

ESTUDOS DE GENÉTICA CLÁSSICA NA LEVEDURA HALOTOLERANTE *Pichia sorbitophila* COMO BASE PARA O ESTABELECIMENTO DE UMA ESTRATÉGIA DE MUTAGÉNESE.

R. P. de Oliveira e C. Lucas

Univ. do Minho/ Departamento de Biologia, 4719 Braga Codex

Pichia sorbitophila é uma levedura halotolerante apresentando uma elevada capacidade de resistência a *stress* salino. Esta capacidade está ligada a, pelo menos, dois fenómenos já anteriormente caracterizados: a acumulação de elevadas concentrações intracelulares de glicerol como soluto compatível e a actividade de um sistema de simporte H⁺/glicerol membranar capaz de compensar a perda deste composto por lipossolubilidade. Como trabalho prévio à elaboração de uma estratégia de mutagénesse, foram executados estudos de genética clássica com vista à determinação do ciclo de vida desta levedura e posterior purificação da fase haplóide. Esporulação foi obtida e testada numa série de meios de esporulação convencionais e outros não convencionais, incluindo meios de *stress* salino, sendo as tétradas obtidas separadas por micromanipulação. Cada ascósporo foi posteriormente ensaiado quanto ao comportamento homo ou heterotático. Os resultados obtidos, sugerem um ciclo de vida composto por uma fase haplóide vegetativa intercalada por uma fase diplóide transiente, obtida, provavelmente, por conjugação entre célula mãe e gémula, precedendo a formação do asco. Assim, para assegurar haploidia nos ensaios de mutagénesse subsequentes, utilizou-se uma cultura pura obtida a partir de um ascósporo e mantida em meios que, segundo os ensaios realizados anteriormente, não permitem a esporulação. Optou-se por mutagénesse química, com Nitrosoguanidina, a 90% de morte e optimizaram-se centrifugações em gradiente de densidade de Percoll como técnica de enriquecimento de mutantes. Este tipo de centrifugação diferencial permitiu a separação de células crescidas na presença de elevadas concentrações de NaCl ou adaptadas a *stress* salino, de células potencialmente afectadas nos mecanismos de osmorregulação. Para a selecção de mutantes foram formulados novos meios selectivos, baseados nos mecanismos de resistência ao NaCl do selvagem. Todos os mutantes encontrados que exibiram um padrão de resistência a sal parcialmente afectado mostraram ter perdido a capacidade de transportar activamente o glicerol. Por outro lado, todas as células testadas com um padrão de resistência a sal inalterado, não apresentaram alterações na cinética de entrada de glicerol tritiado. É de salientar que os mutantes deficientes no transporte de glicerol assim obtidos, não perderam totalmente a capacidade de resistir à presença de NaCl, o que reforça a noção de que os sistemas de transporte activo constitutivos para solutos compatíveis são mecanismos indispensáveis para contribuir para elevada tolerância a sal em leveduras.