, tirosina, alanina e valina	100,0mg
Adenina, uracila, guanina, citosina e timina	50,0mg
Tiamina, riboflavina, ácido nicotínico	1,0mg
Ácido p-aminobenzoico, piridoxina	0,5mg
Biotina	0,2mg

---

## 3.2.12. Solução salina (0,85%, p/v)

NaCl	0,85g
Água destilada	100ml

### 3.2.13. Solução de Giemsa

A solução de Giemsa foi preparada, dissolvendo-se 1g de Giemsa (Merck) em 66 partes de glicerina a 60°C. Após o resfriamento, foram acrescentados 66ml de metanol e a solução final foi filtrada e conservada em frasco escuro.

### 3.2.14. Solução tampão fosfato 0,02M, pH 6,9

Solução A: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	3,12g
Agua destilada	1000ml
Solução B: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	3,56g
Agua destilada	1000ml

As soluções A e B foram conservadas no refrigerador, sendo que o tampão foi preparado fresco, misturando-se as duas soluções de tal maneira a obter-se pH 6,9.

### 3.2.15. Solução tampão fosfato 0,2M, pH 5,8

Este tampão foi preparado de modo idêntico ao descrito no item 3.2.14, porém com concentrações de sais de 31,2 e 35,6g/l, respectivamente.

### 3.2.16. Solução tampão fosfato sorbitol (TSP)

Para a obtenção desta solução o sorbitol 0,8, 1,0 ou 1,2M, foi diluído em tampão fosfato 0,2M, pH 5,8.

### 3.2.17. Solução fusogênica (PEG 40%)

Polietileno glicol 6000	2,0g
CaCl <sub>2</sub>	5,5mg
Tampão fosfato-sorbitol 1,2M	5,0ml

## 3.2.18. Solução de leite para determinação da atividade coagulante

Leite em pó (Molico)	100,00g
CaCl <sub>2</sub>	1,47g
Água destilada	1000ml

## 3.2.19. Solução de caseína

Para o preparo desta solução, 1g de caseína não hidrolisada (Difco), foi adicionada lentamente e sob agitação em 50ml de NaOH 0,05M. Após a dissolução, o pH foi ajustado para 6,0 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05N e o volume completado para 100ml com água destilada.

## 3.2.20. Solução de nistatina

Nistatina	20mg
Alcool 70%	10ml

A solução foi preparada no momento do uso.

## 3.2.21. Solução enzimática para obtenção de protoplastos

Novozym 234 (lote ppm 1961)	200mg
Água destilada esterilizada	2ml

A solução foi mantida em frasco escuro no congelador.

3.2.22. Solução de *p*-Fluor-DL-fenil-alanina (pFA)

pFA	10,0mg
HCl 1N	0,6ml
Água destilada	0,4ml

A solução foi filtro-esterilizada (millipore, 0,2µm)

### **3.3. Curva de sobrevivência à luz ultravioleta**

Foi feita uma suspensão celular em solução salina, contendo aproximadamente  $10^6$  células por ml. Um volume de 10 ml dessa suspensão, foi colocado em uma placa de Petri estéril, à distância de 14cm de uma fonte de luz ultravioleta (Mineralight 115 volts, Ultra-Violet Prod. Inc., San Gabriel, Califórnia, EUA). Antes do início da irradiação, uma alíquota de 1,0 ml da suspensão celular, foi retirada para servir como controle. A placa foi exposta durante 30, 60, 120, 180 e 240 segundos à luz ultravioleta. Uma alíquota de 1,0 ml foi retirada da placa após cada período de irradiação. Estas alíquotas, assim como o controle, foram diluídas em solução salina e 0,1 ml de cada diluição foi semeado em placas contendo meio BDA. Estas placas foram incubadas por 48 horas. Após este período procedeu-se a contagem das colônias. A percentagem de sobrevivência, foi estimada em relação ao número de colônias obtidas no tratamento controle, tomado como 100% de sobrevivência.

### **3.4. Curva de sobrevivência ao metano sulfonado de etila (EMS)**

Foi preparada uma suspensão de células em 3ml de solução salina, contendo aproximadamente  $10^6$  células por ml. Posteriormente, a suspensão foi dividida em duas partes: uma de 2 ml e outra de 1 ml. Após serem adicionados 4 ml de uma solução de EMS (2%) na porção de 2ml, esta foi incubada a 30°C . Após 1, 3, 4 e 5 minutos de tratamento, alíquotas de 1 ml foram retiradas e diluídas em solução salina. Com a outra porção da suspensão celular, foi preparada uma solução controle, adicionando-se 2 ml de água esterilizada ao invés de EMS. Posteriormente, as suspensões tratadas e a suspensão controle, foram diluídas em solução salina e 0,1 ml de cada diluição

foi semeado em placas contendo meio BDA. Estas placas foram incubadas a 30°C por 48 horas e após este período as colônias foram contadas. A percentagem de sobrevivência, foi estimada em relação ao número de colônias obtidas no tratamento controle, tomado como 100% de sobrevivência.

### **3.5. Curva de crescimento em meio YEPD**

A determinação da curva de crescimento em meio YEPD, foi feita através do método de contagem de células viáveis, proposto por AZEVEDO & NEDER (1963). As células, provenientes de uma cultura em meio YEPD sólido, com 48 horas de crescimento, foram inoculadas em frascos contendo 50 ml de meio YEPD, sendo  $9,8 \times 10^4$  células por ml de meio. Estes frascos, por sua vez, foram incubados a 30°C a 150 rpm. Amostras de 0,1 ml foram retiradas a cada intervalo de 5 horas, durante 50 horas de crescimento, sendo em seguida diluídas em solução salina e semeadas em placas de Petri, contendo meio YEPD. Estas placas foram incubadas a 30°C, durante 2 dias, quando procedeu-se a contagem das colônias.

### **3.6. Obtenção de mutantes auxotróficos**

#### **3.6.1. Sem enriquecimento**

Uma suspensão de células, contendo cerca de  $10^6$  células por ml de uma solução salina, foi submetida ao tratamento mutagênico com a luz ultravioleta ou com o metano sulfonado de etila, na dose que permite aproximadamente 5% de sobrevivência. Após a realização dos tratamentos mutagênicos, 0,1 ml de diluições apropriadas foram semeadas em placas contendo meio BDA suplementado. Estas placas foram incubadas a 30°C por 48 horas, quando procedeu-se a transferência das colônias obtidas, com auxílio de palitos esterilizados, para placas de 26 pontos contendo meio mínimo. Estas

placas foram incubadas por 48 horas e em seguida, os blocos de ágar dos pontos em que não observou-se crescimento, foram transferidos novamente para placas contendo meio BDA suplementado. As colônias incapazes de crescer em meio mínimo foram posteriormente caracterizadas quanto a auxotrofia.

### 3.6.2. Uso de nistatina como agente seletivo

A técnica de isolamento de mutantes auxotróficos, usando-se a luz ultravioleta como mutagênico e a nistatina como agente selecionador, consistiu-se em fazer uma suspensão de  $10^7$  células por ml de solução salina, a partir de uma cultura de *Candida* sp crescida em BDA por 24 horas. A suspensão foi colocada em placa esterilizada e irradiada com luz ultravioleta por um tempo que permite 5% de sobrevivência. Em seguida, 1 ml da suspensão irradiada foi inoculado em frascos contendo 20 ml de BDA líquido suplementado e estes foram incubados a 30°C a 150 rpm. Depois de 18 horas, a cultura foi centrifugada, lavada por duas vezes e ressuspensa em solução salina. Um ml desta suspensão foi, inoculado em frascos contendo 9 ml de MM líquido, sem fonte de nitrogênio, os quais foram incubados a 30°C por 5 horas. Após este período, 0,1 ml de solução de nistatina foi adicionado à cultura, que permaneceu incubada por mais 60 minutos. Por fim, 0,1 ml de diluições apropriadas desta cultura foi semeado em placas contendo BDA suplementado. Estas placas foram incubadas a 30°C por 48 horas, quando então foram feitas as réplicas para MM, a fim de confirmar a obtenção de mutantes auxotróficos.

### 3.7. Caracterização dos mutantes auxotróficos

Os mutantes auxotróficos obtidos foram caracterizados segundo a técnica de auxonografia (PONTECORVO *et al*, 1953). Esta técnica, consiste em preparar placas contendo MM e semeá-las com 0,1 ml de uma suspensão de



células mutantes auxotróficas. Posteriormente, cerca de 0,1 ml das soluções de caseína hidrolizada, ácidos nucleicos de leveduras e de vitaminas, são dispostos em locais diferentes nas placas. O crescimento visível, ao redor de qualquer uma dessas soluções, indica a deficiência da linhagem mutante. Para a caracterização final das células mutantes, o procedimento é idêntico, exceto que utiliza-se cada um dos aminoácidos, ácidos nucleicos ou vitaminas separadamente.

### **3.8. Teste de reversão**

Para se avaliar a frequência de reversão das marcas auxotróficas, foram feitas suspensões celulares dos mutantes auxotróficos, de modo a obter-se aproximadamente  $10^6$  células por ml de solução salina. Estas suspensões foram semeadas em placas contendo MM, enquanto diluições apropriadas foram semeadas em placas contendo BDA suplementado. Estas placas foram incubadas a  $30^\circ\text{C}$  por 5 ou 6 dias, quando procedeu-se a contagem das colônias. A frequência de reversão foi calculada através da seguinte relação: nº médio de colônias em MM/ nº médio de colônias em BDA suplementado.

### **3.9. Obtenção e regeneração de protoplastos**

A fim de se determinar a melhor condição para a obtenção e regeneração de protoplastos, três tratamentos diferentes foram testados. Estes tratamentos diferiram quanto a molaridade do tampão fosfato sorbitol, que variou de 0,8 a 1,2 M. Um ml de uma suspensão celular, contendo cerca de  $1,0 \times 10^5$  células por ml, foi inoculado em erlenmeyers contendo 30 ml de meio YEPD. Estes erlenmeyers foram incubados em agitador orbital a 150 rpm durante 20 horas a  $30^\circ\text{C}$ . Após este período, as células foram coletadas por centrifugação a 2500 rpm e lavadas por duas vezes em solução tampão

fosfato. O precipitado resultante da segunda lavagem foi ressuspensão em 2 ml de TSP e a esta suspensão foram acrescentados 0,2 ml de solução enzimática. Esta mistura foi incubada por uma hora a 37°C com branda agitação. Os protoplastos obtidos foram coletados por centrifugação durante 12 minutos, a 1500 rpm, e lavados por três vezes em tampão TSP. Na última lavagem, o precipitado foi ressuspensão em 4 ml do TSP e o número de protoplastos foi estimado em câmara de Neubauer. A percentagem de conversão de células em protoplastos, foi estimada através da relação entre o número de células e o número de protoplastos existentes em três campos da câmara de Neubauer. Para estimar a percentagem de regeneração dos protoplastos, um ml de diluições apropriadas foram semeados pela técnica "pour plate" nos seguintes meios de cultura: YEPD; YEPD-sorbitol 0,8 M; YEPD-sorbitol 1,0 M e YEPD-sorbitol 1,2 M. As placas foram incubadas a 30°C e após 5 dias as colônias foram contadas. A percentagem de regeneração foi estimada através da seguinte relação: nº de colônias obtido a partir de protoplastos/ nº de protoplastos semeados, x 100.

### **3.10. Fusão de protoplastos**

Protoplastos derivados de linhagens com dupla auxotrofia, foram obtidos seguindo-se a metodologia descrita no item 3.9., utilizando-se o tampão fosfato-sorbitol 1,2M. As soluções de TSP (4ml), contendo os protoplastos, foram adicionados 1 ml de solução de CaCl<sub>2</sub> 1,2 M. Posteriormente, os protoplastos das linhagens auxotróficas foram misturados em igual quantidade e centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e 1 ml da solução de PEG 40% foi adicionado. Após a incubação a 30°C por 30 minutos, a mistura foi centrifugada e lavada 3 vezes em TSP. Por fim, 1 ml de diluições apropriadas foram semeados pela

técnica "pour plate" em MM-sorbitol 1,2 M e em YEPD-sorbitol 1,2 M. Após 8 dias de incubação a 30°C, as colônias presentes nos dois meios foram contadas e a frequência de fusão citoplasmática foi estimada através da seguinte relação: nº de colônias desenvolvidas em MM-sorbitol 1,2 M / nº de colônias desenvolvidas em YEPD-sorbitol 1,2 M.

### **3.11. Procedimentos utilizados para a seleção de produtos de fusão nuclear**

Após 8 dias de crescimento em meio seletivo de regeneração, os produtos de fusão foram transferidos para placas contendo MM sem estabilizador osmótico. Estas placas foram incubadas a 30°C por 4 dias e, após este período, foi feita a contagem das colônias capazes de crescer neste meio de cultura. As células provenientes de uma das colônias em crescimento em meio MM (PF 1) foram diluídas em solução salina e semeadas em placas contendo BDA e MM. Após a incubação destas placas a 30°C por 3 dias, procedeu-se a contagem das colônias existentes nos dois tipos de meio. A similaridade entre o número de colônias existentes nos meios mínimo e BDA suplementado, foi um dos critérios utilizados para sugerir a ocorrência de fusão nuclear. Posteriormente, foi feita a coloração de núcleos das células da referida colônia (PF 1), conforme descrito no item 3.12. A comparação entre os diâmetros celular e nuclear das células do produto de fusão com os diâmetros das células parentais, foi mais um critério utilizado para a escolha do produto de fusão nuclear.

### **3.12. Coloração de núcleos**

Após crescimento das linhagens mutantes parentais e do produto de fusão (PF 1) em MM líquido a 30°C, por 40 horas, a 150 rpm, seus núcleos

foram corados, seguindo-se o seguinte procedimento: as culturas foram centrifugadas, lavadas em solução salina e posteriormente pequenas alíquotas foram gotejadas em lâminas e secadas à temperatura ambiente, por 15 minutos. As fixações foram feitas em metanol absoluto por 15 minutos. Para a hidrólise do material, as lâminas foram embebidas em HCl 1 N a frio por 8 minutos e em seguida em HCl 1N a 60°C por 5 minutos. Após este tratamento, as lâminas foram lavadas em água destilada. As colorações foram feitas, colocando-se uma película de tampão fosfato (0,02 M, pH 6,9) sobre as lâminas e gotejando-se a solução de Giemsa 1%. Depois de 4 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente e montadas com laminulas para a observação ao microscópio óptico. Os diâmetros nucleares foram medidos com o auxílio de ocular micrométrica.

### **3.13. Obtenção de genótipos recombinantes**

Dois procedimentos foram utilizados para a obtenção de genótipos recombinantes a partir de um produto de fusão nuclear (PF 1):

#### **3.13.1. Tratamento sem agente haploidizante**

Um ml de uma suspensão celular com  $1 \times 10^6$  células/ml do produto de fusão nuclear foi inoculado em erlenmeyer contendo BDA líquido suplementado. A cultura foi incubada a 30°C por 48 horas a 150 rpm. Em seguida, 0,1 ml desta cultura foi novamente transferido para um erlenmeyer contendo BDA líquido suplementado, o qual foi incubado nas mesmas condições citadas acima. Este procedimento foi repetido duas vezes. Posteriormente, 0,1 ml de diluições apropriadas foi semeado em placas contendo meio BDA suplementado e estas placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Após este período, as colônias obtidas foram transferidas para

placas de 26 pontos contendo MM, as quais foram incubadas a 30°C por 72 horas. As colônias incapazes de crescer em MM, foram posteriormente caracterizadas quanto a auxotrofia.

### 3.13.2. Tratamento com o agente haploidizante pFA.

Um ml de uma suspensão celular do produto de fusão com  $1 \times 10^6$  células/ml foi inoculado em erlenmeyer contendo 10 ml de meio de haploidização. A cultura foi incubada a 30°C por 48 horas a 150 rpm. Após este período, 0,1 ml de diluições apropriadas foi semeado em placas contendo meio BDA suplementado, e estas placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. As colônias obtidas foram transferidas para placas contendo MM e após incubação a 30°C por 72 horas, as colônias incapazes de crescer neste meio foram caracterizadas quanto a auxotrofia.

### 3.14. Avaliação da atividade coagulante (AC)

Para a avaliação da atividade coagulante, cerca de  $1 \times 10^5$  células foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de fubá de milho. Estes tubos foram incubados a 30°C por 68 horas a 180 rpm. Após este período, o caldo de cultura foi centrifugado a 2500 rpm e a atividade coagulante do sobrenadante foi determinada. O método utilizado foi aquele descrito por STERNBERG (1971), que baseia-se em medir o tempo necessário para haver início da formação de pequenos pontos de leite coagulado. Para isso, tubos de ensaio contendo 5 ml da solução de leite foram incubados em banho-maria a 37°C com 0,5 ml da amostra, e o tempo exato, em minutos, do aparecimento dos primeiros flóculos de leite coagulado foi observado (veja figura 03). A atividade coagulante foi tomada como:

$$AC = \frac{400}{t} \text{ unidades/ml}$$

### 3.15. Avaliação da atividade proteolítica (AP)

A atividade proteolítica foi avaliada inoculando-se os blastósporos de *Candida* sp em placas contendo 16 ml de MM, misturados com 4 ml de solução de caseína 1%. As placas foram incubadas a 30°C por 96 horas e após este período, foram adicionados 5 ml de uma solução reveladora de halos de degradação enzimática, sulfato de amônio saturado. Após 2 horas os diâmetros das colônias e dos respectivos halos de degradação da caseína foram tomados. O índice enzimático foi estimado pela seguinte relação: (diâmetro da colônia + diâmetro do halo)/ diâmetro da colônia.

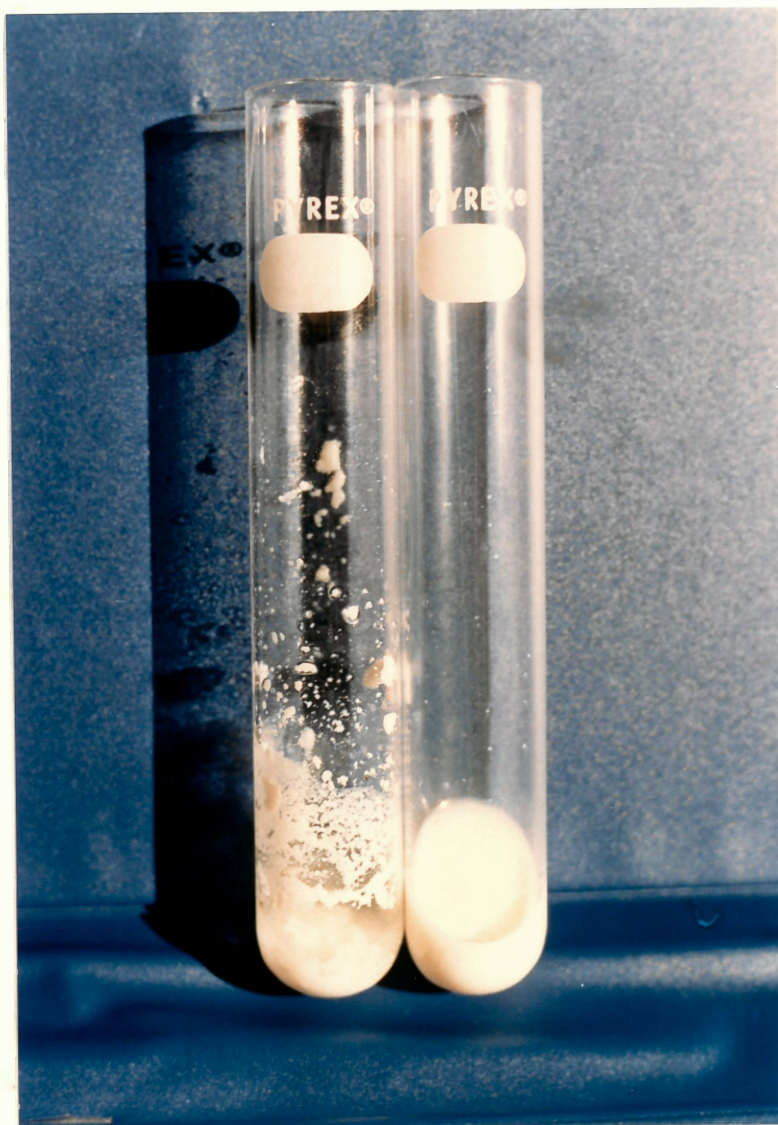


Figura 03. Coagulação do leite pela ação do Renital

### 3.16. Metodologias utilizadas para o melhoramento genético e estimativas de parâmetros genéticos

O método de mutação-seleção recorrente, foi utilizado com o objetivo de melhorar a linhagem de *Candida* sp para a produção de coalho microbiano. Foram conduzidos três ciclos de mutação-seleção visando aumentar a atividade coagulante e diminuir a atividade proteolítica. Inicialmente, uma população de 30 colônias obtidas por semeadura em placas contendo BDA, foi avaliada para os caracteres AC e AP, conforme as metodologias descritas nos itens 3.14. e 3.15., respectivamente, para investigar existência de variabilidade genética nesta população. O caráter AC foi avaliado através de experimentos delineados em blocos casualizados (Quadro 02), com três repetições, enquanto para o caráter AP utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (Quadro 03), com três repetições. Baseando-se nos resultados destas análises de variância, uma suspensão de células de uma das colônias, escolhida ao acaso foi submetida ao tratamento com luz ultravioleta na dose que permite 5% de sobrevivência. Uma amostra de 179 colônias sobreviventes ao tratamento mutagênico, foi avaliada para os caracteres AC e AP. Para estas avaliações utilizou-se experimentos delineados em blocos casualizados, com três repetições. Entretanto, devido a limitações práticas que não permitiam avaliar todos os tratamentos de uma única vez, procedeu-se a análise das colônias em vários experimentos. A amostra de *Candida* sp, fornecida pelo ITAL foi utilizada como controle em todos os experimentos e os dados foram tomados em relação a esta linhagem controle, a qual teve sua AC considerada como sendo 100%. Nestes experimentos, como já citado anteriormente, utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, com três repetições sendo posteriormente realizada uma análise de variância agrupada (Quadro 4). A colônia que apresentou alta atividade coagulante e uma



atividade proteolítica igual ou abaixo da média da população foi selecionada, completando assim o primeiro ciclo de mutação-seleção.

Quadro 02. Esquema da análise de variância segundo o delineamento em blocos casualizados, com as respectivas esperanças dos quadrados médios  $E(Q.M.)$ , e teste F.

F.V.	G.L.	Q.M.	$E(Q.M.)$	F
Blocos	$(r-1)$	$\bar{}$	$\bar{}$	$\bar{}$
Colônias	$(c-1)$	$Q_1$	$\sigma^2 + r\sigma_c^2$	$Q_c/Q_e$
Resíduo	$(r-1)(c-1)$	$Q_2$	$\sigma^2$	

Quadro 03. Esquema da análise de variância segundo o delineamento inteiramente casualizado, com as respectivas esperanças dos quadrados médios  $E(Q.M.)$ , e teste F.

F.V.	G.L.	Q.M.	$E(Q.M.)$	F
Colônias	$c-1$	$Q_1$	$\sigma^2 + r\sigma_c^2$	$Q_c/Q_e$
Resíduo	$c(r-1)$	$Q_2$	$\sigma^2$	

Quadro 04. Esquema da análise de variância agrupada segundo o delineamento em blocos casualizados, com as respectivas esperanças dos quadrados médios E(Q.M.), e teste F.

F.V.	G.L.	Q.M.	E(Q.M.)	F
Blocos	$\Sigma(r-1)$ =n <sub>1</sub>	$\Sigma S.Q. b / n_1$		
Colônias	$\Sigma(c-1)$ =n <sub>2</sub>	$\Sigma S.Q. c / n_2$ =Q <sub>1</sub>	$\sigma^2 + r\sigma_c^2$	Q <sub>c</sub> /Q <sub>e</sub>
Resíduo	$\Sigma(r-1)(c-1)$ =n <sub>3</sub>	$\Sigma S.Q. r / n_3$ =Q <sub>2</sub>	$\sigma^2$	

onde:  $\sigma^2$  é a variância do erro experimental,

$\sigma_c^2$  é a variância genética entre colônias,

r é o número de repetições e

c é o número de colônias.

Nas análises de variâncias agrupadas, as somas de quadrados e os graus de liberdade de cada experimento são somados, gerando as somas de quadrados e graus de liberdade para cada fonte de variação.

Através da manipulação algébrica das esperanças dos quadrados médios, foram obtidas as estimativas dos parâmetros genéticos e fenotípicos da seguinte maneira (VENCOVSKY, 1987):

Variância do erro experimental:  $\hat{\sigma}_e^2 = Q_e$

Variância genética entre colônias:  $\hat{\sigma}_c^2 = (Q_c - Q_e) / r$

Variância fenotípica das médias das colônias:  $\hat{\sigma}_F^2 = Q_c / r$

Coefficiente de herdabilidade:  $\hat{h}^2 = (\hat{\sigma}_c^2 / \hat{\sigma}_F^2) \times 100$

Progresso esperado com seleção:  $G_s = ds \times h^2$ , sendo

$ds$  = diferencial de seleção ( diferença entre a média da colônia

selecionada e a média da população =  $\bar{X}_s - \bar{X}$

- Progresso esperado com seleção, em percentagem:  $G_s\% = \frac{G_s}{\bar{X}} \times 100$

Com os dados do ciclo I, a covariância entre os dois caracteres, foi estimada por:

$$\text{Cov } XY = \frac{\sum XY - \frac{(\sum X)(\sum Y)}{N}}{N - 1} = \frac{SP_{xy}}{N - 1}$$

Em função de que os caracteres AC e AP foram avaliados em experimentos distintos, a covariância estimada corresponde à covariância genética entre os dois caracteres. Desta forma, pode-se calcular a correlação genética ( $r_g$ ) entre AC e AP que é dada por (VENCOVSKY, 1987):

$$\hat{r}_g = \frac{\hat{\text{Cov}}_g(x,y)}{\sqrt{\hat{\sigma}_c^2(x) \hat{\sigma}_c^2(y)}}$$

$\hat{\text{Cov}}_g(x,y)$  é a covariância genética entre AC e AP.

As respostas correlacionadas com seleção foram estimadas segundo as seguintes expressões (VENCOVSKY, 1987)

$$\text{RC}_{x/y} = ds_y \frac{\hat{\text{Cov}}_g(x,y)}{\hat{\sigma}_F^2(y)}$$

ou

$$\text{RC}_{y/x} = ds_x \frac{\hat{\text{Cov}}_g(x,y)}{\hat{\sigma}_F^2(x)}$$

onde  $\text{RC}_{x/y}$  é a resposta correlacionada esperada no caráter  $x$ , quando a seleção é praticada em  $y$ ; e  $\text{RC}_{y/x}$  é a resposta correlacionada no caráter  $y$ , quando a seleção é praticada em  $x$ .

Em função da dificuldade técnica de se analisar um grande número de colônias simultaneamente, em cada ciclo de mutação-seleção, foi utilizada uma metodologia estatística para estimar o número ideal de colônias a serem avaliadas. Esta metodologia baseia-se em estimar a amplitude de variação de amostras ( $A$ ) em função do desvio padrão fenotípico ( $\sigma_F$ ) observado para cada caráter e número de amostras. Para isso, utilizou-se a tabela A.2 publicada em STEEL e TORRIE (1960) onde encontram-se os valores do parâmetro  $A/\sigma_F$  para

cada tamanho de amostra. Tendo-se os valores do desvio padrão fenotípico ( $\sigma_F$ ) para cada caráter, no caso AC e AP, estimam-se os valores de  $A/2$  que somados e subtraídos da média geral, correspondem aos valores máximos e mínimos para cada tamanho de amostra (número de colônias). Desta maneira, simulando-se vários tamanhos de amostra, encontrou-se o tamanho ideal a ser utilizado nos próximos ciclos de avaliação, sem sacrificar os progressos com seleção. Esta metodologia estatística é baseada nas propriedades da distribuição normal, e evidentemente se ajusta a caracteres quantitativos.

Para a obtenção do segundo ciclo de mutação-seleção uma suspensão de células da colônia selecionada no ciclo I, foi exposta ao tratamento mutagênico. Após este tratamento, uma amostra de 70 colônias sobreviventes foi avaliada para o caráter AC e AP. O delineamento experimental utilizado, bem como a condução das análises estatísticas e as estimativas dos parâmetros genéticos e fenotípicos, foram idênticos aqueles do ciclo I. Uma colônia que apresentou alta atividade coagulante e atividade proteolítica menor que a média da população II, foi selecionada e utilizada como parental para o ciclo subsequente. Este procedimento foi repetido mais uma vez para a obtenção do terceiro ciclo de mutação-seleção.

Uma vez terminado o programa que envolveu três ciclos de seleção, as linhagens parental e selecionadas em cada uma das etapas, foram avaliadas simultaneamente em um único experimento, segundo o delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições. Após a análise de variância segundo o delineamento utilizado, procedeu-se a análise de regressão linear para quantificar as alterações nos caracteres AP e AC com os ciclos seletivos (Quadro 05)

Quadro 05. Esquema da análise de variância com regressão linear, segundo o delineamento inteiramente casualizado.

F.V.	G.L.	Q.M.	F
Colônias	c-1	Q <sub>1</sub>	Q <sub>1</sub> /Q <sub>4</sub>
Regressão Linear	1	Q <sub>2</sub>	Q <sub>2</sub> /Q <sub>4</sub>
Desvios	c-2	Q <sub>3</sub>	Q <sub>3</sub> /Q <sub>4</sub>
Resíduo	c(r-1)	Q <sub>4</sub>	

Considerando-se que a regressão linear é definida pela equação  $Y = a + bx$ , os parâmetros **b** (inclinação da reta ou coeficiente de regressão) e **a** (intercepto) foram estimados da seguinte maneira:

$$\hat{b} = \frac{\sum XY - \frac{(\sum X)(\sum Y)}{N}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N}} = \frac{SP_{xy}}{SQ_x}$$

$$a = \bar{y} - \hat{b} \bar{x}$$

Este parâmetro (**b**) estima as alterações nos caracteres com os diferentes ciclos seletivos, isto é estima o progresso médio por ciclo seletivo.

Para quantificar o grau de dependência entre as variáveis  $X$  e  $Y$ , foram estimados os coeficientes de correlação ( $r$ ) e de determinação ( $R^2$ ) segundo a expressão:

$$r = \frac{\sum XY - \frac{(\sum X)(\sum Y)}{N}}{\sqrt{\left[ \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N} \right] \left[ \sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{N} \right]}} = \frac{SP_{xy}}{SQ_x SQ_y}$$

$$R^2 = r^2$$

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação dos resultados obtidos no presente trabalho e da discussão relacionada terá a seguinte sequência: primeiramente, serão apresentados os resultados referentes ao melhoramento do microrganismo em estudo, visando aumentar a atividade coagulante e diminuir a atividade proteolítica, através do método de mutação-seleção recorrente. Dentro deste item, serão apresentadas as análises dos dados referentes a avaliação de quatro populações; a primeira, não tratada com mutagênico (C0) e as demais resultantes de tratamentos mutagênicos (C1, C2 e C3). Em seguida, serão apresentados os resultados referentes à descrição do ciclo parassexual em *Candida* sp. Dentro deste aspecto, incluem-se as considerações sobre a



obtenção de mutantes; obtenção, regeneração e fusão de protoplastos e obtenção de genótipos recombinantes.

#### 4.1. Melhoramento genético de *Candida* sp para a produção de coalho microbiano.

Com relação à população não tratada com o mutagênico (C0), os valores e significâncias dos quadrados médios das análises de variâncias dos dados referentes à atividade coagulante (AC) e à atividade proteolítica (AP), encontram-se nas Tabelas 04 e 05, respectivamente. Como pode ser observado nestas tabelas, tanto para o caráter AC como para AP, não foram detectadas diferenças significativas entre colônias da população não tratada com o mutagênico. Isto sugere a uniformidade desta cultura para os caracteres em estudo.

Tabela 04. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AC para a população C0, segundo o delineamento experimental em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos	2	33159,000
Colônias	29	189,896 n.s.
Resíduo	58	285,008
Média		172,872
C.V.%		9,65

n.s. não significativo

Tabela 05. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AP para a população C0, segundo o delineamento inteiramente casualizado, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M. (+)
Colônias	29	10,017 n.s.
Resíduo	60	9,008
Média		2,835
C.V. %		3,35

+ valores multiplicados por  $10^3$

n.s. não significativos

Portanto, para dar início a um programa de melhoramento genético, existe a necessidade de se induzir variabilidade genética, uma vez que esta não está presente na população original. Esta é a razão pela qual, uma das colônias da população C0 foi escolhida, aleatoriamente, para ter suas células tratadas com o agente mutagênico. Uma amostra de 179 colônias resultantes das células tratadas, foi denominada de população C1 e em seguida, avaliada quanto aos caracteres AC e AP.

Como já foi mencionado anteriormente, as avaliações da atividade coagulante das colônias da população C1, foram feitas em 7 experimentos. Para cada experimento, foi feita uma análise de variância, cujos valores e significâncias dos quadrados médios são apresentados nos Apêndices 01, 02, 03, 04, 05, 06 e 07. De posse destas análises individuais, foi feita uma análise de variância agrupada, a qual representa toda a população C1. Os valores e significâncias dos quadrados médios desta análise da variância agrupada, para os dados do caráter AC da população C1, estão representados na Tabela 06. Com relação a atividade proteolítica da população C1, os valores e as

significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados são apresentados na Tabela 07.

Tabela 06. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância agrupada dos dados de AC para a população C1, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos/exp.	14	884,629
Colônias/exp.	179	882,374**
Resíduo médio	344	180,541
Média geral		103,307
C.V.%		13,00

\*\*significativo ao nível de 1%

Tabela 07. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AP para a população C1, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M. (+)
Blocos	2	472,290
Colônias	178	112,232**
Resíduo	356	15,673
Média		2,673
C.V.%		4,65

+ valores multiplicados por  $10^3$

\*\*significativo ao nível de 1%

As diferenças altamente significativas encontradas entre as colônias da população C1, para os caracteres AC e AP sugerem que existem diferenças genéticas entre elas e demonstra a eficiência do tratamento mutagênico utilizado para induzir variabilidade.

A Figura 04 mostra o histograma de frequência dos dados de atividade coagulante da população C1. Como pode ser observado os dados mostraram um espectro de variação contínua, com valores que se distribuem desde 58,06 até 192,36, sendo que a média da população foi de 103,30. Ainda com relação à população C1, a Figura 05 mostra o histograma de frequência dos dados de atividade proteolítica. Também neste caso, foi encontrada uma distribuição contínua, sendo que os dados variaram de 2,09 a 4,25 e a média da população foi de 2,67. Assim como pode ser verificado nestas figuras, tratam-se de caracteres quantitativos, controlados por um número desconhecido de locos.

Através da manipulação algébrica das esperanças dos quadrados médios das análises de variâncias, apresentadas nas Tabelas 06 e 07, quatro parâmetros genéticos e fenotípicos foram estimados para os caracteres AC e AP. As estimativas das variâncias genéticas de colônias ( $\hat{\sigma}_c^2$ ), das variâncias fenotípicas de colônias ( $\hat{\sigma}_p^2$ ), dos coeficientes de herdabilidade ( $\hat{h}^2$ ) e das percentagens de ganhos genéticos esperados com seleção ( $G_s\%$ ) estão apresentadas na Tabela 08.

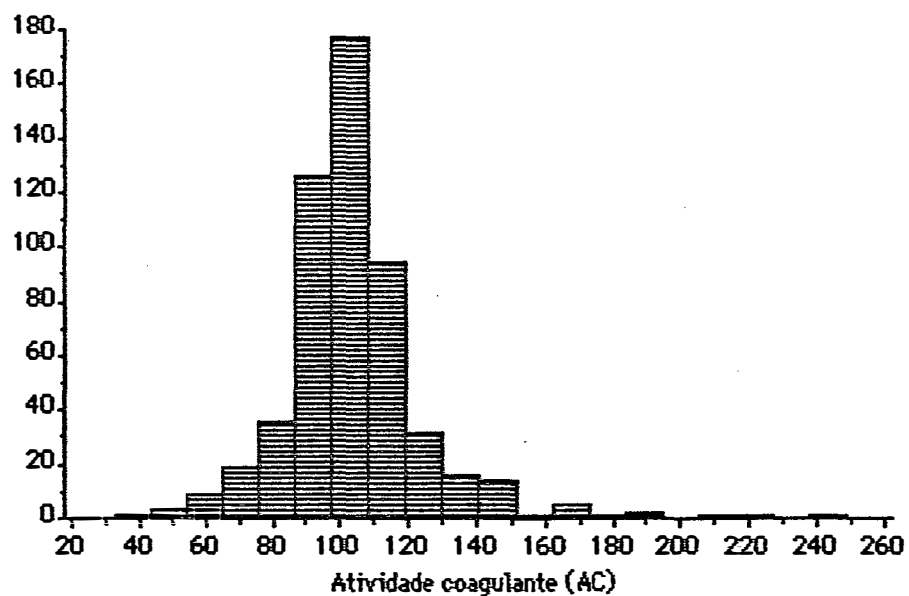


Figura.04. Histograma de frequência dos dados de atividade coagulante para a população C1, sendo  $N=537$ ; Média Geral=103,902; Amplitude de variação= 33,03 a 238,67.

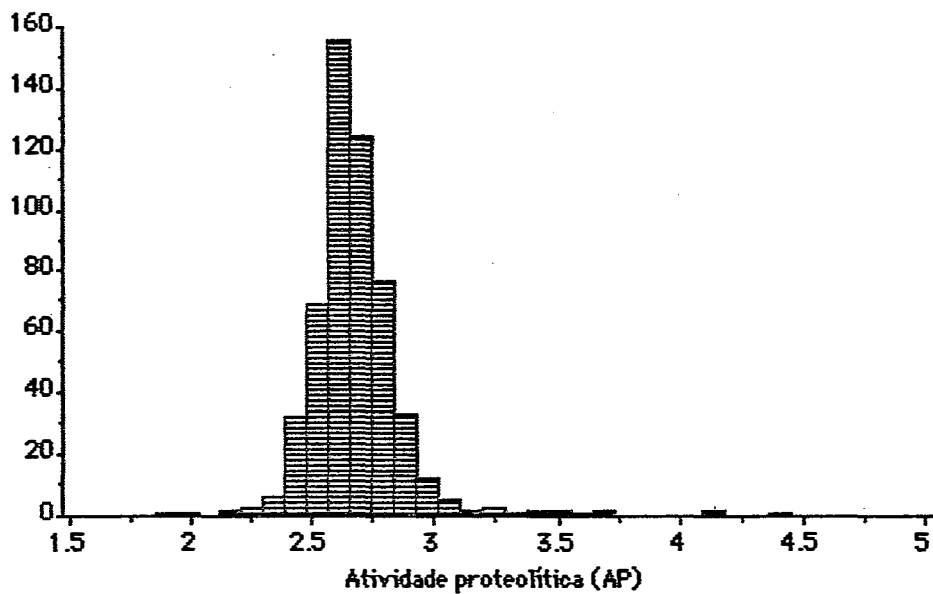


Figura 05. Histograma de frequência dos dados de atividade proteolítica para a população C1, sendo  $N=537$ ; Média geral=2,675; Amplitude de variação= 1,85 a 4,44.

Tabela 08. Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos para a população C1, para os caracteres AC e AP.

Caráter	Parâmetros			
	$\sigma_c^2$	$\sigma_F^2$	$h^2\%$	Gs%
AC	233,944	294,124	79,54	68,56
AP	0,0323	0,0374	86,24	-18,59

$\sigma_c^2$ ,  $\sigma_F^2$ ,  $h^2\%$  e Gs% referem-se as variâncias genéticas, fenotípicas, herdabilidade e progressos esperados com seleção, respectivamente.

Pela leitura da Tabela 08, percebe-se que os valores dos coeficientes de herdabilidade foram elevados para os dois caracteres, indicando a possibilidade de se obter igualmente, valores elevados para o progresso com seleção. Note-se que estes valores de  $h^2$  referem-se ao nível médio de colônias ( $\sigma_F^2 = \sigma^2/r + \sigma_c^2$ ) e não ao nível de colônias individuais ( $\sigma_F^2 = \sigma_c^2 + \sigma^2$ ). De fato, isto fica evidenciado pelas estimativas de Gs% apresentadas na mesma tabela. Para o caráter AC, o progresso de 68,56% foi estimado baseando-se na seleção da colônia que apresentou maior valor fenotípico médio (no caso, colônia nº 59, AC=192,367). Da mesma forma, para o caráter AP, o progresso de -18,59% foi estimado baseando-se na colônia de menor AP (no caso, colônia nº 143, AP=2,097), uma vez que se tem interesse em diminuir esta atividade.

O valor da correlação genética ( $r_g$ ) entre os caracteres AC e AP foi de 0,30. Isso indica a existência de pleiotropia no controle destes caracteres, e portanto, a seleção em um caráter poderá alterar o outro no mesmo sentido, isto é, a seleção para aumentar a atividade coagulante poderá levar a um aumento na atividade proteolítica e vice-versa. Evidentemente, como a magnitude da correlação é baixa deve ser possível a seleção de colônias com

AC elevada e AP baixa. Entretanto, a seleção praticada sem levar em consideração os dois caracteres conjuntamente, poderá alterar no sentido indesejável o outro caráter, como mostram as estimativas das respostas correlacionadas à seleção. A estimativa da resposta correlacionada no caráter AP quando a seleção é praticada no caráter AC é de:  $R_{CAP/AC} = 0,2464$  ou 9,22%. Por outro lado, a estimativa da resposta correlacionada no caráter AC quando a seleção é praticada no caráter AP é de:  $R_{CAC/AP} = -12,543$  ou -12,14%. Isso significa que a seleção para o caráter AC poderá acarretar um aumento de 9,22% em AP e que a seleção para o caráter AP poderá acarretar uma diminuição de 12,14% em AC. Portanto, quando se deseja aumentar o valor de AC e diminuir o valor de AP, deve-se tomar o cuidado em considerar sempre os dois caracteres simultaneamente na seleção.

Segundo SIMPSON & CATEN (1979b), o delineamento de um programa de mutação-seleção envolve muitas considerações, das quais as mais importantes são: o tamanho da população avaliada ( $N_1$ ) e o número de colônias selecionadas para constituir a nova população ( $N_2$ ). A relação  $N_1/N_2$  indica a intensidade de seleção praticada. O estabelecimento de  $N_1$  deve levar em conta dois fatores: (a) a necessidade que se tem de avaliar um grande número de colônias, uma vez que o número de mutantes desejáveis tende a ser reduzido e (b) as dificuldades técnicas que este procedimento impõe.

Com relação ao tamanho da amostra ( $N_1$ ), o uso da metodologia que se baseia em estimar uma amplitude (A) em função do desvio padrão fenotípico ( $\sigma_F$ ) observado, para a população C1, demonstrou-se que  $N_1$  poderia ser reduzido a 70 colônias nos próximos ciclos. Considerando-se que os valores de  $\sigma_F$  e da média, para o caráter AC, foram iguais a 17,15 e 103,31,

respectivamente e supondo um tamanho de amostra igual a 200 ( $N_1$ )<sup>1</sup> tem-se que  $A/2 = 47,16$ . Portanto, os valores de AC máximos e mínimos estimados quando  $N_1 = 200$  são, respectivamente, 150,47 e 56,19. Por outro lado, quando  $N_1 = 70$ <sup>2</sup> tem-se  $A/2 = 41,16$  e, portanto 144,47 e 62,15 para os valores máximos e mínimos de AC. Para o caráter AP tem-se:  $\sigma_F = 0,1934$  e  $m = 2,67$ ; considerando  $N_1=200$ , tem-se que  $A/2 = 0,5318$  e portanto os valores máximos e mínimos de AP são 3,20 e 2,19. Da mesma forma, para  $N = 70$  tem-se  $A/2=0,464$  e valores máximos e mínimos de AP iguais a 3,13 e 2,21. Portanto, verificou-se que a discrepância entre os valores máximos e mínimos esperados, para os dois tamanhos de amostra, para os dois caracteres, é pequena, indicando que o tamanho da população avaliada após mutagênese ( $N_1$ ) pode ser reduzido. Desta forma determinou-se que o tamanho da amostra (número de colônias) a ser utilizado nos ciclos seletivos posteriores, poderia ser igual a 70.

Em alguns programas de desenvolvimento de linhagens melhoradas, somente a colônia superior da população avaliada é selecionada para servir como progenitora da próxima população mutagenizada, isto é  $N_2 = 1$  (BACKUS & STAUFFER, 1955). Este tipo de seleção exige segurança na escolha da colônia a ser selecionada e isto pode ser conseguido fazendo-se as avaliações com várias repetições. A necessidade de repetições, no entanto, normalmente por limitações de natureza técnica, reduz o número de colônias possíveis de serem avaliadas. Em função disso, alguns autores (SIMPSON & CATEN, 1979) tem preferido adotar um processo de seleção massal, onde várias colônias da

---

<sup>1</sup> Número de colônias mais próximo a 179 (tamanho original da amostra) disponível na Tabela A2 publicada em STEEL & TORRIE (1960).

<sup>2</sup> Número de colônias tecnicamente viável de ser avaliado.



população avaliada, sem repetições, são selecionadas ( $N_2 > 1$ ) para dar origem à população seguinte. Neste caso, a importância de repetições fica reduzida, uma vez que selecionando-se várias colônias aumenta-se a probabilidade de que pelo menos uma delas seja, de fato, genotipicamente superior.

No presente trabalho, uma única colônia da população C1 foi selecionada para ser progenitora da próxima população mutagenizada (C2), uma vez que as avaliações foram feitas em três repetições. A colônia selecionada no primeiro ciclo foi aquela de número 59, porque apresentava o maior valor fenotípico médio para o caráter AC e um valor fenotípico médio de AP igual à média da população. Como já foi mencionado anteriormente, para o caráter AC a média geral da população foi de 103,307, enquanto o valor fenotípico médio da colônia selecionada foi 192,36. Para o caráter AP, a média geral da população C1 foi de 2,67, enquanto o valor fenotípico médio da colônia selecionada foi igualmente 2,67.

Após o tratamento das células da colônia de número 59, com o mutagênico ultravioleta, 70 colônias foram escolhidas aleatoriamente. Esta nova população foi denominada C2. Como já citado anteriormente, as avaliações das atividades coagulante destas 70 colônias, foram feitas em três experimentos. Para cada experimento, foi feita uma análise de variância, as quais tem seus valores e significâncias dos quadrados médios apresentados nos Apêndices 08, 09 e 10. De posse destas análises individuais, foi feita uma análise agrupada, a qual representa toda a população C2. Os valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância agrupada para os dados de AC da população C2, estão apresentados na Tabela 09.

Tal como para a população C1, os dados de AC para a população C2 apresentaram uma distribuição contínua variando desde 97,857 até 303,283, sendo que a média foi de 215,61.

Tabela 09. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância agrupada dos dados de AC da população C2, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos/exp.	6	11712,083
Colônias/exp.	67	2633,578**
Resíduo médio	134	284,944
Média geral		215,617
C.V.%		7,80

\*\*significativo ao nível de 1%

Para o caráter atividade proteolítica, a análise dos dados pode ser observada na Tabela 10, onde os valores e significâncias dos quadrados médios são apresentados.

Os dados de AP para a população C2, também apresentaram uma distribuição de frequência contínua variando de 1,373 a 2,543, sendo que a média da população foi de 1,956.

Tabela 10. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AP para a população C2, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M. (+)
Blocos	2	35522,277
Colônias	69	162,342**
Resíduo	138	70,477
Média		1,956
C.V.%		13,56

+ valores multiplicados por  $10^3$

\*\* significativo ao nível de 1%

Novamente, as diferenças significativas entre colônias da população C2, para os caracteres AC e AP, demonstraram que através do tratamento mutagênico utilizado houve indução de variabilidade.

As estimativas dos parâmetros genéticos e fenotípicos da população C2, para os caracteres AC e AP, foram obtidas com a manipulação algébrica das esperanças dos quadrados médios das análises de variâncias, respectivamente apresentadas nas Tabelas 09 e 10. As estimativas das variâncias genéticas ( $\sigma_c^2$ ), das variâncias fenotípicas ( $\sigma_F^2$ ), dos coeficientes de herdabilidade ( $h^2$ ) e das porcentagens de ganhos esperados com seleção ( $G_s \%$ ), são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11. Estimativa de parâmetros genéticos e fenotípicos para a população C2, para os caracteres AC e AP.

Caráter	Parâmetros			
	$\sigma_c^2$	$\sigma_F^2$	$h^2\%$	$G_s\%$
AC	782,878	877,859	89,18	36,25
AP	0,0306	0,0541	56,59	-16,87

$\sigma_c^2$ ,  $\sigma_F^2$ ,  $h^2$ ,  $G_s\%$ , referem-se as variâncias genéticas, fenotípicas, herdabilidades e progressos esperados com seleção, respectivamente.

Os coeficientes de herdabilidade elevados indicaram a possibilidade de se obter progresso com a seleção neste próximo ciclo seletivo. Este progresso pode chegar a 36,25 % para o caráter AC e a -16,87% para o caráter AP. Para o caráter AC este progresso foi estimado baseando-se na seleção da

colônia de número 48, a qual apresentou maior valor fenotípico médio (AC = 303,283). Para o caráter AP a estimativa do progresso esperado foi feita baseando-se no menor valor fenotípico encontrado (AP = 1,37), no caso a colônia de número 13.

Uma vez que estes caracteres são correlacionados, a seleção de uma das colônias da população C2, que após tratamento mutagênico daria origem à população C3, foi praticada considerando-se os dois caracteres simultaneamente. A colônia de número 48, foi portanto selecionada para dar origem ao novo ciclo. Como já comentado anteriormente, esta colônia foi aquela de maior valor fenotípico médio para AC (AC=303,283), permitindo-se esperar um progresso de 36,25% para este caráter. Por outro lado, para o caráter AP esta colônia apresentou um valor fenotípico médio (AP = 1,86) inferior à média da população, permitindo-se estimar um progresso de -2,61%.

Após o tratamento das células da colônia de número 48, com o mutagênico ultravioleta, 70 colônias foram escolhidas aleatoriamente. Esta população foi denominada C3. No que diz respeito à atividade coagulante, da mesma forma que foi efetuado para a população C2, as avaliações foram feitas separadamente em três experimentos. Para cada experimento foi feita uma análise de variância, as quais tem seus valores e significâncias dos quadrados médios apresentados nos Apêndices 11, 12 e 13. Uma vez realizadas estas análises individuais, foi feita uma análise agrupada a qual representa toda a população C3. Os valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância agrupada, para os dados de AC da população C3, podem ser observados na Tabela 12.

Com relação a atividade proteolítica, os valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados são apresentados na Tabela 13.

A variação dos dados de AC na população C3 foi de 51,07 a 269,717, sendo que a média da população foi de 198,86. Para o caráter AP a variação dos dados foi de 2,11 a 3,03, sendo 2,63 a média da população.

As estimativas dos parâmetros genéticos e fenotípicos da população C3, para os caracteres AC e AP, foram obtidas com a manipulação algébrica das esperanças dos quadrados médios das análises de variâncias apresentadas nas Tabelas 12 e 13, respectivamente. Na Tabela 14, são apresentadas as estimativas das variâncias genéticas ( $\sigma_g^2$ ), das variâncias fenotípicas ( $\sigma_F^2$ ), dos coeficientes de herdabilidade ( $h^2$ ) e dos ganhos esperados com seleção (Gs %).

Tabela 12. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância agrupada dos dados de AC da população C3, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos/exp.	6	15242,458
Colônias/exp.	67	2662,514**
Resíduo médio	134	871,408
Média geral		198,865
C.V.%		14,84

\*\* significativo ao nível de 1%

Tabela 13. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AP para a população C3, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos	2	734,008
Colônias	69	85,035*
Resíduo	138	58,002
Média geral		2,632
C.V.%		9,149

\*significativo ao nível de 5%

Tabela 14. Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos para a população C3, para os caracteres AC e AP.

Caráter	Parâmetros			
	$\sigma_c^2$	$\sigma_F^2$	$h^2\%$	Gs%
AC	597,035	887,504	67,27	23,96
AP	0,0090	0,0283	31,78	-6,22

$\sigma_c^2$ ,  $\sigma_F^2$ ,  $h^2$ , Gs% , referem-se as variâncias genéticas, fenotípicas , herdabilidades e progressos esperados com seleção, respectivamente.

Praticando-se a seleção nesta população pode-se chegar a um progresso de 23,96% para o caráter AC e de -6,22% para o caráter AP. A estimativa do progresso esperado para o caráter AC foi feita baseando-se na seleção da colônia de número 32, pois é aquela que apresentou maior valor fenotípico médio (AC = 269,717). Por outro lado, a estimativa do progresso esperado de -6,22% para o caráter AP, foi feita baseando-se na seleção da

colônia de número 33, a qual apresentou menor valor fenotípico médio (2,117). A colônia selecionada neste ciclo foi aquela de número 32. Como citado anteriormente, o valor fenotípico médio de AC para esta colônia foi de 269,717 enquanto que a média da população C3 foi de 198,86. Para o caráter AP, esta colônia apresentou o valor fenotípico médio de 2,49, enquanto a média da população foi 2,63. Considerando-se que o coeficiente de herdabilidade para o caráter AC foi de 67,27% e para o caráter AP foi de 31,78%, o progresso esperado com a seleção desta colônia foi de 23,96% para AC e de -1,69% para AP. Note-se que as estimativas dos progressos esperados com seleção foram baseadas em uma situação ideal, isto é, quando se seleciona a colônia superior para cada caráter. Evidentemente não é desta maneira que se procede a seleção pelo fato de os caracteres serem correlacionados geneticamente. Então, estas estimativas servem para verificar o potencial de melhoramento de cada ciclo seletivo, e servem como um guia para o melhorista por indicar o nível máximo de melhoramento que se pode atingir.

As estimativas das variâncias genéticas e herdabilidade em cada ciclo seletivo também são necessárias, principalmente neste tipo de programa em que apenas uma colônia é selecionada e submetida a mutação, para indicar a quantidade de variabilidade genética que se tem disponível e o valor de herdabilidade. Assim, se a  $\sigma_g^2$  diminuir e portanto, pouco progresso com seleção é esperado deve-se mudar o agente indutor de mutagênese. Da mesma maneira, se a herdabilidade diminuir não devido à diminuição da  $\sigma_g^2$ , mas devido ao aumento da  $\sigma_F^2$ , deve-se utilizar mais repetições antes de se proceder a seleção final.

O estabelecimento de comparações entre ciclos sucessivos de seleção é uma necessidade, em qualquer programa de melhoramento, para determinar se houve, de fato, resposta à seleção. Entretanto, existem

dificuldades para o estabelecimento destas comparações uma vez que, ciclos sucessivos envolvem experimentos em diferentes ocasiões e toda tendência observada pode ser decorrente de variação ambiental. Uma das maneiras de transpor esta dificuldade é aquela que envolve a avaliação das linhagens selecionadas em cada ciclo, junto com a população original em um único experimento (SIMPSON & CATEN, 1979).

No caso do presente trabalho, as comparações entre os diferentes ciclos de seleção foram obtidas através da avaliação simultânea das quatro colônias selecionadas (ITAL (C0), 59 (C1), 48 (C2) e 32 (C3) ) em um experimento do tipo inteiramente casualizado com sete repetições. Com relação ao caráter AC, a Tabela 15 mostra as médias apresentadas pelas colônias selecionadas, bem como a porcentagem destas em relação à colônia não submetida ao tratamento mutagênico (ITAL (C0) ), a qual teve o valor de AC tomado como 100%.

Tabela 15. Médias e porcentagens relativas para o caráter AC, apresentadas pelas colônias selecionadas.

Colônia selecionada	Média	Porcentagem relativa
ITAL (C0)	181,94	100,00
59(C1)	269,87	148,33
48(C2)	298,25	163,92
32(C3)	360,78	198,29



Como pode-se observar na tabela 15, após três ciclos de seleção houve um acréscimo próximo de duas vezes para o caráter AC. O aumento progressivo encontrado para o caráter AC, indica que houve acúmulo de pequenas mutações favoráveis no decorrer dos ciclos de mutação-seleção.

A Tabela 16, mostra os valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância considerando regressão, dos dados de AC das colônias selecionadas nos três ciclos de mutação-seleção.

Tabela 16. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância com regressão linear, das colônias selecionadas nos diferentes ciclos para o caráter AC, segundo o delineamento inteiramente casualizado, média geral, coeficiente de variação experimental (CV%) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

F.V.	G.L.	Q.M.
Colônias	3	38631,322 **
Reg. linear	1	111689,21 **
desvio	2	2102,38 n.s.
Resíduo	24	676,732
Média geral		277,711
C.V%		9,36
$R^2$		0,9641

\*\* significativo ao nível de 1%

n.s. não significativo

Esta análise demonstrou que as diferenças entre as colônias selecionadas, foram altamente significativas. Esta variação é atribuída às diferenças entre os ciclos de seleção, confirmando, desta forma, a eficiência da seleção praticada. Além disso, os desvios da regressão linear foram não significativos, demonstrando que existe uma dependência entre as variáveis

ciclos de seleção e atividade coagulante, e que esta segue uma função linear da primeira. Estas relações entre as variáveis foram representadas graficamente (Figura 06), através da utilização da equação da reta ( $Y = a + bx$ ).

A quantificação do grau de dependência entre as variáveis AC e o número de ciclos de seleção, feita através da estimativa do coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,9641$ ), demonstrou que o aumento da atividade coagulante está altamente associado com o avanço dos ciclos de seleção. O coeficiente de regressão ( $b = 56,49$ ) quantifica o aumento médio no caráter por ciclo seletivo, e, portanto, quantifica o progresso genético médio obtido por ciclo de seleção. Em termos percentuais o progresso obtido é: 29,27% por ciclo seletivo.

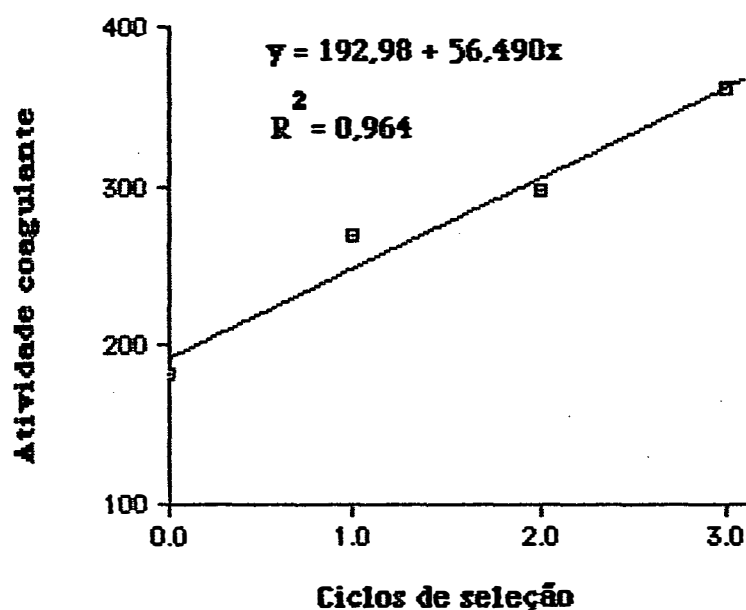


Figura 06. Regressão linear para o caráter atividade coagulante em função dos ciclos de seleção.

No que diz respeito ao caráter atividade proteolítica, a Tabela 14 mostra as médias apresentadas pelas colônias selecionadas, quando avaliadas simultaneamente. Encontram-se também nesta Tabela as percentagens relativas de AP das colônias selecionadas, tomando-se a colônia denominada ITAL (C0), não submetida ao tratamento mutagênico, como sendo 100%.

Tabela 17. Médias e percentagens relativas para o caráter AP apresentadas pelas colônias selecionadas.

Colônia selecionada	Média	Porcentagem relativa
ITAL (C0)	2,67	100,00
59(C1)	2,32	87,12
48(C2)	2,19	81,96
32(C3)	2,14	80,35

Após três ciclos de seleção houve, portanto, uma diminuição dos valores de AP da ordem de aproximadamente, 20%. O progresso obtido para este caráter foi bastante inferior aquele obtido para o caráter AC. Esta diferença entre os progressos obtidos, para os dois caracteres, se deve ao fato de que no critério de seleção deu-se preferência para aquelas colônias que apresentavam maior valor de AC porém com AP igual ou inferior à média da população. Evidentemente, utilizando-se outro critério de seleção, um progresso superior a 20% poderia ter sido obtido, entretanto, isto teria como consequência um progresso menor para o caráter AC.

Na Tabela 18 são apresentados os valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância, considerando regressão, das colônias selecionadas nos três ciclos para o caráter AP. As diferenças entre as colônias foram altamente significativas, confirmando a eficiência da seleção. Embora os desvios da regressão linear foram significativos ao nível de 5% de probabilidade, e portanto a regressão linear não explica 100% dos resultados obtidos, pode-se dizer que existe uma dependência entre as variáveis AP e número de ciclos de seleção que tende à linearidade.

Tabela 18. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância com regressão linear das colônias selecionadas nos diferentes ciclos para o caráter AP, segundo o delineamento inteiramente casualizado, média geral, coeficiente de variação experimental (CV%) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

F.V.	G.L.	Q.M.(+)
Colônias	3	397,8428 **
Reg. linear	1	1027,0288 **
desvio	2	83,1446 *
Resíduo	24	21,7404
Média		2,334
C.V%		6,31
$R^2$		0,865

\*\* significativo ao nível de 1%

\* significativo ao nível de 5%

+ valores multiplicados por  $10^3$

Provavelmente a obtenção de significância dos desvios da regressão linear, para o caráter AP, foi devido ao critério de seleção utilizado.

Considerando-se que em função de dificuldades técnicas, a avaliação da produção de enzimas proteolíticas foi feita de modo bastante diferente daquela que ocorre em condições de fermentação, a seleção foi mais direcionada para o caráter AC, onde se tinha a certeza de correspondência entre a metodologia de avaliação utilizada neste trabalho e aquela que é utilizada em condições industriais de fermentação. Ao contrário disso, se a seleção tivesse sido mais direcionada para o caráter AP, os desvios da regressão linear, poderiam ter sido não significativos e portanto os resultados serem totalmente explicados pela regressão linear.

As relações obtidas entre as variáveis atividade proteolítica e número de ciclos de seleção, foram representadas graficamente (Figura 07), através da utilização da equação da reta ( $Y = a + bx$ ).

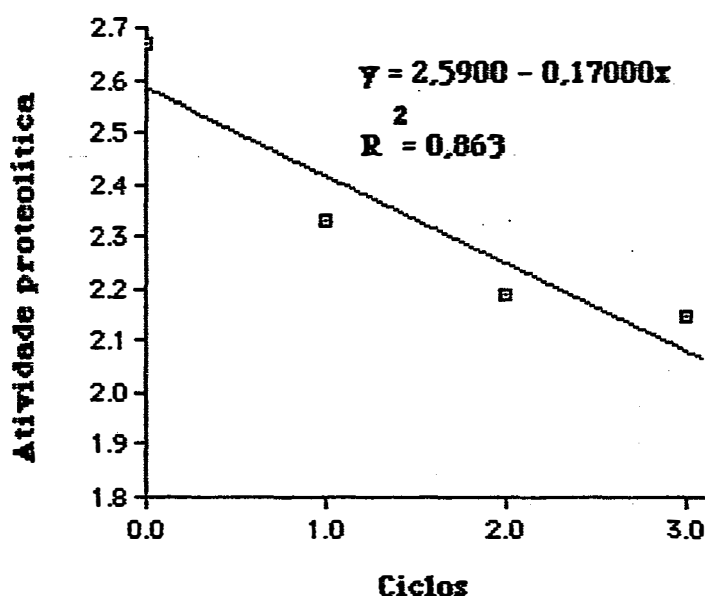


Figura 07. Regressão linear para o caráter atividade proteolítica em função dos ciclos de seleção.

A quantificação do grau de dependência entre as variáveis AP e o número de ciclos de seleção, feita através da estimativa do coeficiente de determinação ( $R=0,8635$ ), demonstrou que a diminuição da atividade proteolítica está altamente associada com o número de ciclos de seleção. O progresso obtido foi de  $-0,17$  por ciclo seletivo, o que corresponde a  $-6,56\%$  por ciclo seletivo.

Fica difícil o estabelecimento de comparações entre os progressos obtidos no presente trabalho, com aqueles obtidos em outros programas de melhoramento de microrganismos descritos na literatura (BACKUS & STAUFFER, 1955; SIMPSON & CATEN, 1979; SILVA & AZEVEDO, 1978; BARACHO & PEREIRA, 1983; SILVA *et al*, 1989), uma vez que diferentes organismos, produtos e tratamentos mutagênicos são envolvidos.

Uma vez terminado o programa de melhoramento, as linhagens selecionadas em cada um dos ciclos (ITAL(C0); 59(C1); 48(C2) e 32(C3)), foram encaminhadas à Secção de Fermentações Industriais do ITAL, onde foram avaliadas para os caracteres AC e AP em condições industriais de fermentação.

Os resultados obtidos no ITAL, demonstraram que a relação AC/AP aumentou consideravelmente com o avanço dos ciclos de seleção. Entretanto o aumento desta relação foi devido ao aumento da atividade coagulante e não à diminuição da atividade proteolítica. Ao contrário disso, a atividade proteolítica em condições de fermentação sofreu um ligeiro aumento no decorrer dos ciclos de seleção (Salva; comunicação pessoal)<sup>1</sup>.

Esta informação reforça o sucesso obtido no programa de melhoramento de *Candida* sp, para o caráter atividade coagulante. No entanto, a atividade proteolítica avaliada conforme descrito no item 3.16, não mostrou

---

<sup>1</sup> SALVA, T.J.G. (ITAL, Campinas), 1990.

correspondência com aquela apresentada nas condições de fermentação. Isso sugere que uma outra metodologia de avaliação da atividade de proteases não específicas deve ser utilizada para se chegar à obtenção do Renital com menor atividade proteolítica, uma vez que não deve existir correlação entre o caráter avaliado (diâmetro do halo + diâmetro da colônia/ diâmetro da colônia) e a atividade de proteases não específicas em condições de fermentação. Note-se, entretanto, que os dois caracteres utilizados no presente estudo foram, muito alterados por seleção, e o mesmo deve ocorrer para a atividade proteolítica não específica, uma vez determinada a melhor maneira de se proceder a sua seleção. Devido a dificuldade de avaliação da atividade proteolítica em meio de fermentação por exigir análises bioquímicas, o que impede a avaliação de 70 ou mais colônias com repetições por ciclo seletivo, sugere-se que selecione-se as 10 colônias superiores para a atividade coagulante e submeta-as a avaliação bioquímica para a atividade proteolítica para proceder-se a seleção final.

#### **4.2. Parassexualidade em *Candida* sp.**

##### **4.2.1. Obtenção de mutantes auxotróficos.**

Uma série de experimentos foram conduzidos, visando a obtenção de mutantes auxotróficos a partir da linhagem selvagem de *Candida* sp, para que estes fossem posteriormente utilizados na realização de cruzamentos parassexuais. Inicialmente, uma curva de sobrevivência ao mutagênico ultravioleta foi realizada, a fim de determinar a dose de irradiação que permite 5% de sobrevivência. Esta é a dose mais comumente utilizada para a obtenção de mutantes auxotróficos de várias espécies de microrganismos. Com

as estimativas das percentagens relativas de células sobreviventes, em cada intervalo de tempo, elaborou-se a curva de sobrevivência apresentada na Figura 08. O tempo de tratamento com a luz ultravioleta para se obter 5% de células sobreviventes, correspondeu a 210 segundos, aproximadamente. Portanto, este foi o tempo de irradiação utilizado para a obtenção de mutantes auxotróficos.

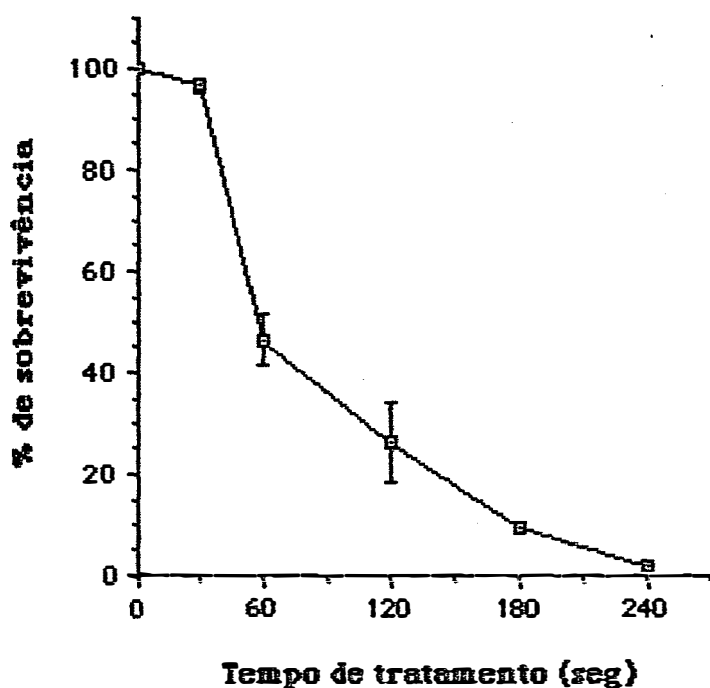


Figura 08. Curva de sobrevivência de *Candida* sp à luz ultravioleta.

Os resultados das frequências de obtenção de mutantes auxotróficos, através dos métodos de isolamento total e enriquecimento por nistatina, estão apresentados na Tabela 19. Como pode ser observado na referida Tabela, o método de enriquecimento proporcionou a obtenção de mutantes auxotróficos,



em uma frequência, aproximadamente, quatro vezes maior. É interessante notar, que através dos dois métodos utilizados, a frequência de mutantes deficientes para adenina foi bastante superior aquela obtida para as outras marcas. Dentre os 26 mutantes auxotróficos obtidos, 14 foram deficientes para a adenina.

Tabela 19. Frequência de obtenção de mutantes auxotróficos de *Candida* sp, através dos métodos de isolamento total e enriquecimento com nistatina.

Método	Nº de colônias analisadas	% de mutantes auxotróficos	Nº de mutantes auxotróficos	Nº de mutantes /Nº de colônias analisadas (%)			
I. Total	2506	0,678	3 arginina	0,1197			
			7 adenina	0,2790			
			1 uracila	0,0400			
			1 nicotinamida	0,0400			
			1 ácido <i>p</i> -aminobenzóico	0,0400			
			2 metionina	0,0790			
			1 biotina	0,0400			
			1 piridoxina	0,0400			
			Nistatina	346	2,586	1 arginina	0,2870
						1 metionina	0,2870
7 adenina	2,0110						

Na tentativa de esclarecer os resultados referentes à alta frequência de mutantes deficientes para a adenina obtidas com o mutagênico ultravioleta, um mutagênico químico foi utilizado para induzir mutações auxotróficas em *Candida* sp. Em função disso, foi realizada uma curva de sobrevivência ao mutagênico metano sulfonado de etila (EMS), para encontrar o tempo de tratamento que possibilita aproximadamente 5% de sobrevivência

das células. Com as estimativas das porcentagens relativas de células sobreviventes, em cada intervalo de tempo, elaborou-se a curva apresentada na Figura 09.

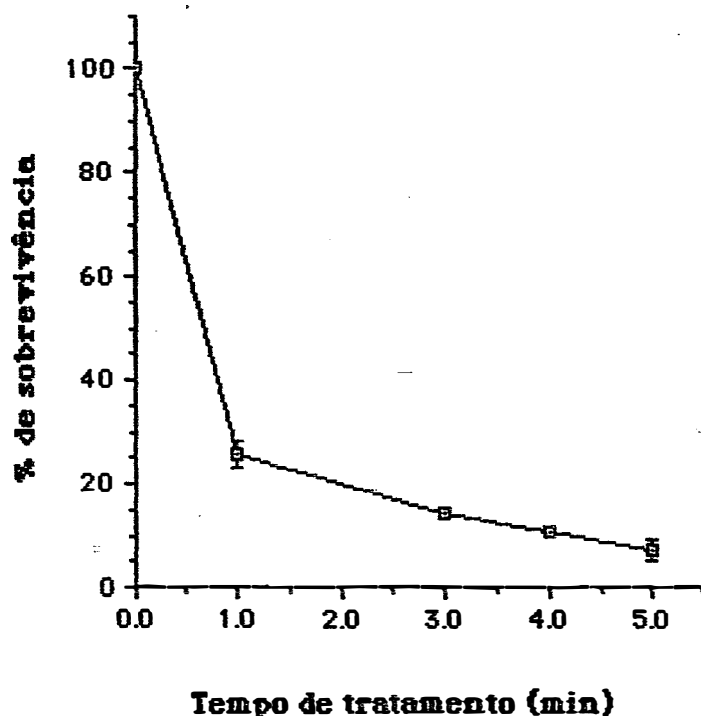


Figura 09. Curva de sobrevivência de *Candida* sp ao EMS.

O tratamento das células de *Candida* sp durante cinco minutos com EMS, permitiu aproximadamente 5% de sobrevivência e, portanto, foi utilizado para o tratamento de indução de mutantes auxotróficos. Um total de 1206 colônias tratadas com EMS, foi analisado quanto a auxotrofia, sendo que nenhum mutante auxotrófico foi encontrado.

Estes resultados, indicaram que a obtenção, em alta frequência, de mutantes deficientes para adenina está relacionada com o tratamento com ultravioleta.

Da mesma forma, em *Candida albicans* algumas linhagens, após tratamento com a luz ultravioleta, originam um grande número de mutantes auxotróficos (0,2 a 1,7%), sendo todos de um mesmo tipo (WHELAN *et al*, 1980; WHELAN & MAGEE, 1981). Este fato ocorre porque estas linhagens são diplóides e heterozigotas para um pequeno número de genes recessivos auxotróficos, que sob a ação da luz ultravioleta, conhecidamente, um agente indutor de permutas mitóticas, segregam e dão origem a colônias auxotróficas e prototróficas.

Tendo em vista, que não é conhecido o nível de ploidia da linhagem estudada no presente trabalho, a mesma hipótese lançada para *C. albicans*, poderia explicar a obtenção dos mutantes *ade*<sup>-</sup> em alta frequência. A linhagem de *Candida* sp seria heterozigota *ade*<sup>+</sup>/*ade*<sup>-</sup> e, sob a ação da luz ultravioleta, os alelos mutante e selvagem segregariam, após permuta mitótica, dando origem a colônias auxotróficas (*ade*<sup>-</sup>/*ade*<sup>-</sup>) e prototróficas (*ade*<sup>+</sup>/*ade*<sup>+</sup>). Dentro desta idéia, portanto, o cromossomo portador do gene adenina seria dissômico. Entretanto, considerando que outras marcas auxotróficas foram obtidas em uma frequência superior aquela esperada para um estado dissômico homozigoto, pode-se supor que, para alguns cromossomos, esta linhagem seja monossômica., e esta levedura seria, portanto, um aneuplóide, pelo menos n+1.

Como o EMS não é um agente indutor de permuta mitótica, a obtenção de mutantes auxotróficos para adenina não foi possível com o uso deste mutagênico. Provavelmente, a não obtenção de outros tipos de mutantes auxotróficos, com o EMS, tenha sido devido ao pequeno número de colônias analisadas.

Alguns dos mutantes auxotróficos simples, foram submetidos a um novo tratamento, com o mutagênico ultravioleta, visando a obtenção de



linhagens com dupla auxotrofia. A Figura 10 mostra a genealogia dos mutantes obtidos.

As marcas auxotróficas obtidas, foram avaliadas quanto a frequência de reversão para o estado selvagem. Com exceção da marca *ade*, todos as mutações auxotróficas avaliadas (*ura*, *nic*, *met*, *arg*, *pab*, *pir* e *bio*) apresentaram uma frequência de reversão menor que  $1 \times 10^{-6}$ . A mutação auxotrófica para o gene *ade*, reverteu na frequência de  $2,44 \times 10^{-6}$ , indicando portanto a necessidade de se evitar a utilização deste marcador na realização dos cruzamentos.

#### 4.2.2. Obtenção, regeneração e fusão de protoplastos.

Os protocolos que descrevem a obtenção de protoplastos de leveduras do gênero *Candida* (HORITSU *et al*,1989; POULTER *et al*,1981; FOURNIER *et al*,1977; SARACHEK *et al*,1981), fazem uso de culturas em fase logarítmica de crescimento. Portanto, foi realizado um experimento a fim de determinar o tempo de incubação da *Candida* sp em meio YEPD, necessário para a obtenção de uma cultura em fase log de crescimento. Os resultados obtidos permitiram a elaboração da curva de crescimento apresentada na Figura 11. Após 20 horas de incubação, tem-se a cultura no meio da fase log de crescimento, e sendo assim este tempo de incubação foi utilizado para a obtenção das células a serem protoplastizadas.

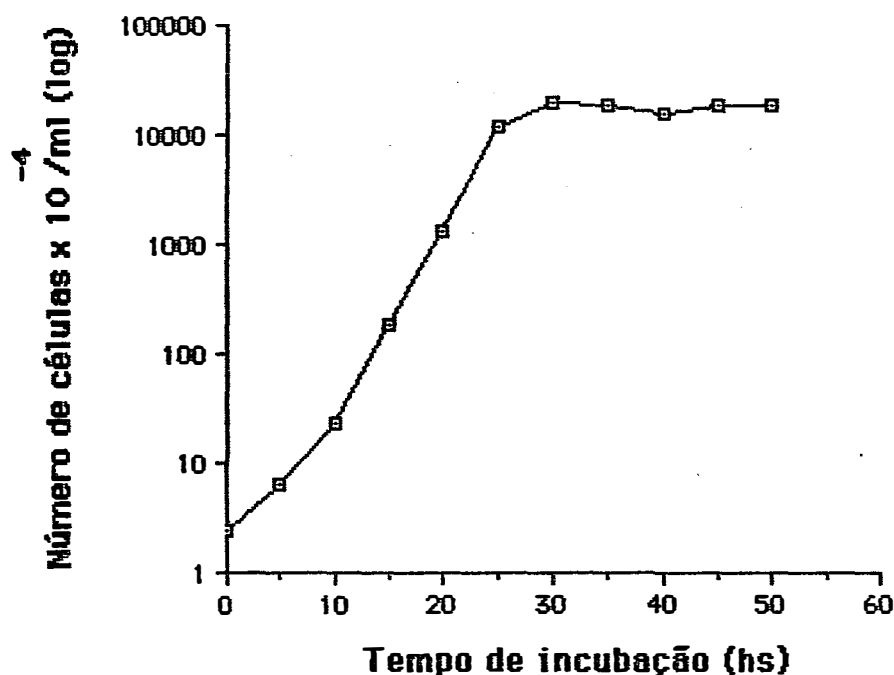


Figura 11. Curva de crescimento de *Candida* sp em meio YEPD.

Os resultados referentes à obtenção e regeneração dos protoplastos de *Candida* sp, nas três molaridades usadas do tampão fosfato-sorbitol (TSP) são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Porcentagem de conversão de células em protoplastos e de regeneração, em três molaridades de TSP (média de três repetições).

Molaridade do TSP	% de conversão de células em protoplastos	% de regeneração
0,8	99,95	4,92
1,0	99,91	8,26
1,2	99,97	14,69

A percentagem de conversão de células em protoplastos não variou conforme a molaridade do tampão utilizado. Entretanto, os protoplastos obtidos em TSP 1,2M, apresentaram melhor aspecto do que aqueles obtidos em TSP 0,8M e 1,0M. A Figura 12 mostra os protoplastos obtidos na presença de TSP 1,2M.

A percentagem de regeneração dos protoplastos foi maior com o aumento da molaridade do tampão. Entretanto, mesmo com TSP 1,2M a percentagem de regeneração dos protoplastos de *Candida* sp foi relativamente baixa, quando comparada com aquela obtida para *C. albicans*, que variou de 20,5 a 58,1% (PESTI & FERENCZY, 1982).

Uma vez estabelecidas as condições de obtenção e regeneração de protoplastos, duas linhagens auxotróficas complementares, foram escolhidas para serem submetidas a fusão. Uma das linhagens mostrava deficiência para uracila e arginina (ura arg), enquanto a outra para o ácido para-aminobenzóico e biotina (pab bio).

A frequência de fusão obtida (n° de colônias em MM sorbitol/ n° de colônias em YEPD sorbitol) foi de  $1,55 \times 10^{-3}$ . Como já discutido anteriormente, a frequência de reversão dos marcadores utilizados é bastante baixa, permitindo assim supor que as colônias desenvolvidas no MM de regeneração são verdadeiros produtos de fusão citoplasmática. Esta frequência de fusão citoplasmática foi bastante superior aquela encontrada por FOURNIER *et al* (1977), entre mutantes de *Candida tropicalis* ( $3,0 \times 10^{-5}$ ) mas, similar aquela obtida para *C. albicans*, que variou de  $4 \times 10^{-4}$  a  $8 \times 10^{-3}$  (GIL *et al*, 1988).

Os produtos de fusão citoplasmática, obtidos em MM de regeneração, foram transferidos para MM sem estabilizador. Desta maneira, pode-se perceber que apenas 13,9% das colônias transferidas mantiveram a

capacidade de crescimento neste meio de cultura. Estas colônias, incapazes de continuar crescendo em MM, são provavelmente heterocários instáveis que dissociam os núcleos parentais auxotróficos. Uma situação idêntica a esta foi encontrada por FOURNIEK *et al.* (1977), quando trabalharam com fusão de protoplastos de *Candida tropicalis*. Segundo os autores, cerca de 30% das colônias obtidas em meio MM de regeneração, imediatamente segregavam as marcas parentais, e eram, portanto, heterocários instáveis.

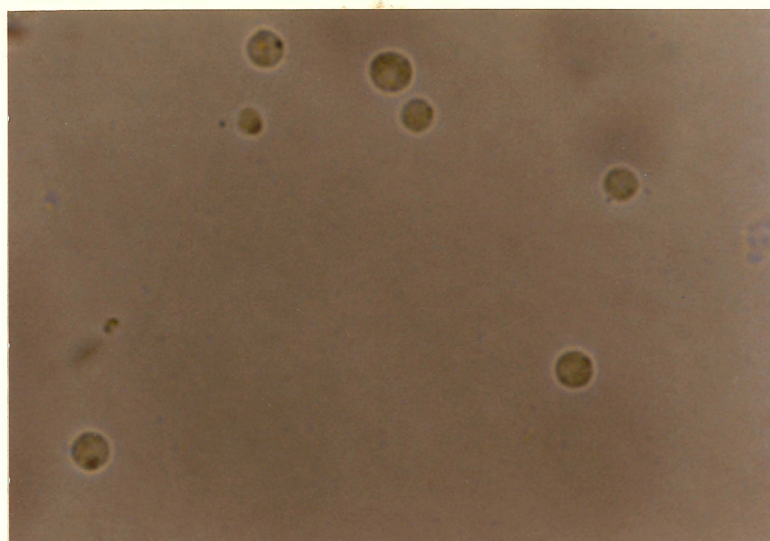


Figura 12. Protoplastos de *Candida* sp, em tampão fosfato-sorbitol 1,2 M.



Um dos produtos de fusão que manteve a capacidade de crescimento em MM, foi selecionado e denominado de PF1. Quando as células deste produto de fusão foram semeadas em BDA suplementado e em MM, o número médio de colônias obtido nos dois tipos de meio foi semelhante (75,66 e 71,33 em BDA suplementado e MM, respectivamente). Este fato, indica a estabilidade do produto de fusão obtido e sugere a ocorrência de fusão nuclear.

Através da análise da coloração dos núcleos das células do PF1 e das linhagens parentais, pode-se perceber que estas são 100% uninucleadas (Figura 13). Os comprimentos celulares e os diâmetros nucleares das células do produto de fusão e das linhagens parentais são apresentados na Tabela 21. Como pode ser observado nesta Tabela, o produto de fusão nuclear tem o comprimento celular 1,63 vezes maior do que a média dos pais, e o diâmetro nuclear é 1,26 vezes maior do que aqueles das linhagens parentais. Este resultado vem de encontro aquele obtido por SUZUKI *et al.*, 1986, onde o híbrido obtido pela fusão de protoplastos entre *Candida albicans* e *Candida guilliermondii* apresentou tamanho nuclear maior que ambos os parentais. Tal como ocorre para *Candida albicans* (SARACHEK *et al.*, 1981), as células do produto de fusão nuclear de *Candida* sp foram quase duas vezes maiores do que as células parentais.

Tabela 21. Comprimentos celulares e diâmetros nucleares do produto de fusão e das linhagens auxotróficas parentais ( média de 15 repetições)

Linhagens	Comprimento celular	Diâmetro nuclear
ura arg	7,06 ± 1,19	1,93 ± 0,20
pab bio	6,61 ± 0,64	1,85 ± 0,12
Produto de fusão	11,14 ± 1,87	2,39 ± 0,11

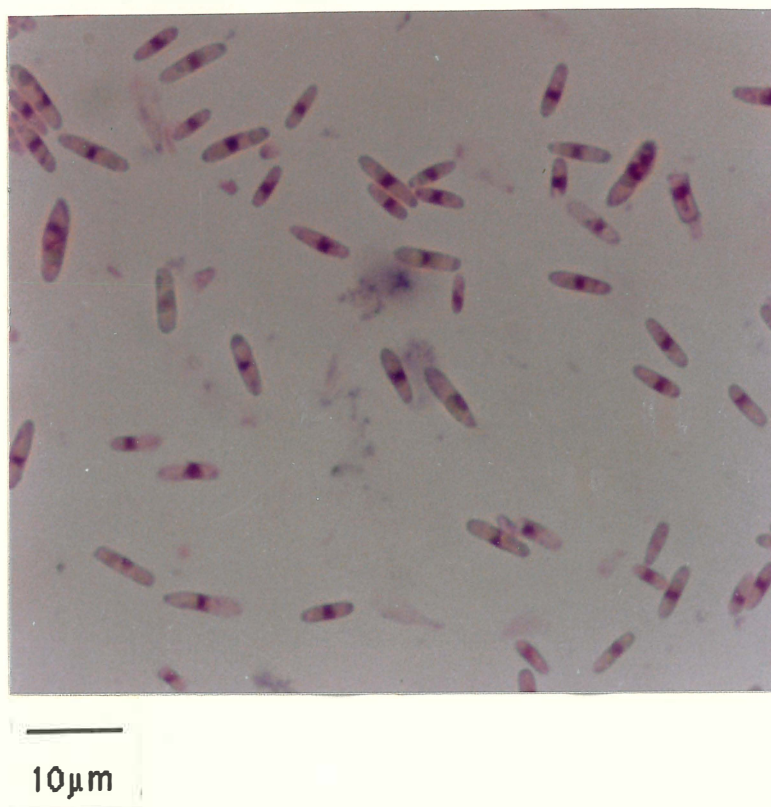


Figura 13. Coloração de núcleos do mutante *pab<sup>-</sup> bio<sup>-</sup>* de *Candida* sp .

#### 4.2.3. Obtenção de genótipos recombinantes.

##### 4.2.3.1. Obtenção espontânea de genótipos recombinantes

Na tentativa de se obter genótipos recombinantes espontaneamente, ou seja, sem fazer uso de agentes indutores de permuta mitótica ou de

haploidização, o produto de fusão nuclear foi cultivado por três vezes sucessivas em meio BDA suplementado. A terceira cultura obtida, foi semeada em meio sólido BDA suplementado e as 852 colônias obtidas foram analisadas quanto a auxotrofia. Desta forma, os seguintes auxotróficos foram obtidos: **arg<sup>-</sup>** (0,234%) e **bio<sup>-</sup>** (0,117%).

Segundo FOURNIER *et al.* (1977), em *C. tropicalis* também foi possível a obtenção espontânea de genótipos recombinantes, a partir de um produto de fusão nuclear. Entretanto, a frequência de obtenção dos recombinantes auxotróficos de *C. tropicalis* foi bastante inferior aquela obtida neste trabalho, tendo variado de 0,02% a 0,07%.

Possivelmente, as diferenças entre as frequências de obtenção de recombinantes auxotróficos encontradas para *C. tropicalis* e aquelas encontradas no presente trabalho, se devem as diferenças das metodologias utilizadas para a obtenção destes recombinantes. No trabalho de FOURNIER *et al.* (1977), o produto de fusão foi cultivado apenas uma única vez em meio completo, antes de se proceder a análise de auxotrofia. Por outro lado, como já mencionado anteriormente, no presente trabalho o produto de fusão foi cultivado por três vezes sucessivas em BDA suplementado líquido, o que provavelmente, aumentou a probabilidade de aparecimento de recombinantes auxotróficos.

As medidas do diâmetro nuclear destes recombinantes são apresentadas na Tabela 22. A comparação das médias, pelo teste de Scheffe, indicou que os diâmetros nucleares dos recombinantes obtidos são diferentes daqueles do produto de fusão nuclear (PF1), mas não diferem estatisticamente dos diâmetros nucleares das linhagens parentais.

Tabela 22. Diâmetros nucleares e respectivos desvios padrão das linhagens recombinantes, parentais e produto de fusão nuclear ( média de 15 repetições).

Linhagens	Diâmetros nucleares( $\mu\text{m}$ )
Parental	
ura <sup>-</sup> arg <sup>-</sup>	1,933 $\pm$ 0,207
pab <sup>-</sup> bio <sup>-</sup>	1,858 $\pm$ 0,128
Produtos de fusão	
PF1	2,393 $\pm$ 0,113
Recombinantes obtidos espontaneamente	
R1: ura <sup>+</sup> arg <sup>-</sup> pab <sup>+</sup> bio <sup>+</sup>	1,955 $\pm$ 0,097
R2: ura <sup>+</sup> arg <sup>-</sup> pab <sup>+</sup> bio <sup>+</sup>	1,980 $\pm$ 0,183
R3: ura <sup>+</sup> arg <sup>+</sup> pab <sup>+</sup> bio <sup>-</sup>	2,023 $\pm$ 0,181
Recombinantes obtidos com pFA	
R4: ura <sup>-</sup> arg <sup>+</sup> pab <sup>+</sup> bio <sup>+</sup>	2,032 $\pm$ 0,093
R5: ura <sup>-</sup> arg <sup>+</sup> pab <sup>+</sup> bio <sup>+</sup>	1,997 $\pm$ 0,185
R6: ura <sup>+</sup> arg <sup>+</sup> pab <sup>-</sup> bio <sup>+</sup>	2,028 $\pm$ 0,131
R7: ura <sup>+</sup> arg <sup>-</sup> pab <sup>+</sup> bio <sup>+</sup>	2,127 $\pm$ 0,225

Estes resultados sugerem que os recombinantes obtidos apresentam o mesmo grau de ploidia das linhagens parentais. Sendo assim, pode-se supor que estes recombinantes auxotróficos originaram-se por perdas cromossômicas e não simplesmente por permuta mitótica.

#### 4.2.3.2. Obtenção de recombinantes através do uso de pFA.

A indução de haploidização com *p*-fluor-fenilalanina já foi descrita para vários organismos. Como demonstrado genética e citologicamente por LHOAS (1961, 1968), este composto pode atuar induzindo sucessivas perdas cromossômicas durante o processo mitótico de divisão celular.

Os trabalhos de SARACHEK *et al.* (1981) e FOURNIER *et al.* (1977), relatam o uso de uma concentração de pFA de 5 mg/ml para as tentativas de

obtenção de produtos haplóides de *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente.

No presente trabalho, a tentativa de obtenção de recombinantes haplóides com pFA, foi feita através do tratamento do produto de fusão nuclear com apenas 50 µg/ml de pFA, uma vez que nesta concentração a taxa de inibição de crescimento já foi bastante alta, cerca de 93,6%. O pFA na concentração de 5mg/ml, inibiu 100% do crescimento celular de *Candida* sp, o que é contrastante ao resultado encontrado para *C. albicans* (SARACHEK et al., 1981), onde nenhum efeito inibidor do crescimento foi observado.

Após a análise de 2217 colônias, provenientes da cultura do produto de fusão nuclear em presença do agente haploidizante, os seguintes auxotróficos foram obtidos: *ura*<sup>-</sup> (0,09%), *pab*<sup>-</sup> (0,045%), *arg*<sup>-</sup> (0,045%). Tal como em *C. tropicalis*, somente recombinantes monoauxotróficos foram obtidos após tratamento do produto de fusão nuclear com o agente haploidizante pFA.

É interessante notar que a frequência de recombinantes auxotróficos de *Candida* sp, obtidos espontaneamente (0,352%), foi maior do que aquela obtida com pFA (0,180%). Considerando-se que, além da variável, presença ou não de pFA, o número de cultivos em BDA suplementado utilizado nos dois experimentos foi diferente, se torna difícil o estabelecimento de comparações entre as frequências obtidas nos dois casos. Permanece, portanto, a dúvida se a obtenção dos recombinantes, quando utilizou-se pFA, está ou não associada à ação da droga.

Na tabela 22, são apresentados os diâmetros nucleares médios, bem como os desvios padrão para as linhagens parentais, recombinantes e produtos de fusão. A comparação das médias, pelo teste de Scheffe, mostrou que os diâmetros nucleares dos recombinantes R4, R5, e R6, são diferentes do

diâmetro nuclear do produto de fusão e não diferem estatisticamente das linhagens parentais. A interpretação destes resultados permite sugerir que estes recombinantes são produtos de haploidização, durante o crescimento vegetativo.

As diferenças entre os diâmetros nucleares do recombinante R7 e do produto de fusão foram estatisticamente não significativas. Entretanto, o diâmetro nuclear médio deste recombinante mostrou-se diferente, somente de uma das linhagens parentais (pab<sup>-</sup> bio<sup>-</sup>). Isso indica que o tamanho nuclear deste recombinante é intermediário entre o produto de fusão e o parental. Desta forma, pode-se supor que o recombinante R7 seja um aneuplóide, que ainda não completou sua haploidização ou que se tornou estável nessa condição, uma vez que em outras leveduras, tal como *S. cerevisiae*, ocorre uma alta tolerância à aneuploidia (PARRY & COX, 1970)

Embora uma série de estudos, tais como a indução de permuta mitótica, ainda é necessária para a completa elucidação do processo parassexual nesta levedura, os resultados obtidos neste trabalho indicam, claramente, a possibilidade de se induzir recombinação genética em *Candida* sp. Este processo de recombinação poderá contribuir para o melhor entendimento da genética de leveduras pertencentes ao gênero *Candida*.

Além disso, no que diz respeito ao melhoramento genético, é frequente o fato de as médias de várias linhagens superiores não serem estatisticamente diferentes. Porém, é provável que estas linhagens tenham diferentes alelos favoráveis nos locos que controlam o caráter a ser melhorado. O cruzamento destas linhagens deverá acarretar o aparecimento de linhagens superiores às linhagens selecionadas, pelo agrupamento de alelos favoráveis. Desta forma, fica claro a importância da utilização deste processo

de recombinação em etapas programas de melhoramento genético para a produção de Renital.

## CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados foi possível estabelecer as seguintes conclusões:

1. Os caracteres atividade coagulante e atividade proteolítica apresentaram-se geneticamente correlacionados ( $r_g = 0,30$ ); isto indica que, por ocasião da seleção, deve-se levar em conta os dois caracteres simultaneamente;

2. A metodologia de mutação-seleção recorrente mostrou-se eficiente para o melhoramento genético de *Candida* sp; o produto obtido mostra perspectivas de uso industrial;

3. A levedura *Candida* sp apresenta ciclo parassexual; a descrição deste fenômeno abre caminhos para estudos genéticos nesta levedura e vem auxiliar em programas de melhoramento genético.



**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- ABDEL-FATTAH, A. F.; EL-HAWWARY, N. M.; AMR, A. S. Studies on the production of milk-clotting enzymes, proteolytic enzymes and mucilage by fungi. *Journal of General Microbiology*, London, **84**: 327-31, 1974.
- ARIMA, K.; IWASAKI, S.; TAMURA, G. Milk clotting enzyme from microorganisms; part I. Screening test and identification of the potent fungus. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, **31**: 540-5, 1967.
- AZEVEDO, J. L. Recombinação em fungos filamentosos. In: COSTA, S.O.P., coord. *Genética molecular e de microrganismos; os fundamentos da engenharia genética*. São Paulo, Manole, 1987. p.393-407.

- AZEVEDO, J. L. & NEDER, R. N. Comparação entre o crescimento de linhagens mutantes resistentes a antibióticos e linhagens não mutantes de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, **20**: 163-73, 1963.
- BACKUS, M. P. & STAUFER, J. F. The production and selection of a family of strains in *Penicillium chrysogenum*. *Mycologia*, New York, **47**: 429-63, 1955.
- BAILEY, M. J. & SIIKA-AHO, M. Production of microbial Rennin. *Biotechnology Letters*, Kew, **10**: 161-6, 1988.
- BARACHO, I. R. & PEREIRA, S. F. A. Utilização da luz ultra-violeta no melhoramento de *Aspergillus niger* para produção de ácido cítrico. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, **14**: 84-9, 1983.
- CULLEN, D.; GRAY, G. L.; WILSON, L. J.; HAYENGA, K. J.; LAMSA, M. H.; REY, M. W.; NORTON, S.; BERKA, R. M. Controlled expression and secretion of bovine chimosin in *Aspergillus nidulans*. *Bio / Technology*, New York, **5**: 369-76, 1987.
- D' SOUZA, T. M. & PEREIRA, L. Production and immobilization of a bacterial milk - clotting enzyme. *Journal of Dairy Science*, Champaign, **65**: 2074-81, 1982.

- DATTA, A. ; GANESAN, K. ; NATARAJAN, K. Current trends in *Candida albicans* research. *Advances in Microbial Physiology*, San Diego, **30**: 53-88, 1989.
- EMTAGE, J. S.; ANGAL, S.; DOEL, M.T.; HARRIS, T. J. R.; JENKINS, B.; LILLEY, G.; LOWE, P. A. Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, Washington, **80**: 3671-5, 1983.
- FOLTMANN, B.; PEDERSON, V. B.; JACOBSEN, H.; KAUFFMAN, S.; WYBRANDT, G. The complete amino acid sequence of prochymosin. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, Washington, **74**: 2321-4, 1977.
- FOURNIER, P. ; PROVOST, A. ; BOURGUIGNON, C. ; HESLOT, H. Recombination after protoplast fusion in the yeast *Candida tropicalis*. *Archives of Microbiology*, Berlin, **115**: 143-9, 1977.
- FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, Champaign, **72**: 1379-400, 1989.
- GIL, C.; POMÉS, R.; NOMBELA, C. A complementation analysis by parasexual recombination of *Candida albicans* morphological mutants. *Journal of General Microbiology*, London, **134**: 1587-95, 1988.

GOFF, C. G.; MOIR, D. T.; KOHNO, T.; GRAVIUS, T. C.; SMITH, R. A.; YAMASAKI, E.; TAUNTON-RIGBY, A. Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, Amsterdam, **27**: 35-6, 1984.

HARKKI, A.; UUSITALO, J.; BAILEY, M.; PENTTILA, M.; KNOWLES, J. K. C. A novel fungal expression system: secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio / Technology*, New York, **7**: 596-603, 1989.

HILTON, C.; MARKIE, D.; CORNER, B.; RIKKERINK, E.; POULTER, R. Heat shock induces chromosome loss in the yeast *C. albicans*. *Molecular General Genetics*, Berlin, **200**: 162-8, 1985.

HIRAMATSU, R.; AIKAWA, J.; HORINOUCI, S.; BEPPU, T. Secretion by yeast of the zymogen form of Mucor rennin, and an aspartic proteinase of *Mucor pusillus*, and its conversion to the mature form. *The Journal of Biological Chemistry*, **264**: 16862-6, 1989.

HORITSU, H.; YAMAMOTO, K.; ASAI, Y.; KAWAI, K.; FUTO, S.; FUKUCHI, A. Characterization of an interspecific fusant between *Candida utilis* and *Candida lipolytica*. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, **53**: 389-94, 1989.

KAKAR, S. N. & MAGEE, P. T. Genetic analysis of *Candida albicans*: identification of different isoleucine-valine, methionine, and arginine alleles by complementation. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **151**: 1247-52, 1982.

- LHOAS, P. Mitotic haploidisation by treatment of *Aspergillus niger* diploids with parafluorophenylalanine. *Nature*, London, **190**:744, 1961.
- LHOAS, P. Growth rate and haploidisation of *Aspergillus niger* on media containing p-fluorophenylalanine. *Genetical Research*, Cambridge, **12**:305-15, 1968.
- LOCKWOOD, L. B. Organic acid production. In: SMITH, J. E. & BERRY, D. R., ed. *The filamentous fungi industrial mycology*. London, Edward Arnold 1975. v.1, p.140-57.
- MELLOR, J.; DOBSON, M. J.; ROBERTS, N. A.; TUIITE, M. F.; EMTAGE, J. S.; WHITE, S.; LOWE, P. A.; PATEL, T.; KINGSMAN, A. J.; KINGSMAN, S. M.; Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, Amsterdam, **24**: 1-14, 1983.
- MENEZES, H. C. & MENEZES, T.J. B. Rennin- like enzyme from soil-isolated yeast. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY,4., Valencia, 1974. *Proceedings*. Valencia, 1974. v.1, p. 499-506.
- MENEZES, T. J. B. & NAGATO, M. Produção de renina por microrganismo; I. Isolamento e seleção das linhagens mais promissoras. *Revista Brasileira de Tecnologia*, Brasília, **5**: 73-81, 1974.

- MENEZES, T. J. B. & MENEZES, H. C. Produção de sucedâneo do coalho de bezerros: Renital. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, **8**: 297-311, 1977.
- MENEZES, H. C.; MENEZES, T. B.; SANTOS, D. M. Caracterização bioquímica e purificação do Renital. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, **8**: 245-69, 1977.
- MENEZES, T. J. B.; MENEZES, H. C.; ARAKAKI, T.; SALES, A. M. Produção de renina por microrganismos; II. Escolha do meio de cultura. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, **5**: 51-61, 1973/4.
- MOIR, D. ; MAO, J. ; SCHUMM, J. W. ; VOVIS, G. F. ; ALFORD, B. L. ; TAUNTON-RIGB, A. Molecular cloning and characterization of double-strand cDNA coding for bovine chymosin. *Gene*, Amsterdam, **19**: 127-38, 1982.
- MORTIMER, R. K. & HAWTHORNE, D. C. Yeast genetics. In: Rose, A. H. & Harrison, J. S., ed. *The yeasts*. New York, Academic Press, 1969. v.1, p. 385-460.
- NISHIMORI, K.; SHIMIZU, N.; KAWAGUCHI, Y.; HIDAKA, M.; VOZUMI, T.; TERUHIKO, B. Expression of cloned calf prochymosin cDNA under control of tryptophan promoter. *Gene*, Amsterdam, **29**: 41-9, 1984.

- OHMIYA, K. ; FUKAMI, K. ; SHIMIZU, S. ; GEKKO, K. Milk curdling by rennet under high pressure. *Journal of Food Science*, New York, **52**: 84-7, 1987.
- OLAIYA, A. F. & SOGIN, S. J. Ploidy determination of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **140**: 1043-9, 1979.
- OLAIYA, A. F. ; STEED, J. R. ; SOGIN, S. J. Deoxyribonucleic acid-deficient strains of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **141**: 1284-90, 1980.
- PARRY, E. M. & COX, B. S. The tolerance of aneuploidy in yeast. *Genetical Research*, Cambridge, **16**: 333-40, 1970.
- PEDERSON, V. B. ; CHRISTENSEN, K. A. ; FOLTMANN, B. Investigations on the activation of bovine prochymosin. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, **94**: 573-80, 1979.
- PESTI, M. & FERENCZY, L. Protoplast fusion hybrids of *Candida albicans* sterol mutants differing in nystatin resistance. *Journal of General Microbiology*, London, **128**: 123-8, 1982.
- PONTECORVO, G. & ROPER, J. A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploid in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, London, **6**: viii, 1952.

- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L.M.; MacDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, New York, **5**: 141-238, 1953.
- POULTER, T. M. & RIKKERINK, E. H. A. Genetic analysis of red, adenine-requiring mutants of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **156**: 1066-77, 1983.
- POULTER, R. ; JEFFERY, K. ; HUBBARD, M. J. ; SHEPHERD, M.G. ; SULLIVAN, P.A. Parasexual genetic analysis of *Candida albicans* by spheroplast fusion. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **146**: 833-40, 1981.
- POULTER, R. ; HANRAHAN, V. ; JEFFERY, K. ; MARKIE, D. ; SHEPHERD, M.G. ; SULLIVAN, P. A. Recombination analysis of naturally diploid *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **152**: 969-75, 1982.
- PROVOST, A.; BOURGUIGNON, C.; FOURNIER, P.; RIBET, A. M.; HESLOT, H. Intergenic hybridization in yeasts through protoplast fusion. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, **3**: 309-12, 1978.
- REAUME, S. E. & TATUM, E. L. Spontaneous and nitrogen mustard induced nutritional deficiencies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry*, San Diego, **22**: 331-8, 1949.
- SARACHEK, A. Promotion or retardation of the growth of adenine auxotrophs of *Candida albicans* by purines, pyrimidines and nucleosides. *Antonie*



*van Leeuwenhoek Journal of Microbiology Serology*, Dordrecht ,  
*30*: 289-302, 1964.

SARACHEK, A. & WEBER, D.A. Temperature-dependent internuclear transfer of genetic material in heterokaryons of *Candida albicans*. *Current Genetics*, New York, *8*: 181-7, 1984.

SARACHEK, A. ; RHOADS, D. D. ; SCHWARZHOFF, R.H. Hybridization of *Candida albicans* through fusion of protoplasts. *Archives of Microbiology*, Berlin, *129*: 1-8, 1981.

SARDINAS, J. L. New sources of Rennet. *Process Biochemistry*, Herts, *4*: 13-7, 1969.

SARDINAS, J. L. Calf Rennet substitutes. *Process Biochemistry*, Herts, *11*: 10-7, 1976.

SCOTT, R. Rennet and rennet substitutes . *Process Biochemistry*, Herts, *8*: 10-4, 1973.

SHEPHERD, M. G.; POULTER, R. T. M.; SULLIVAN, P. A. *Candida albicans* : biology, genetics, and pathogenicity. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, *39*: 579-614, 1985.

SHRINIVASAN, R. A.; LYENGAR, M.K.K.; BABBAR, I.J.; CHAKRAVORTY, S. C.; DUDANI, A. T.; IYA, K.K. Milk clotting enzymes from microorganisms. *Applied Microbiology*, Washington, *12*: 475-8, 1964.

- SILVA, J. C. & AZEVEDO, J. L. Utilization of gamma rays in the selection of *Aspergillus niger* for acid production. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, *1*: 41-9, 1978.
- SILVA, J. C.; SIQUEIRA Jr, J.P.; MARCONDES, C. B. Selection of *Metarhizium anisopliae* for extracellular enzyme production and virulence toward *Triatoma infestans*. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, *12*: 1-7, 1989.
- SIMPSON, I. N. & CATEN, C. E. Induced quantitative variation for penicillin titre in clonal population of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, London, *110*: 1-12, 1979 a.
- SIMPSON, I. N. & CATEN, C. E. Recurrent mutation and selection for increased penicillin titre in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, London, *113*: 209-17, 1979 b.
- STEEL R.G.D. & TORRIE, J. H. *Principles and procedures of statistics*. New York, McGraw-Hill, 1960. 481p.
- STERNBERG, M. Z. Crystalline milk-clotting protease from *Mucor miehei* and some of its properties. *Journal of Dairy Science*, Champaign, *54*: 159-67, 1971.
- STERNBERG, M. Z. Microbial Rennets. *Advances in Applied Microbiology*, San Diego, *20*: 135-57. 1976.

- SUZUKI, T. ; ROGERS, A.L. ; MAGEE, P.T. Inter and intra-species crosses between *Candida albicans* and *Candida guilliermondii*. *Yeast*, Chichester, **2** : 53-58, 1986.
- VALLIN, C. & FERENCZY, L. Diploid formation of *Candida tropicalis* via protoplast fusion. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, Budapest, **25**: 209-12, 1978.
- van den BERG, J. A.; van der LAKEN, J. K.; van OUYEN, J.J. A.; RENNERS, T. C. H. M.; RIETVELD, K.; SCHAAP, A.; BRAKE, A. J.; BISHOP, R. J.; SCHULTZ, K.; MOIER, D.; RICHMAN, M.; SHUSTER, J. R. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochimosin. *Bio/ Technology*, New York, **8**: 135-9, 1990.
- VENCOVSKY, R. Herança quantitativa. In: PATERNIANI, E.P. & VIEGAS, G.P. ed. *Melhoramento e produção do milho*. Campinas, Fundação Cargill, 1987. p. 137-214.
- WHELAN, W. L. & MAGEE, P.T. Natural heterozygosity in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **145** : 896-903, 1981.
- WHELAN, W. L. ; PARTRIDGE, R. M. ; MAGEE, P.T. Heterozygosity and segregation in *Candida albicans*. *Molecular General Genetics*, Berlin, **180**: 107-13, 1980.

YAMASHITA, T.; TONOUCI, N.; VOZUMI, T.; BEPPU, T. Secretion of Mucor rennin, a fungal aspartic protease of *Mucor pusillus*, by recombinant yeast cells. *Molecular General Genetics*, Berlin, **210**: 462-7, 1987.

## APÊNDICES

Apêndice 01. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AC para o experimento 1, da população C1, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos	2	17,218
Colônias	29	1237,716**
Resíduo	58	237,477
Média		107,348
C.V.%		14,35

\*\* significativo ao nível de 1%

Apêndice 02. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AC para o experimento 2, da população C1, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos	2	2189,000
Colônias	25	1486,893**
Resíduo	50	172,655
Média		101,097
C.V.%		12,99

\*\* significativo ao nível de 1%

Apêndice 03. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AC para o experimento 3, da população C1, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos	2	105,781
Colônias	25	292,335 n.s.
Resíduo	50	184,575
Média		105,114
C.V. %		12,92

n.s. não significativo

Apêndice 04. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AC para o experimento 4, da população C1, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos	2	597,687
Colônias	28	1689,266**
Resíduo	56	222,714
Média		108,163
C.V. %		13,79

\*\* significativo ao nível de 1%

Apêndice 05. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AC para o experimento 5, da população C1, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos	2	723,218
Colônias	28	175,801**
Resíduo	56	63,821
Média		97,416
C.V. %		8,20

\*\* significativo ao nível de 1%

Apêndice 06. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AC para o experimento 6, da população C1, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos	2	1869,531
Colônias	27	623,761**
Resíduo	54	253,722
Média		106,507
C.V. %		14,95

\*\* significativo ao nível de 1%



Apêndice 07. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AC para o experimento 7, da população C1, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos	2	689,968
Colônias	10	233,043**
Resíduo	20	36,198
Média		97,503
C.V.%		6,17

\*\* significativo ao nível de 1%

Apêndice 08. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AC para o experimento 1, da população C2, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos	2	10931,250
Colônias	22	2656,671**
Resíduo	44	191,426
Média		219,556
C.V.%		6,30

\*\* significativo ao nível de 1%

Apêndice 09. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AC para o experimento 2, da população C2, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos	2	18477,250
Colônias	24	3413,604**
Resíduo	48	515,302
Média		237,1278
C.V.%		9,57

\*\* significativo ao nível de 1%

Apêndice 10. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AC para o experimento 3, da população C2, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos	2	5727,750
Colônias	21	1717,929**
Resíduo	42	119,648
Média		190,169
C.V.%		5,75

\*\* significativo ao nível de 1%

Apêndice 11. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AC para o experimento 1, da população C3, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos	2	4333,750
Colônias	23	3160,902**
Resíduo	46	597,440
Média		183,650
C.V. %		13,30

\*\*significativo ao nível de 1%

Apêndice 12. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AC para o experimento 2, da população C3, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos	2	21946,13
Colônias	21	2682,405**
Resíduo	42	758,821
Média		217,977
C.V. %		12,63

\*\* significativo ao nível de 1%

Apêndice 13. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados de AC para o experimento 3, da população C3, segundo o delineamento em blocos casualizados, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

F.V.	G.L.	Q.M.
Blocos	2	19447,500
Colônias	23	2145,967 n.s.
Resíduo	46	1248,174
Média		194,969
C.V.%		18,12

n.s. não significativo