

**IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DO
GRUPO *Saccharomyces sensu stricto* POR PCR E
PCR-RFLP**

CLAUDINELLI GALVÃO

2004

57588

049285

CLAUDINELLI GALVÃO

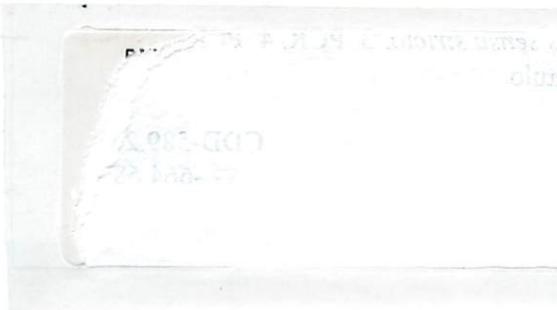
IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DO GRUPO *Saccharomyces sensu stricto* POR PCR E PCR-RFLP

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004



**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Galvão, Claudinelli

Identificação de leveduras do grupo *Saccharomyces sensu stricto* por
PCR e PCR-RFLP / Claudinelli Galvão. – Lavras : UFLA,
2004.

63 p. : il.

Orientador: Eustaquio de Souza Dias.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Identificação. 2. *Saccharomyces sensu stricto*. 3. PCR. 4. PCR-RFLP. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-589.233

-664.68

CLAUDINELLI GALVÃO

IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DO GRUPO *Saccharomyces sensu stricto* POR PCR E PCR-RFLP

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 05 de março de 2004

Profª. Dra. Rosane Freitas Schwan

UFLA

Prof. Dr. João Bosco dos Santos

UFLA


Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

DEDICATÓRIA

**Dedico à minha família e
a todos aqueles que
descobriram que o verdadeiro
sentido da vida é doar-se**

AGRADECIMENTO

Várias pessoas merecem minha gratidão por terem se comprometido com a elaboração do meu trabalho. Primeiramente, ao meu orientador Eustáquio e co-orientadora Rosane, que contribuíram com informações, sugestões e críticas.

Ao professor Romildo, pela atenção e convivência.

Aos funcionários Magda, Cidinha e Evani, meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos Cláudia Labory, Márcia, Éderson, Alexandre, Scheila Evânia, Euziclei, Mirian, Leidiane, Cláudia (Formiga), Cláudia Eugênia, Cris, Luana, Val e Halan, pela amizade, dedicação e disponibilidade.

Agradeço a compreensão incansável de Aramália, Fernanda e Lamartine, que me fizeram aprimorar a coerência e a qualidade geral do meu trabalho.

Aos meus pais e irmãs que me apoiaram e acreditaram no que eu estava realizando.

Ao apoio financeiro da Capes, sem o qual não atingiria o meu objetivo.

A Deus, presença sempre oculta e sempre clara que muito me incentivou.

Cada uma dessas pessoas que acreditou em mim. Sou-lhes grata por esta dedicação, amor e apoio.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 <i>Saccharomyces</i>	3
2.2 Importância das <i>Saccharomyces</i>	7
2.3 Identificação de leveduras	9
2.3.1 Características morfológicas	10
2.3.2 Testes bioquímicos e fisiológicos.....	10
2.3.3 Técnicas moleculares	13
2.3.3.1 Hibridização de ácidos nucleicos.....	14
2.3.3.2 Composição de bases de DNA	14
2.3.3.3 Sequenciamento de aminoácidos	15
2.3.3.4 RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)	15
2.3.3.5 PCR (reação em cadeia da polimerase).....	16
2.3.3.6 RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso).....	18
2.3.3.7 PCR-RFLP	19
2.3.3.8 Marcadores microssatélites.....	20
2.3.3.9 AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados)	20
2.3.3.10 Análise do DNA ribossomal.....	21
2.3.3.11 PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado)	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Espécies de <i>Saccharomyces</i>	28
3.2 Análise por PCR de leveduras do grupo <i>Saccharomyces sensu stricto</i>	30
3.2.1 Extração de DNA	31
3.2.2 Amplificação por PCR	31
3.3 Amplificação por PCR e análise por RFLP.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Análise por PCR de leveduras do grupo <i>Saccharomyces sensu stricto</i>	35
4.2 Polimorfismo no espaçador interno transcrito (ITS) do DNA ribossômico.	46
5 CONCLUSÕES.....	56
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

RESUMO

GALVÃO, Claudinelli. **Identificação de leveduras do grupo *Saccharomyces sensu stricto* por PCR e PCR-RFLP.** 2004. 63p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de diferenciar leveduras do grupo *Saccharomyces sensu stricto* por meio de técnicas moleculares como PCR e PCR – RFLP. Foram estudadas e comparadas oito espécies de *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* e *S. uvarum*). Estas espécies fazem parte da coleção de linhagens do Laboratório de Fisiologia de Microrganismo do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foi possível, pela técnica PCR, utilizando os *primers* SCREC114, SCHO e LGHO, diferenciar espécies proximamente relacionadas, como *S. cerevisiae* de *S. paradoxus* e *S. cariocanus* de *S. paradoxus*. A análise destas espécies de *Saccharomyces* por PCR–RFLP da região 5.8S – ITS indicou que a combinação das endonucleases *HaeIII*, *RsaI* e *MspI* possibilita a discriminação de *S. bayanus*, *S. mikatae* e *S. cerevisiae*. As espécies *S. cariocanus*, *S. paradoxus* e *S. kudriavzevii* não foram distinguidas com as enzimas citadas acima. Os isolados identificados como *S. pastorianus* e *S. uvarum*, utilizados neste trabalho, apresentaram comportamento idêntico a *S. cerevisiae* com as duas técnicas utilizadas. Esses resultados permitem inferir que estes isolados pertencem, na verdade, à espécie *S. cerevisiae*.

* Comitê orientador: Eustáquio Souza Dias – UFLA (Orientador), Rosane Freitas Schwan - UFLA

ABSTRACT

GALVÃO, Claudinelli. **Identification of yeasts of the *Saccharomyces sensu stricto* group by PCR and PCR-RFLP** Lavras: UFLA, 2004. 63p. (Dissertation – Master in Agricultural Microbiology)*

The aim of this work was to use molecular techniques such as PCR and PCR-RFLP to distinguish yeasts of the *Saccharomyces sensu stricto* group. Eight species of *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* and *S. uvarum*) were investigated. These isolates belong to the collection of the Microbial Physiology Lab of the Federal University of Lavras/DBI. It was possible using PCR technique with the SCREC114, SCHO and LGHO primers to distinguish closely related species such as *S. cerevisiae* from *S. paradoxus* and *S. cariocanus* from *S. paradoxus*. The analysis of these species of *Saccharomyces* by PCR – RFLP of the 5.8S – ITS region pointed out that the combination of the HaeIII, RsaI and MspI endonucleases enables the discrimination of the *S. bayanus*, *S. mikatae* and *S. cerevisiae*. The species *S. cariocanus*, *S. paradoxus* and *S. kudriavzevii* were not distinguished through the enzymes above mentioned. The isolates identified as *S. pastorianus* and *S. uvarum*, utilized in this work, presented behaviour identical to that of *S. cerevisiae* in both techniques employed. These results enable to infer that these isolates belong, as a matter of true, to the species *S. cerevisiae*

* Guidance Committe: Eustáquio Souza Dias – UFLA (Adviser), Rosane Freitas Schwan - UFLA

1 INTRODUÇÃO

A dinâmica das espécies de leveduras durante as fermentações alcoólicas interfere na qualidade da composição química e sensorial do vinho produzido. Considerando que fato semelhante também se observa para aguardente, é de grande importância determinar com rapidez as espécies de leveduras selvagens que predominam em cada região produtora, para que, em casos de problemas, possam ser adotadas soluções no menor tempo possível, diminuindo os prejuízos.

Quando ocorre contaminação por bactérias nas fermentações com leveduras selecionadas, o controle é relativamente fácil. Este controle torna-se difícil quando microrganismos contaminantes são filogeneticamente similares àqueles utilizados industrialmente. A contaminação por leveduras selvagens constitui-se, portanto, um problema para a produção de cerveja, vinhos e álcool combustível.

Dessa forma, sabendo da importância e da necessidade da identificação de microrganismos contaminantes no processo fermentativo, fica claro que é imprescindível o emprego de métodos e técnicas que venham a viabilizar esta tarefa.

{ As leveduras são comumente identificadas por testes fisiológicos e, mais recentemente, por testes moleculares. Métodos baseados no fenótipo incluem reações de fermentações com um grupo selecionado de açúcares e crescimento em diversas fontes de carbono e nitrogênio. }

As características das colônias, a aparência das células ao microscópio e o comportamento sexual são também usados, pois dão vestígio da espécie.

{ Métodos moleculares para identificação de leveduras incluem hibridização de DNA nuclear, seqüenciamento de genes e reação PCR amplificando uma região específica. }

A identificação baseada no DNA é mais segura que nos testes bioquímicos. Entretanto, na ausência de comparações moleculares, é possível chegar a uma identificação satisfatória baseada no fenótipo.

Os testes bioquímicos e morfológicos que se originam dos resultados de identificação das chaves baseiam-se na observação e análise do fenótipo, enquanto que as técnicas de biologia molecular, como a PCR, possibilitam a detecção de diferenças moleculares que, embora possam alterar o genótipo dos indivíduos, nem sempre causam alterações significativas no fenótipo dos mesmos.

Este trabalho teve como objetivo diferenciar leveduras do grupo *Saccharomyces sensu stricto* por meio das técnicas moleculares PCR e PCR-RFLP.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Saccharomyces*

As leveduras são fungos unicelulares, pertencentes às divisões Ascomycota e Basidiomycota. Suas células vegetativas são circulares, ovais ou cilíndricas. Da mesma forma que os fungos filamentosos, as leveduras são amplamente distribuídas na natureza, podendo estar presentes em folhas, flores, frutos, grãos de cereais e outros substratos contendo açúcares (Tortora et al., 2002).

Algumas leveduras, como as pertencentes ao gênero *Schizosaccharomyces*, multiplicam-se por fissão binária. Durante a fissão binária, as células parentais se alongam, seus núcleos se dividem e duas células filhas são produzidas (Tortora et al., 2002).

As leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* multiplicam-se assexuadamente por brotamento e dividem-se formando células desiguais. O brotamento ocorre em muitos locais da superfície da célula (Tortora et al., 2002).

A esporulação constitui uma fase do ciclo sexual das leveduras, que consiste numa alternância da condição haplóide (n) e da condição diplóide ($2n$). Elas são predominantemente diplóides em condições ideais e haplóides em condições de *stress* (Barnett, 1992; Tortora et al., 2002).

A formação de esporos sexuados é de grande significado biológico, pois permite às espécies passarem por recombinações, aumentando a variabilidade genética (Barnett, 1992; Tortora et al., 2002).

Leveduras são microrganismos importantes na indústria de alimentos, pois contribuem positivamente no processamento e/ou amadurecimento do vinho, pão e certos queijos. As espécies de leveduras mais utilizadas

industrialmente pertencem ao grupo *S. cerevisiae*. O gênero *Saccharomyces* tem suportado inúmeras mudanças durante 150 anos de história.

Segundo Gouliamova & Hennerbert (1998), Meyen introduziu, em 1838, o nome genérico *Saccharomyces*, chamando a levedura da cerveja *Saccharomyces cerevisiae*.

Guilliermond (1912), citado por Vaughan–Martini et al. (1993), incluiu no gênero *Saccharomyces* 46 espécies divididas em 6 grupos, com base na atividade fermentativa de mono e dissacarídeos. O grupo *S. cerevisiae* incluía 21 espécies relacionadas pela ampla capacidade fermentativa e suas ocorrências na fabricação de vinho e cerveja.

Lodder Kreger-van Rij (1952), citados por Gouliamova & Hennerbert (1998), incorporaram, dentro do gênero *Saccharomyces*, leveduras do gênero *Zygosaccharomyces*, *Torulaspota* e *Debaryomyces*.

Nos 18 anos seguintes, foi estabelecida uma clara definição de *Saccharomyces*, tendo como critério presença e persistência de ascos, atividade fermentativa e assimilação de nitrato negativa. Estas foram designadas características de importância primária para inclusão neste gênero (Vaughan–Martini et al., 1993).

Van der Walt (1970), citados por Gouliamova & Hennerbert (1998), dividiu o gênero em 4 grupos: grupo I – *Saccharomyces sensu stricto* (*S. cerevisiae* e 20 espécies associadas); grupo II – *Zygosaccharomyces*; grupo III – *Torulaspota* ou *Debaryomyces*; grupo IV – *Saccharomyces sensu lato*.

Posteriormente, observou-se que nem sempre poucas diferenças fisiológicas acarretavam em espécies diferentes. Com estas observações e a introdução de novos métodos discriminativos, houve uma redução drástica no número de espécies do gênero *Saccharomyces* (Barnett, 1992).

Como um exemplo clássico, Yarrow (1984) reduziu o gênero em 7 espécies. O grupo *Saccharomyces sensu stricto* anteriormente possuía 21

espécies e foi reduzido para uma: *Saccharomyces cerevisiae*. No grupo II e III, treze espécies foram incorporadas dentro de gêneros restabelecidos: *Zygosaccharomyces* e *Torulaspora*. O grupo IV foi reduzido de 8 para 5 espécies e *S. kluyveri* foi mantida como uma espécie separada.

Vaughan-Martini & Kurtzman (1985), em estudos de hibridização de ácidos nucleicos, discordaram em parte da proposta estabelecida por Yarrow (1984). Do ponto de vista taxonômico, espécies *sensu lato* foram confirmadas. O contrário ocorreu para o grupo *sensu stricto*. Numerosas espécies agrupadas por Yarrow como *S. cerevisiae* podem ser separadas em 4 espécies (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus* e *S. paradoxus*).

A separação efetiva de *Saccharomyces sensu stricto* tem sido complicada porque essas espécies freqüentemente têm nichos ecológicos similares, fenótipos aparentemente idênticos, mas apresentam genótipos distintos (Barnett, 1992; Vaughan-Martini, 1993; Gouliamova & Hennebert, 1998).

Kurtzman & Robnett (1991), estudando parte da seqüência do rRNA, dividiram o gênero em 3 grupos: grupo I – *Saccharomyces sensu stricto* (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus*); grupo II – *Saccharomyces sensu lato* (*S. dairensis*, *S. castellii*, *S. exiguus*, *S. servazzii*, *S. unisporus*) e grupo III – *S. kluyveri*.

A *S. kluyveri* é a mais distante, entre as espécies de *Saccharomyces*, da *S. cerevisiae*, baseada na seqüência do rRNA, sendo, portanto, considerada um membro afastado de *Saccharomyces* (Kurtzman & Robnett, 1991).

Freqüentemente ocorrem propostas de inclusão de novas espécies no gênero *Saccharomyces*. Vaughan-Martini (1995) descreveu duas novas espécies de *Saccharomyces sensu lato* (van der Walt), nomeadas como *Saccharomyces barnetti* e *Saccharomyces spencerorum*. James et al. (1997) descreveram duas novas espécies *Saccharomyces sensu lato*: *Saccharomyces kumashirensis* e

Saccharomyces martiniae. Naumov et al. (1995a; 1995b; 1996; 2000) citaram três novas espécies biológicas do grupo *S. sensu stricto*. Duas foram isoladas no Japão (*Saccharomyces mikatae* e *Saccharomyces kudriavzevii*) e uma no Brasil (*Saccharomyces cariocanus*). Estes isolados apresentaram o mesmo modelo de cariótipo do grupo *sensu stricto*, mas, quando foram cruzados com as espécies já conhecidas deste grupo (*S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *S. paradoxus*), deram híbridos estéreis, rendendo ascospóros não viáveis. Portanto, estes três novos isolados não poderiam ser nomeados como espécies conhecidas do grupo *sensu stricto*, sendo então consideradas três novas espécies.

Com estudos de seqüenciamento nas regiões espaçadoras ITS1/ITS2 e do gene do rRNA 18S, concluiu-se que estes novos isolados pertencem a espécies diferentes. As espécies *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. cariocanus*, juntamente com *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus* e *S. paradoxus*, são filogeneticamente separadas de todas as outras espécies de *Saccharomyces* e de outras espécies não *Saccharomyces* examinadas, formando assim um grupo de espécies distintas (Naumov et al., 2000).

As espécies do grupo *S. sensu stricto* podem ser encontradas nos processos fermentativos, solos não cultivados, insetos (*Drosophila*) e exsudatos de árvores. Naumov (1992a; 1996a) reidentificou espécies selvagens de *S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *S. paradoxus* isoladas de árvores e de *Drosophila* na América do Norte e nos solos europeus.

Entre as espécies do grupo *sensu stricto*, a *S. paradoxus* selvagem é mais comum, sendo encontrada na natureza da Europa Oriental e Ocidental (Naumov, 1992a) e em escoriações de árvores na América do Norte (Naumov et al., 1996a; 1998).

Segundo Morais et al. (1992), a maioria das leveduras associadas com *Drosophila* da Floresta Tropical é similar às comunidades de leveduras encontradas nas frutas e outros substratos fermentáveis, o que leva a concluir

que cada espécie de *Drosophila* transmite espécies de leveduras diferentes e esta comunidade é influenciada pelo local de isolamento.

2.2 Importância das *Saccharomyces*

As *Saccharomyces* podem utilizar o oxigênio ou um componente orgânico comoceptor final de elétrons. Se for dado acesso ao oxigênio, as leveduras respiram aerobicamente para metabolizar hidratos de carbono formando água e dióxido de carbono. Na ausência de oxigênio, elas fermentam os hidratos de carbono formando etanol e dióxido de carbono. Esta fermentação é usada na fabricação de cerveja, do vinho e nos processos de panificação (Tortora et al., 2002).

Durante a fermentação do suco de uva, as leveduras utilizam açúcares e outros constituintes como substrato para seu crescimento, convertendo-os em etanol, dióxido de carbono e outros produtos metabólicos finais que contribuem na composição química e na qualidade sensorial do vinho produzido (Querol et al., 1996).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada em fermentações industriais, como na panificação e na produção de bebidas fermentadas, além de servir como ferramenta para estudos de manipulação genética e fusão de protoplastos (Kurtzman & Fell, 1998).

A utilização de *S. cerevisiae* em processos de fermentação alcoólica é muito ampla, sendo naturalmente selecionada, pois suporta níveis elevados de etanol (12 a 15%), hidrolisa mono, di e trissacarídeos em etanol e também tolera alta concentração de açúcar e baixos valores de pH (Belin, 1995).

Outra característica associada à *S. cerevisiae* é a capacidade de competição no meio fermentativo, uma vez que esta levedura produz a toxina *killer*, capaz de eliminar naturalmente os microrganismos competidores por substrato (Kurtzman & Fell, 1998).

Muitos fabricantes de vinho usam culturas de *Saccharomyces cerevisiae* pura, geralmente isoladas da própria região, para produzir vinho de maior qualidade. A fermentação natural é um processo complexo, durante o qual é possível observar substituições seqüenciais de diferentes isolados. Porém, na fermentação inoculada, a linhagem de levedura selecionada claramente domina o processo. Esta simplificação microbiológica permitiu um avanço na biotecnologia, pois abriu caminho para a modificação genética de leveduras e, desse modo, a construção de linhagem que expressa atividade metabólica com efeito positivo nas características organolépticas do vinho produzido (Querol et al., 1996).

As leveduras do gênero *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*) são predominantes na superfície da uva. Sendo assim, representam a maior porcentagem das espécies presentes no primeiro dia de uma fermentação natural. Após três ou quatro dias de fermentação, ocorre um aumento na concentração de etanol produzido pelas leveduras com alta atividade fermentativa e, nesta etapa, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* começa a predominar e torna-se responsável pela fermentação alcoólica (Guillamóm, 1998).

A composição e a evolução das espécies de leveduras não *Saccharomyces*, durante a fase inicial da fermentação, são influenciadas pelas características geográficas e climatológicas e pelos procedimentos de fabricação de vinho (Querol et al., 1996).

A habilidade de crescer bem a baixas temperaturas (abaixo de 30°C) é uma propriedade das espécies *S. uvarum* e *S. bayanus*. Essas espécies criotolerantes mostram os mesmos traços que *S. cerevisiae*, como fermentação vigorosa num limite de temperatura entre 12-30° C, tolerância alcoólica, tipo de crescimento e produção ou não produção de H₂S. A maioria delas possui sensibilidade ao SO₂, podem ser usadas na fermentação alcoólica numa temperatura inferior a 10°C e baixa capacidade de produção do ácido acético.

Devido à baixa produção de ácido acético, elas podem ser usadas na produção de vinhos de boa qualidade (Castellari et al., 1992).

A medida de densidade óptica (420nm) no vinho filtrado mostrou que isolados criotolerantes exercem um efeito maior na descoloração e estabilização do vinho branco quando comparado à *S. cerevisiae* (Castellari et al., 1992).

As espécies de *Saccharomyces* que fermentam a melibiose, quando isoladas na fabricação do vinho, pertencem, na sua maioria, à espécie biológica *S. bayanus*. Entre as 21 espécies do grupo *sensu stricto* isoladas de regiões da França e Itália, somente duas foram geneticamente identificadas como *S. cerevisiae*, sendo as restantes designadas *S. bayanus* (Naumov, 1993).

No entanto, segundo Naumov (1993), o fenótipo Mel⁻ não pode ser usado para diferenciar *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, pois linhagens de *S. cerevisiae* (Mel⁺) podem ser encontradas no vinho.

A espécie biológica *S. bayanus* é encontrada na vinicultura e em fabricações de vinhos a baixas temperaturas. A distribuição dessa espécie na natureza tem sido pouco estudada. Raras espécies selvagens foram isoladas do cogumelo *Amanita citrina*, na região da Eslováquia e de *Drosophila*, na região da Califórnia (Naumov, 1992a; 1996a).

2.3 Identificação de leveduras

Nas fermentações industriais é imprescindível manter a pureza dos inóculos para assegurar os níveis de produtividade e qualidade do produto. A identificação precoce de microrganismos contaminantes, em muitos casos, contribui para evitar perdas consideráveis.

Segundo Kreger-van-Rij (1984), as metodologias aplicadas para a identificação de leveduras envolvem procedimentos como isolamento do ambiente natural, determinação pelos métodos tradicionais como os testes bioquímicos e fisiológicos e métodos moleculares. O conjunto de dados obtidos,

obedecendo rigorosamente a protocolos padronizados, resulta na identificação e no posicionamento taxonômico da levedura.

2.3.1 Características morfológicas

O gênero *Saccharomyces* possui células vegetativas circulares, ovais ou cilíndricas. Essas leveduras são não filamentosas e predominantemente diplóides. Espécies *Saccharomyces* possuem ascos persistentes e contêm, usualmente, de um a quatro ascósporos. Esses ascósporos são circulares ou levemente ovais e apresentam paredes lisas (Barnett, 1992).

As características morfológicas das colônias de leveduras e os aspectos das células ao microscópio nem sempre fornecem dados seguros para identificação da espécie de levedura. As condições do meio de crescimento podem alterar as características das colônias e das células (Barnett, 1992).

2.3.2 Testes bioquímicos e fisiológicos

Testes bioquímicos são freqüentemente utilizados para identificar bactérias e leveduras porque espécies diferentes produzem enzimas diferentes (Tortora et al., 2002).

Tipos de testes bioquímicos:

- teste de fermentação: a identificação baseia-se na capacidade das leveduras em fermentar certos açúcares. A caracterização da fermentação em tubos de *Durham* como vigorosa, boa, lenta ou fraca depende da taxa de fermentação avaliada e da quantidade de gás formada no interior do tubo. As leveduras apresentam uma grande variação na habilidade de fermentar açúcares. Alguns açúcares, como a glicose, a frutose e a manose, são assimilados por quase todas as espécies, enquanto alguns oligossacarídeos, polissacarídeos, álcoois primários, polióis, ácidos orgânicos, pentoses, trioses, hidrocarbonetos e

lipídeos são utilizados seletivamente por algumas espécies (Kreger-van Rij, 1984; Barnett et al., 2000);

- utilização de nitrato: normalmente, as leveduras são capazes de assimilar amônia, mas nem sempre assimilam nitratos, nitritos, amins ou alguns aminoácidos (Kreger-van Rij, 1984; Barnett et al., 2000);
- crescimento em temperaturas elevadas, em meios com altos teores de açúcares ou cloreto de sódio (Kreger-van Rij, 1984; Barnett et al., 2000);
- requerimento de vitaminas (Kreger-van Rij, 1984; Barnett et al., 2000);
- susceptibilidade à cicloheximida (Kreger-van Rij, 1984; Barnett et al., 2000).

Apesar da taxonomia convencional ser bastante eficiente e de grande importância, os testes requerem muito tempo de trabalho e nem sempre a reprodutibilidade é mantida (Belin, 1995). Uma limitação destes testes bioquímicos é que mutações podem resultar em linhagens com diferentes características. A menos que um grande número de testes seja utilizado, um organismo pode ser identificado de maneira incorreta. Além disso, a assimilação destes compostos pode ser controlada por um ou mais genes, o que pode acarretar uma identificação errônea dos resultados, uma vez que esses genes podem não estar sendo expressos (Rosini et al., 1982). Portanto, as características fenotípicas refletem a adaptação das linhagens nas condições ambientais locais, mas não necessariamente seu *status* taxonômico (Montrocher et al., 1998).

A característica fisiológica mais surpreendente das espécies de *Saccharomyces* é a capacidade de fermentar um ou mais açúcares para produzir etanol. Exceto no caso de certos mutantes, estes açúcares incluem D-glucose, D-fructose e D-mannose. As *Saccharomyces* não utilizam o citrato e nitrato como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente (Barnett, 1992).

Vaughan-Martini et al. (1993) analisaram características fisiológicas de 86 isolados de 10 espécies reconhecidas do gênero *Saccharomyces*, para estabelecer uma chave taxonômica de confiança. Seus resultados mostraram que foi possível distinguir claramente as espécies *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. kluyveri*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. servazzii* e *S. unisporus*. Algumas dificuldades foram encontradas na classificação de *S. dairensis* e *S. exiguus*.

A divisão das espécies do grupo *S. sensu stricto* foi observada com técnicas moleculares, tornando-se possível determinar reações fisiológicas necessárias para separar as espécies. A temperatura máxima de crescimento permite diferenciação entre *S. bayanus/S. pastorianus*, que nunca crescem acima de 34°C e *S. cerevisiae/S. paradoxus*, que crescem a 37°C e, muitas vezes, a 40–42°C. A *S. bayanus* é a única entre as espécies de *Saccharomyces* que cresce em meio sem suprimento vitamínico. A *S. cerevisiae* pode ser separada da *S. paradoxus* considerando o crescimento em D-manitol. *S. cerevisiae* não cresce em D-manitol como fonte de carbono. Já *S. paradoxus*, cresce em D-manitol como fonte de carbono. O grupo *S. sensu stricto* pode também ser dividido em dois grupos, tendo como base o sistema de transporte da frutose. *S. bayanus/S. pastorianus* possuem sistema de transporte ativo e *S. cerevisiae/S. paradoxus* não possuem esta habilidade (Vaughan-Martini et al., 1993).

Resultados de vários estudos demonstraram que características fisiológicas, tradicionalmente importantes para separar isolados de *Saccharomyces*, podem não ser proveitosas para distinção deste grupo (Barnett, 1992; Vaughan-Marini et al., 1993; Naumov, 1996; Barro Lopes, 1998).

Apesar de terem seqüência do gene do rRNA 18S idêntica, as duas espécies japonesas (*S. mikatae* e *S. kudriavzevii*) podem ser distinguidas com base nos perfis fisiológicos. Por exemplo, *S. mikatae* fermenta D-galactose e melibiose e cresce em maltose, trealose (positivo demorado) e melibiose (positivo demorado). Já *S. kudriavzevii* não possui estas habilidades. Embora *S.*

cariocanus tenha mostrado ser proximamente relacionada a *S. paradoxus*, com base na seqüência da região ITS1 essa espécie pode ser distinguida da *S. paradoxus* pela sua incapacidade de crescer em maltose, trealose, ribitol e α -metil-D-glucosidase (Naumov et al., 2000).

No grupo *S. sensu lato*, as espécies *S. dairensis* e *S. castellii* não podem ser distinguidas por critérios fisiológicos convencionais, tornando necessária a utilização da taxonomia molecular para a sua distinção (Barnett, 1992; Vaughan-Marini & Martini, 1993).

As espécies *S. servazzii* e *S. unisporus* crescem em 1000 ppm de cicloheximida e possuem baixo perfil fermentativo. Podem ser separadas pela assimilação de etilamina-HCl, cadaverina e lisina. *S. servazzii* não assimila etilamina-HCl, cadaverina e lisina como fonte de nitrogênio, ao contrário de *S. unisporus* (Barnett, 1992; Vaughan-Marini et al., 1993).

As espécies *S. exiguus*, *S. servazzii* e *S. unisporus* crescem em 100 ppm de cicloheximida e possuem baixo porcentual em mol de citosina e guanina (Barnett, 1992; Vaughan-Martini et al., 1993).

A *S. kluyveri* utiliza etilamina-HCl, cadaverina e lisina como fonte de nitrogênio sendo uma das poucas espécies de *Saccharomyces* que assimilam e fermentam a melibiose (Vaughan-Marini et al., 1993).

2.3.3 Técnicas moleculares

Com o desenvolvimento da biologia molecular, várias técnicas têm sido desenvolvidas com o objetivo de permitir a diferenciação de espécies ou de linhagens da mesma espécie.

Estes métodos moleculares são mais precisos e objetivos quando comparados com os testes tradicionais. Métodos baseados no DNA têm a vantagem de serem independentes da expressão dos genes (Vazquez et al., 2003).

Entre outras técnicas moleculares, temos: hibridização de DNA, conteúdo de guanina e citosina do DNA nuclear (% G + C), análise do RNA ribossomal, determinação da seqüência de aminoácidos de enzimas, marcadores moleculares (RFLP, PCR, RAPD, PCR-RFLP) e PFGE. Todas essas técnicas auxiliam na busca de uma classificação mais natural baseada na filogenia.

2.3.3.1 Hibridização de ácidos nucleicos

DNA que tem aproximadamente 80% ou mais de similaridade nucleotídica pode formar *duplex* (Kurtzman & Fell, 1998). Quanto maior a quantidade de pareamento entre as fitas de DNA de diferentes organismos (hibridização), mais intimamente relacionados estão os organismos. Quando ocorre hibridização completa, os organismos são idênticos. Em uma hibridização parcial, os organismos são relacionados e com nenhuma hibridização os organismos não são relacionados (Tortora et al., 2002).

Oda et al. (1999), considerando a região do espaço interno transcrito localizada entre os genes da subunidade menor e subunidade maior do rRNA, descreveram que a homologia de seqüência de DNA é empregada como um critério para delimitar espécies. Quando dois isolados mostram 80-100% de homologia nesta região, são considerados da mesma espécie. O valor de homologia entre espécies diferentes é geralmente menor que 30% e a relação de níveis intermediários (50-70%) não é bem esclarecida.

2.3.3.2 Composição de bases de DNA

A determinação da composição de bases do DNA nuclear, normalmente expressa como a porcentagem de guanina + citosina (% G + C), tem sido o primeiro método molecular aplicado para taxonomia de leveduras (Kurtzman & Fell, 1998).

Este método apresenta uma boa capacidade de, pelo menos, sugerir a existência de relações evolutivas. A composição de bases de uma espécie é, teoricamente, uma propriedade fixa; logo, uma comparação dos conteúdos de G + C em diferentes espécies pode revelar o grau de parentesco das espécies (Tortora et al., 2002). Dentre as espécies de *Saccharomyces*, *S. exiguus*, *S. servazzii* e *S. unisporus* apresentam uma menor porcentagem molar G + C (Vaughan-Martini et al., 1993). O conteúdo nuclear G + C das leveduras ascomicetos varia de 27% a 50%, enquanto que, para as leveduras basidiomicetos, esta extensão é de 50% a 70 % (Kurtzman & Fell, 1998).

2.3.3.3 Sequenciamento de aminoácidos

Quanto maior o tempo de evolução entre dois organismos, maior será o número de modificações na seqüência de DNA (mutações) que codifica a mesma proteína nos dois organismos. Portanto, a comparação de seqüência dos aminoácidos de proteínas de dois organismos diferentes pode auxiliar na determinação da similaridade entre as seqüências de DNA e também das relações evolutivas das espécies. Quanto mais similares as proteínas, mais intimamente relacionados são os organismos (Tortora et al., 2002).

2.3.3.4 RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)

O marcador RFLP é baseado na homologia de seqüência dos fragmentos de DNA. O polimorfismo é evidenciado pela fragmentação do DNA por enzimas de restrição (sítios de restrição) e observado por hibridização com uma seqüência clonada de DNA marcada com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência (sonda) (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica RFLP apresenta a vantagem de cobrir todo o genoma do organismo estudado e várias enzimas de restrição podem ser utilizadas,

combinadas com um número quase irrestrito de seqüências clonadas, gerando uma enorme quantidade de marcadores (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A inexistência de uma biblioteca de sondas disponíveis é uma limitação desta técnica. Somente depois da obtenção de sondas adequadas, processo que leva em geral vários meses, é possível iniciar qualquer tipo de análise genética com RFLP. Além disso, o uso de RFLP requer pessoal técnico habilitado para a manipulação de DNA recombinante e, no caso do uso de ^{32}P , de instalações adequadas ao manuseio e descarte do material radioativo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

2.3.3.5 PCR (reação em cadeia da polimerase)

PCR é uma técnica que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Cada ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla de DNA alvo é desnaturada pela elevação da temperatura a 94°C. No anelamento, a temperatura é reduzida, ocorrendo hibridização DNA-DNA de cada *primer* (iniciador) com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Na terceira etapa, eleva-se a temperatura para 72°C para que a DNA polimerase realize a extensão com a adição de nucleotídeos, utilizando como molde a seqüência alvo, a partir de cada terminal 3' do *primer* (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Quanto maior a temperatura de anelamento, mais específica será a hibridização do *primer* na região que flanqueia o DNA alvo (Alberts, 1999).

A facilidade, a rapidez, a versatilidade e a sensibilidade da PCR a tornam poderosa para estudos genéticos moleculares, envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Valente (1996), ao amplificar a região do espaço interno transcrito do rDNA por PCR, diferenciou grupos de leveduras do gênero *Saccharomyces*. O grupo *Saccharomyces sensu stricto* teve comprimento da região amplificada superior a 800 pb e os grupos *S. sensu lato* e *S. kluyveri* tiveram comprimento inferior a 800 pb.

Mendonça (1999) isolou leveduras do mosto de fermentação de 10 alambiques da região sul do estado de Minas Gerais com o objetivo de obter leveduras com boas características. Estas leveduras foram identificadas por técnicas tradicionais utilizando testes bioquímicos e testes moleculares por amplificação do DNA (PCR). Dos 387 isolados, 34% (132 leveduras) foram identificadas como pertencentes à espécie *S. cerevisiae* pela técnica tradicional. Utilizando a técnica molecular, foram identificados 41% (158 leveduras) como pertencentes à espécie *S. cerevisiae*.

Um novo método baseado em PCR tem sido desenvolvido para monitorar uma fermentação de vinho inoculada. O método é baseado na variação do número e posição dos *introns* do gene mitocondrial COX 1. *Primers* homólogos às regiões que flanqueiam o *intron* COX 1 em *S. cerevisiae* têm sido desenhados e testados na diferenciação de linhagens. Este método diferencia a linhagem de *S. cerevisiae* inoculada e as linhagens de *S. cerevisiae* selvagens presentes no mosto. A fermentação moderna tem utilizado uma linhagem *S. cerevisiae* seca ativa para assegurar a reprodutibilidade da fermentação e a qualidade do produto final. Nem sempre a levedura selecionada predomina do começo ao fim da fermentação. Por esta razão, um método simples e rápido que detecta se a levedura inicial permanece no processo fermentativo é útil para a atividade industrial (Lopes et al., 2003).

Existem algumas técnicas que são derivadas da PCR, como RAPD, PCR-RFLP e AFLP (Kurtzman & Fell, 1998), as quais são descritas a seguir.

2.3.3.6 RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso)

A técnica RAPD é também usada para a detecção de polimorfismos em microrganismos. Esta técnica utiliza *primers* únicos mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio da seqüência. Cada *primer* arbitrário dirige a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversos pontos do genoma, desde seqüência de cópia única até seqüências altamente repetitivas. O polimorfismo genético, detectado por RAPD, é de natureza binária, ou seja, o segmento amplificado está presente ou ausente. Logo, RAPD é um marcador genético dominante (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica RAPD reúne a simplicidade e a visualização direta dos marcadores isoenzimáticos com o poder de resolução dos marcadores de DNA. Esta técnica não requer o desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para o organismo de interesse. Um conjunto único de iniciadores arbitrários pode ser utilizado para qualquer organismo. Outra vantagem é a quantidade mínima de DNA necessária para a análise genotípica de um organismo. O custo da técnica RAPD é mais baixo do que a da técnica RFLP em termos de custo por dado genotípico, além de requerer um número bem menor de reagentes para a condução dos estudos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica RAPD tem mostrado grande potencial na detecção de polimorfismos de muitos microrganismos, porém, devido ao fato desta técnica não requerer conhecimento prévio da seqüência de DNA do organismo em estudo, é necessário que se teste um grande número de *primers* para, posteriormente, selecionar o que melhor detecte os polimorfismos de DNA. Esta técnica também apresenta uma outra desvantagem com relação à falta de repetibilidade de seus resultados (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

2.3.3.7 PCR–RFLP

Esta técnica consiste na digestão enzimática de segmentos amplificados por PCR. A associação é necessária para detectar polimorfismo adicional entre bandas monomórficas. Bandas monomórficas têm o mesmo tamanho em pares de bases e as mesmas seqüências nas extremidades onde o *primer* iniciou a amplificação. Entretanto, internamente, os segmentos podem apresentar diferenças pontuais em pares de bases que resultam na perda ou ganho de um sítio de restrição (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica PCR–RFLP, na região ITS1–5.8S–ITS2 de rDNA, é utilizada para separar os sete membros do grupo *sensu stricto*. Os resultados indicam que a combinação das endonucleases *Hae*III, *Hpa*II, *Scr*FI e *Taq*I possibilita a discriminação *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* e *S. mikatae*. *S. cariocanus* não pode ser distinguida da *S. paradoxus*, assim como *S. bayanus* da *S. pastorianus*, com base no modelo de restrição obtido com várias enzimas de restrição (Guillamón, 1998; Esteve-Zarzoso, 1999; Fernandez-Espinar, 2000; Naumova, 2003).

Vazquez et al. (2003) identificaram leveduras (*S. cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Clavispora lusitaniae*, *Trichosporon asahii*, *S. unisporus*, *Pichia anômala*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Hanseniaspora uvarum* e *Pichia fermentans*) presentes na fermentação espontânea do suco de laranja, usando PCR–RFLP na região ITS1-5.8S-ITS2 e seqüenciamento da região ITS.

Masneuf (1996) caracterizou várias leveduras das espécies *S. cerevisiae* e *S. bayanus* em vinho, usando PCR-RFLP do gene MET2. Estes isolados foram primeiramente identificados por experimentos de hibridização. Houve concordância entre os dois métodos para separar espécies de *S. bayanus* e *S. cerevisiae*, considerando todas as espécies analisadas.

2.3.3.8 Marcadores microssatélites

Nos marcadores microssatélites, a natureza da variação é o número de repetições que existem das unidades repetitivas. A estratégia para a análise é a amplificação do fragmento que contém as repetições, utilizando-se como *primers* oligonucleotídeos que hibridizam com as regiões que flanqueiam as repetições (Matioli, 2001).

Microssatélites são comuns nos genomas de fungos ascomicetos e basidiomicetos. Hantula et al. (1996) utilizaram espécies de *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* e *Ustilago maydis* para determinar a ocorrência de microssatélites no genoma de fungos. Sequências como GT, ACA, CCA e CGA foram altamente repetitivas nestes organismos e, a partir destas sequências, foi possível desenhar *primers* microssatélites que detectaram polimorfismo em vários fungos testados.

2.3.3.9 AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados)

Essa técnica permite que fragmentos anônimos do genoma sejam amplificados por PCR após terem sido originados pela digestão do genoma por enzimas de restrição. Essa técnica envolve as seguintes etapas: 1- digestão do genoma com enzimas de restrição; 2 – ligação de adaptadores aos fragmentos gerados e 3 – amplificação dos fragmentos a partir de *primers* que hibridizam com os adaptadores. A fase crítica diz respeito à qualidade do DNA utilizado e dos adaptadores para a reação de ligação (Matioli, 2001).

Segundo Perpéte (2001), a técnica AFLP permite identificar linhagens de leveduras de cervejaria. Ele observou que um único par de *primer* distinguiu muitas linhagens de leveduras e sugere que o uso de vários *primers* iria aumentar o polimorfismo observado por esta técnica. Seu resultado indicou que,

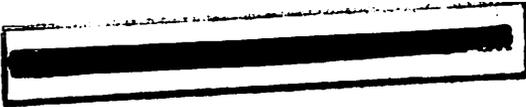
entre as 26 linhagens estudadas, existe uma proporção de similaridade para os fragmentos gerados de apenas 55%.

2.3.3.10 Análise do DNA ribossomal

Análises do DNA que codifica rRNA têm sido amplamente usadas em estudos taxonômicos, em função da presença dos ribossomos em todas as células dos organismos e por apresentarem uma origem evolucionária comum, provendo parte da história molecular de todos os organismos. Além disso, algumas seqüências do rDNA são conservadas e servem como pontos de referência que possibilitam o alinhamento de áreas menos conservadas usadas como medida de parentesco evolucionário (Kurtzman, 1992).

No genoma de *S. cerevisiae* são encontrados 4 genes rDNA (5S, 5.8S, 18S e 26S) que são agrupados em repetições formando um *cluster* simples no cromossomo XII. Os genes 18S e 26S são separados por regiões espaçadoras (espaço interno transcrito – ITS e espaço intergênico – IGS) que não codificam seqüências, exceto genes pequenos 5.8S e 5S, respectivamente. Ambas as seqüências espaçadoras podem facilmente ser amplificadas por PCR usando *primers* homólogos à seqüência presente no final dos genes rDNA (White et al., 1990; Kurtzman, 1992).

Os resultados de sequenciamento do rDNA demonstraram que os genes de rRNA da subunidade maior do ribossomo dos eucariotos estão estruturados como um mosaico de domínios conservados e variáveis. Esses domínios variáveis, ou inserções não conservadas, que não estão presentes nos genes de rRNA 23S dos procariontes, são denominados divergentes (D), variáveis (V) ou, ainda, segmentos de expansão. A referência a um determinado segmento de expansão faz-se sempre com uma numeração crescente, relativa à sua ordem de aparecimento a partir da extremidade 5' da molécula de rRNA. Assim, o segmento de expansão D1 será o primeiro domínio divergente próximo à



extremidade 5' da molécula de rRNA 25S – 28S, enquanto que o segmento de expansão D12 estará próximo à extremidade 3' da molécula (Matioli, 2001).

O domínio D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal (26S) contém 600–650 nucleotídeos, sendo uma região suficientemente divergente para analisar a maioria das espécies de leveduras. As análises destas seqüências predizem a relação filogenética que são similares aos resultados obtidos na análise de seqüenciamento da subunidade menor (18S) (Kurtzman & Fell, 1998).

O principal valor do seqüenciamento da região do rRNA 18S é para comparação filogenética, por não ter uma resolução suficiente para diferenciar espécies muito relacionadas como *S. cerevisiae*/*S. paradoxus*, *S. bayanus*/*S. pastorianus* e *S. kudriavzevii*/*S. mikatae* (James et al., 1997; Naumov et al., 2000).

Gouliamova & Hennebert (1998) analisaram a afinidade filogenética de espécies de *Saccharomyces* pela comparação da seqüência nucleotídica do domínio D2–25S rDNA e espaço interno transcrito ITS1–5.8S–ITS2 rDNA. Seus resultados, particularmente aqueles do espaço interno transcrito, confirmaram os sinônimos *S. cerevisiae*/*S. ellipsoideus*/*S. chevalieri* e *S. pastorianus*/*S. carlsbergensis* e distinguiu as espécies *S. paradoxus*, *S. bayanus* e *S. uvarum*.

A comparação das seqüências ITS1 e ITS2 das espécies *Saccharomyces sensu stricto* revelou que a região ITS1 exibe uma maior variação de seqüência quando comparada a ITS2. Desse modo, foi possível investigar o parentesco genealógico deste grupo baseado na seqüência ITS1. A espécie *S. cariocanus* é proximamente relacionada à *S. paradoxus* (CBS 432), formando um grupo distinto que é separado da *S. cerevisiae*. Considerando todas as espécies, *S. kudriavzevii*, *S. cariocanus*, *S. mikatae* junto com *S. cerevisiae* e *S. paradoxus* formam um grupo que é separado do par de espécies *S. bayanus*/*S. pastorianus* (Naumov et al., 2000).

Montrocher et al. (1998), analisando por PCR–RFLP os espaços ITS e IGS e seqüenciamento da região ITS, conduziu a uma divisão similar do grupo *Saccharomyces sensu stricto* que foi distribuído em dois subgrupos formados por *S. cerevisiae*/*S. paradoxus* e *S. pastorianus*/*S. bayanus*.

2.3.3.11 PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado)

A técnica de PFGE consiste na separação do DNA de acordo com o tamanho dos cromossomos. Dependendo do número e tamanho dos cromossomos presentes na espécie, um padrão específico de bandas será obtido.

Neste método de cariotipagem, a eletroforese é feita com a aplicação de uma força elétrica (campo elétrico) alternada ou contínua no gel de agarose, forçando o DNA a se reorientar a cada carga do campo. Moléculas longas podem levar mais tempo para se reorientar e, por essa razão, movem-se mais lentamente.

Apesar da alta diversidade dos genomas e isolamento reprodutivo, as seis espécies do grupo *sensu stricto* possuem características do cariótipo em comum, como, a mesma extensão de bandas cromossomais (de 245 a 2.200) e o mesmo número haplóide de cromossomos ($n = 16$). Duas espécies, *S. bayanus* e *S. cariocanus*, possuem cariótipo espécie-específico, enquanto os outros membros do grupo *sensu stricto* não podem ser distinguidos pelos seus modelos de bandas (Naumov, 1992b; 1996; 2000).

Isolados de *S. cerevisiae* cultivados usualmente apresentam polimorfismo de comprimento dos cromossomos (Veizinet et al., 1990; Masneuf, 1996) que permite a diferenciação intra-específica de várias linhagens. Este alto polimorfismo intra-específico observado é gerado, provavelmente, por deleções, inserções e translocações dos cromossomos, que são detectadas eletroforeticamente para espécies de *S. cerevisiae* utilizadas na atividade industrial (Guillámon, 1994).

O cariótipo de *S. cerevisiae* selvagem, de origens geográficas diferentes, exibe um menor polimorfismo cromossomal (Naumov et al., 1992a; Naumov et al., 1992b) e assemelha-se com o cariótipo de *S. paradoxus* (Naumov, 1992b; Naumov, 1996).

Naumov et al. (2001) classificaram 21 isolados de sidra e suco de maçã, utilizando técnicas moleculares como PCR e PFGE e determinaram predominância, na sidra, da linhagem *S. bayanus var uvarum*. Dos 21 isolados, somente três foram de *S. cerevisiae*.

O padrão de cariotipagem de *S. cerevisiae* é caracterizado pela presença de uma banda grande (1.600 kb) e três bandas menores (245–370 kb). *S. bayanus var uvarum* apresenta um padrão específico: ausência das bandas 1.600 kb e 290 kb e presença da banda cromossomal 1.300 kb (Naumov et al., 2001).

Masneuf et al. (1998) documentaram a origem híbrida da linhagem CIDI, de sidra, pois esta apresentou cromossomos de *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. Isto pode confirmar que a troca/permuta espontânea entre essas duas leveduras pode acontecer na natureza e nos processos biotecnológicos por elas realizados.

Giudici (1998) também analisou DNA cromossomal pela técnica PFGE, de uma espécie criotolerante, *S. bayanus* e uma espécie não criotolerante, *S. cerevisiae* e seus híbridos interespecífico e intra-específico. As linhagens criotolerantes e não criotolerantes geraram perfis eletroforéticos claramente distintos. Os híbridos criotolerantes x criotolerantes e não criotolerantes x não criotolerantes foram férteis e apresentaram o mesmo perfil eletroforético de seus parentais. Já híbridos criotolerantes x não criotolerantes foram estéreis (indicando que pertencem a espécies distintas) e deram perfis eletroforéticos com bandas de ambos parentais.

O híbrido intra-específico analisado mostrou o mesmo modelo de bandas das linhagens parentais, sugerindo que cromossomos homólogos providos das duas linhagens parentais possuem, no mínimo, o mesmo peso

molecular e resulta na formação de uma banda simples para cada par de cromossomos do híbrido. O híbrido interespecífico tem um perfil eletroforético aditivo. Na prática, o perfil mostrou-se como uma associação dos 13 cromossomos típicos de *S. cerevisiae* e 5 cromossomos que caracterizam *S. bayanus* criotolerantes e que, normalmente, estão ausentes em *S. cerevisiae*. Esses resultados mostram uma afinidade genética entre os dois tipos de espécies na produção de híbridos, mas não o bastante para produzir descendentes férteis (Giudici, 1998).

Vaughan-Martini & Kurtzman (1985) demonstraram que *S. pastorianus* Hansen (= *S. carlsbergensis*) é um híbrido natural entre *S. cerevisiae* x *S. bayanus*, não sendo assim uma espécie biológica.

A espécie biológica *S. bayanus* cresce a 1°C/2°C e não cresce acima de 35°C. Já *S. cerevisiae* apresenta um comportamento diferente, pois não cresce a 1°C/2°C e cresce a 35°C e, freqüentemente, a 40–42°C. A *S. bayanus* apresenta, quando comparada a *S. cerevisiae*, maior velocidade fermentativa a baixas temperaturas (7°C) e redução no rendimento de etanol em temperaturas intermediárias (22 – 30°C) (Kishimoto & Goto, 1995).

O perfil fermentativo do híbrido *S. bayanus* e *S. cerevisiae* é interessante, pois, híbridos possuem temperatura ótima numa extensão entre as temperaturas ótimas de seus parentais e crescem bem a baixas temperaturas (6°C) e altas temperaturas (37°C) (Giudici, 1998).

Todas as seis espécies incluídas no grupo *Saccharomyces sensu stricto* podem facilmente ser cruzadas em qualquer combinação. Os híbridos interespecíficos formados são estéreis, tendo ascósporos não viáveis. Já híbridos intra-específicos são férteis e produzem ascósporos altamente viáveis (Naumov, 1992a, Naumov, 1992b; Naumova, 2003).

Durante o cruzamento de leveduras, o DNA nuclear é herdado de ambos os parentais. Já o DNA mitocondrial exhibe herança não mendeliana, ou seja, na

progênie, somente um parental doa mtDNA ou ocorre uma recombinação, sendo que o mtDNA da progênie difere de ambos os parentais. Isto foi observado por Masneuf (1998), que analisou o genoma mitocondrial de isolados híbridos entre *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. O gene mitocondrial OLII de um isolado de vinho mostrou-se idêntico ao gene de *S. cerevisiae*. O outro isolado de sidra apresentou um modelo divergente de *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. Esses resultados mostram que as moléculas de DNA dos dois isolados híbridos são diferentes e, provavelmente, tiveram origens diferentes.

Guillamón (1994), analisando polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição do DNA mitocondrial, sugeriu que o genoma mitocondrial de *S. pastorianus* foi herdado de *S. bayanus*, devido às similaridades de seus modelos de restrição do mtDNA.

Com os métodos moleculares PCR e PFGE, Fialho (2000) diferenciou linhagens de uma mesma espécie que apareceram durante o processo de fermentação alcoólica e acompanhou, durante este mesmo processo, a evolução da levedura inoculada (CA116 – UFLA/1997): se esta permanece durante todo o processo fermentativo ou é substituída por uma linhagem mais resistente. Nesse trabalho, foram identificadas 132 leveduras pela técnica de PCR e foram confirmadas 43% como sendo *S. cerevisiae*. Com a técnica de PFGE, foi verificada a identidade dos isolados de *S. cerevisiae* por meio do polimorfismo cromossômico. Em todas as *S. cerevisiae* analisadas, foram observados o mesmo número e posição das bandas coincidentes com a CA116 inoculada, confirmando que esta linhagem persiste durante todo o processo fermentativo.

Barro Lopes et al. (1998), utilizando o *primer* EH, que tem como alvo regiões variadas do genoma, executaram um agrupamento rápido de isolados com genomas relacionados. Discrepâncias entre métodos moleculares e fisiológicos foram observadas. Isolados identificados fenotipicamente como *S. cerevisiae*, quando submetidos a PCR, produziram *fingerprints* característicos de

S. bayanus. O mesmo ocorreu para isolados de vinhos, identificados por métodos tradicionais como *Rhodotorula mucilaginosa*. Estes isolados produziram *fingerprints* diferentes, sendo que nenhum se assemelhou com o *fingerprint* da linhagem *R. mucilaginosa*.

Com o propósito de explicar a posição taxonômica de leveduras presentes na cerveja de regiões de Ghana e Burkina Faso da África, Naumova (2003) comparou 24 isolados fenotipicamente diferentes com culturas típicas das seis espécies do grupo *sensu stricto* e do híbrido *S. pastorianus*. Na análise PCR-RFLP da região ITS, utilizando cinco endonucleases, os 24 isolados mostraram modelos de restrição idênticos à *S. cerevisiae*. Com o seqüenciamento da região ITS dentro desta população, as espécies mostraram seqüências ITS1 idênticas. Quando comparada com uma linhagem típica de *S. cerevisiae*, esta divergência foi apenas de 0,5%. A técnica PCR com um *primer* para microssatélites também não distinguiu estes isolados. Interessantemente, desconsiderando as variações fenotípicas, estes isolados representam uma população divergente de *S. cerevisiae*.

Neste contexto, pode-se afirmar que são importantes os estudos e pesquisas na área de biologia molecular para a identificação de leveduras para o setor de produção de álcool e aguardente. Isso porque o conhecimento prévio permite que rapidamente sejam tomadas medidas de controle em caso de contaminações. Além disso possibilita realizações futuras de melhoramentos genéticos nestas leveduras de forma a serem utilizadas como fermento nas unidades produtoras, objetivando-se a obtenção de aumentos na produtividade e na qualidade do produto final.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécies de *Saccharomyces*

As espécies de *Saccharomyces* foram obtidas da coleção pertencente ao Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil. Essas espécies estão descritas na Tabela 1 e Figuras 1 e 2. Foi utilizado somente um isolado de cada espécie, exceto *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* (três isolados).

TABELA 1 Espécies de *Saccharomyces*

Espécies	Designação das espécies
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	5
<i>Saccharomyces bayanus</i>	8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CA116
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	WT
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	19
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	20
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	21
<i>Saccharomyces uvarum</i>	22
<i>Saccharomyces mikatae</i>	SS1
<i>Saccharomyces cariocanus</i>	SS3
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	SS5

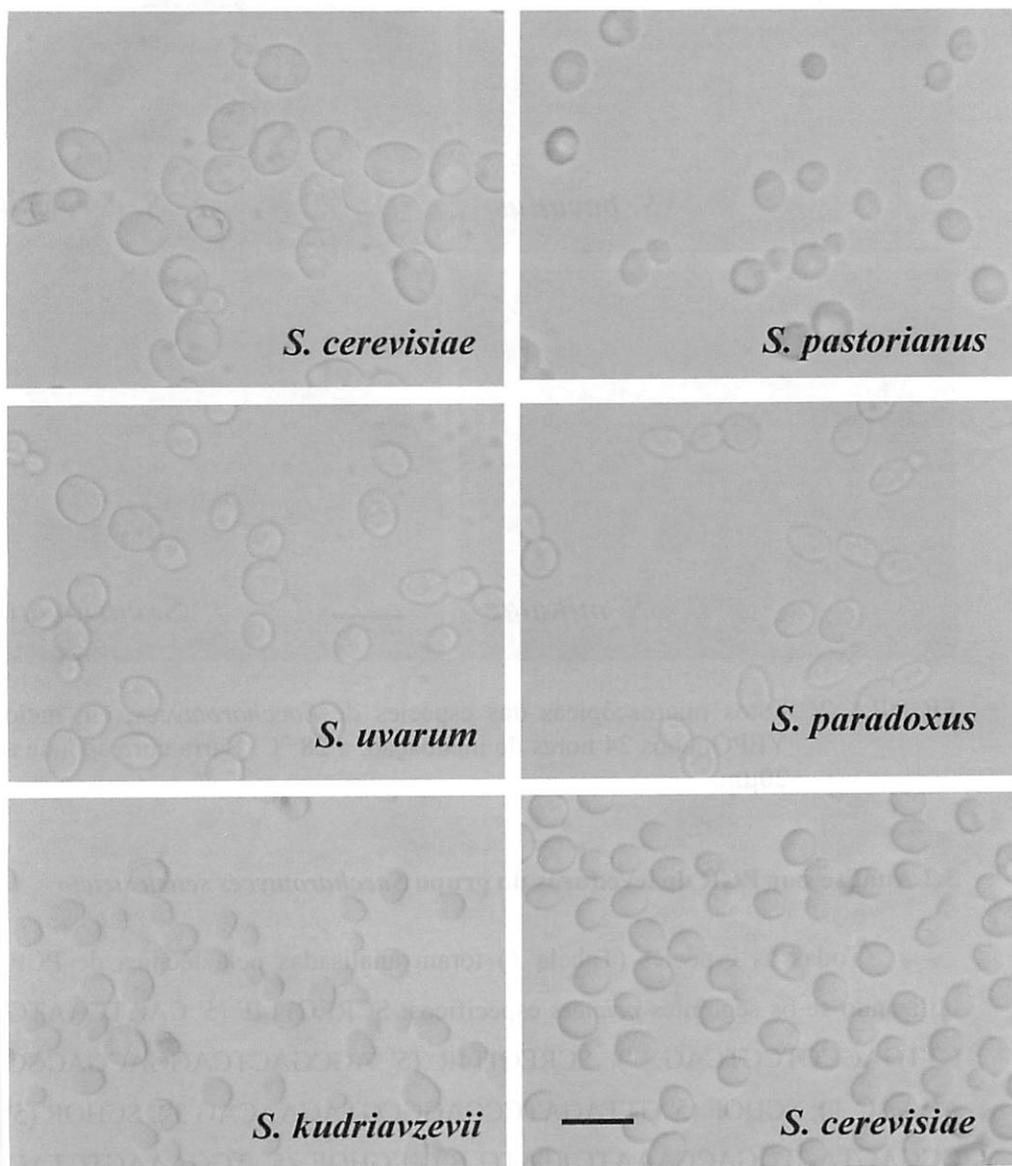


FIGURA 1 Fotos microscópicas das espécies de *Saccharomyces*, em meio YEPG, após 24 horas de incubação, a 28 °C. Barra corresponde a 20µm.

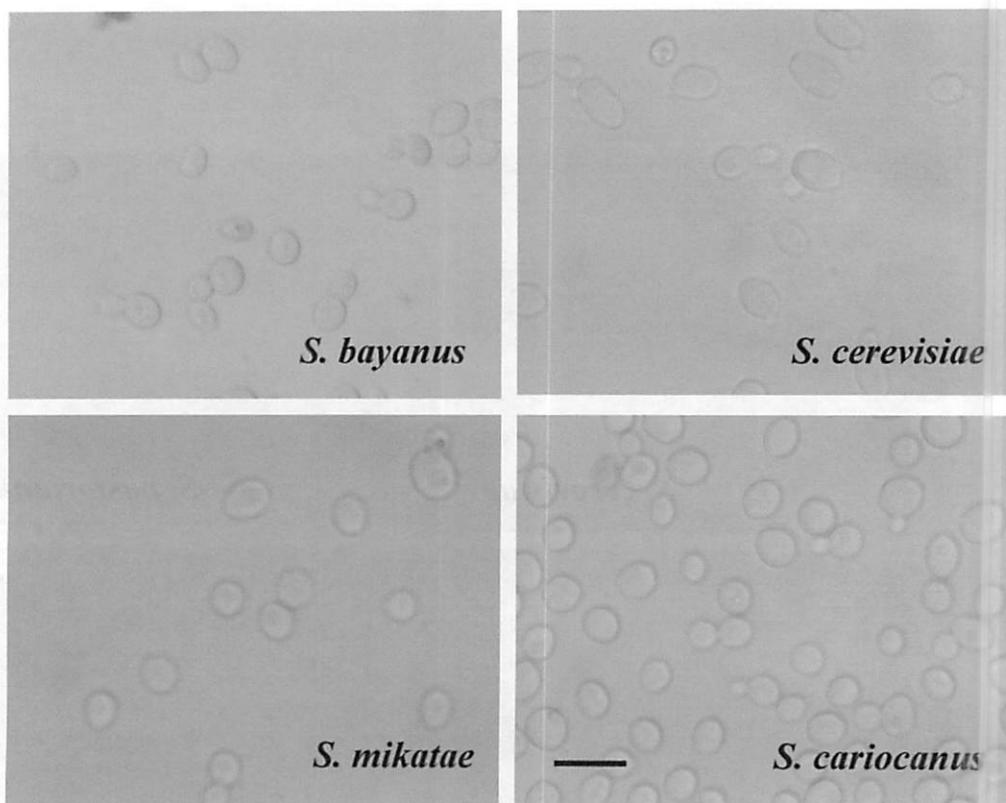


FIGURA 2 Fotos microscópicas das espécies de *Saccharomyces*, em meio YEPG, após 24 horas de incubação, a 28 °C. Barra corresponde a 20µm.

3.2 Análise por PCR de leveduras do grupo *Saccharomyces sensu stricto*

Todas as espécies (Tabela 1) foram analisadas pela técnica de PCR utilizando-se os seguintes *primers* específicos: SCREC114F (5' CAATCAATG CTTGAGCCTCCTCAG 3'), SCREC114R (5' AGCGACTCAGGACGACCC AAAAC 3'); SCHOF (5' GTTAGATCCCAGGCGTAGAACAG 3'), SCHOR (5' GCGAGTACTGGACCAAATCTTATG 3'); LGHOF (5' TGGAAAGTCTAC GAGAACAAGCC 3'), LGHOR (5' CCTCTATGTGAAGTCCGTATACTG 3').

3.2.1 Extração de DNA

As espécies de *Saccharomyces* foram crescidas em 50mL de YEPG (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%) e incubadas a 28°C, sob agitação, por 48 horas, antes da extração do DNA.

O DNA foi extraído macerando as células em almofariz com sílica (areia), tampão de extração CTAB 2X a 65°C (2% de CTAB, 100mM de Tris (pH=8,0), 20mM de EDTA (pH=8,0), 1,4M de NaCl e 1% de PVP (polivinilpirrolidone)) e 20µL β – mercaptoetanol.

O material triturado foi incubado por 30 minutos em tubos *ependorf*, colocados em banho-maria a 65°C.

A desproteinização foi feita duas vezes, com clorofórmio-álcool-isoamil (24:1) e o DNA precipitado com álcool/acetato de amônio (etanol 95%:acetato de amônio 7,5M (6:1)), na 1ª etapa e álcool acetato de sódio 3M (etanol 95% (1:20)), na 2ª etapa. O precipitado de DNA foi ressuspendido em 50µL de tampão TE (1mM de Tris e 0,1mM de EDTA).

O DNA foi quantificado usando-se o fluorímetro Hoeffler Scientific TKO 100 e, posteriormente, diluído para a concentração de 10ng/µL, utilizada na reação de PCR. Na quantificação, foram utilizados 2µL da amostra de DNA e 2mL de DAPI.

A qualidade do DNA foi analisada visualmente em gel de agarose 1% adicionado de brometo de etídeo (0,5µg/mL).

3.2.2 Amplificação por PCR

A reação de amplificação foi realizada com volume de 50µL, usando o *kit* Eppendorf Master Mix (2,5X).

Os componentes da reação foram: 20 ng de DNA total, 2pmoles de cada oligonucleotídeo, Tris-HCl 30mM, KCl 50mM, dNTP (dGTP, dCTP, dATP, dTTP) 200 μ M, MgCl₂ 1,5mM e Taq DNA polimerase 1,25U.

As amostras foram submetidas ao termociclador Mastercycler PCR com o seguinte programa: desnaturação inicial 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos e uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

As amostras de *Saccharomyces* também foram submetidas à amplificação com temperaturas de anelamento inferiores (40°C;45°C;50°C;55°C) e superiores (65°C;66°C;67°C;68°C;70°C).

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TBE (0,045M de Tris-borato e 0,001M de EDTA) a 90 volts por 2 horas e 30 minutos. Os fragmentos de DNA foram corados com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) e fotografados sob luz ultravioleta.

Isolados de outros gêneros (*Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Zygoascus*, *Stephanoascus*, *Torulaspota*, *Dekkera*, *Arxula*, *Citeromyces*, *Klyveromyces*, *Lodderomyces*) (Tabela 2) foram testados com os *primers* SCREC114, SCHO e LGHO para certificar a especificidade dos mesmos. Essas leveduras foram obtidas de coleções mantidas no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil. As condições da extração de DNA e reação de amplificação foram realizadas de acordo com procedimentos descritos acima com as seguintes modificações: a reação de amplificação foi realizada com volume de 25 μ L e foi utilizada temperatura de anelamento de 61°C.

TABELA 2 Espécies de leveduras

Espécies	Designação das espécies
<i>Debaryomyces hansenii</i>	FAB 5
<i>Candida sake</i>	FAB 1
<i>Candida bombi</i>	CCT 1689
<i>Candida rugopelliculosa</i>	CCT 1702
<i>Pichia guilliermondii</i>	IC-38
<i>Zygoascus hellenicus</i>	185
<i>Stephanoascus smithiae</i>	SCF 631
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	CAC 5
<i>Torulaspora pretoriensis</i>	CCT 1688
<i>Dekkera bruxelensis</i>	CAF 5
<i>Arxula adenivorans</i>	AA
<i>Citeromyces matritensis</i>	CCT 2374
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	KF
<i>Lodderomyces elongiosporus</i>	CCT1690

3.3 Amplificação por PCR e análise por RFLP

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação da região ITS (ITS1 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' e ITS4 5' TCCTCCGCTTAT TGATATGC 3') do rDNA foram descritos por White et al. (1990).

Os parâmetros de amplificação foram 35 ciclos, cada ciclo consistindo de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos. As amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os componentes para 13 μ L de reação foram: 20ng de DNA genômico, 100 μ M de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,4 μ M *primer*, 0,6 unidade da enzima Taq DNA polimerase, 50mM de TRIS (pH 8,3), 20mM de KCl, 2mM de MgCl₂, 5 μ g. μ L⁻¹ de BSA, 0,25% de ficol 400, 10mM de tartrazine e água pura totalizando 13 μ L. As reações de amplificação foram feitas no termociclador Mastercycler.

Depois da amplificação, parte da reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TBE (0,045M de Tris-borato e 0,001M de EDTA) e o restante foi precipitado para análise por RFLP. A precipitação foi feita pela adição de NaCl para uma concentração final de 200mM e 2,5 volumes de etanol absoluto. As amostras foram mantidas a -20°C por, no mínimo, 2 horas e centrifugadas a 12.000g por 30 minutos. O precipitado foi ressuscitado em 10 μ L de TE (1mM de Tris e 0,1mM de EDTA) e clivado com diferentes enzimas de restrição (*MspI*, *HaeIII* e *RsaI*), de acordo com as recomendações dos fabricantes. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% a 70V por 4 horas e visualizados adicionando-se brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) e fotografados sob luz ultravioleta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise por PCR de leveduras do grupo *Saccharomyces sensu stricto*

Várias técnicas moleculares têm sido utilizadas para distinguir diferentes espécies do gênero *Saccharomyces*. Dentre estas, destacam-se as técnicas de PCR, PCR-RFLP da região ribossomal e seqüenciamento dos genes rRNA (Valente et al., 1996; Masneuf et al., 1996; Barro Lopes et al., 1998; Montrocher et al., 1998).

Considerando que cada marcador molecular é analisado como sendo um caráter fenotípico distinto e independente dos demais, a interpretação dos resultados apresentados pelos mesmos é simples: bandas em comum entre genótipos representam similaridades genéticas, enquanto que bandas não comuns representam diferenças genéticas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Neste trabalho, oito espécies do grupo *Saccharomyces sensu stricto* foram submetidos à técnica de PCR com diferentes *primers* em diferentes temperaturas de anelamento, visando à distinção entre as mesmas.

Segundo as seqüências já descritas dos genomas de *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* e *S. bayanus*, a seqüência do *primer* SCREC114 possui 100% de homologia no gene REC114 da *S. cerevisiae*. Já o *primer* SCHO possui 100% de homologia nos genes HO e ScHO das espécies *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*, respectivamente. O *primer* LGHO também possui 100% de homologia nos genes HO e LgHO de *S. bayanus* e *S. pastorianus*, respectivamente. Os genes HO de *S. cerevisiae*, HO de *S. bayanus* e ScHO/LgHO de *S. pastorianus* codificam a endonuclease para conversão do tipo sexual (*mating - type*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Com os *primers* que anelam nesses genes juntamente com o *primer* SCREC114, esperava-se diferenciar as espécies de *S.*

cerevisiae, *S. bayanus* e *S. pastorianus* e também analisar a similaridade destas espécies com os outros membros do grupo *sensu stricto*.

O DNA de *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* e *S. uvarum* foi amplificado com os *primers* SCREC114 e SCHO nas seguintes temperaturas de anelamento: 50°C, 55°C, 61°C e 65°C (Figura 3 e Tabela 3). A amplificação ocorreu utilizando-se uma temperatura de anelamento alta; isso indica a especificidade da hibridização entre a região alvo das espécies e os *primers* testados. Com o SCREC114, ocorreu amplificação até a temperatura de anelamento de 66°C (Figura 4), enquanto que com o SCHO a hibridização ocorreu apenas até 65°C.

Com esses resultados, pôde-se observar que os isolados apresentados como *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* e *S. uvarum* são proximamente relacionados, considerando a região em que os *primers* SCREC114 e SCHO anelaram. O comportamento do *primer* SCHO com as espécies *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* era esperado. O contrário ocorreu com o *primer* SCREC114, que amplificou o DNA de *S. pastorianus* e de *S. uvarum*, sendo que este deveria ter anelado somente com *S. cerevisiae* e também com o *primer* SCHO, que não deveria ter amplificado o DNA de *S. uvarum*. Isto indica que os isolados de *S. pastorianus* e o isolado de *S. uvarum* podem ter sido classificados inadequadamente.

Segundo Rossini et al. (1982), o DNA de *S. uvarum* e *S. bayanus* apresenta alto nível de similaridade (95,2%) e, por isso, as duas poderiam ser consideradas representantes de uma única espécie. Esta afirmação está em discordância com os resultados obtidos neste trabalho, pois, a técnica de PCR amplificando o gene HO e o gene REC114, diferenciou *S. bayanus* de *S. uvarum*, ou seja, estas espécies comportaram-se de maneira diferente. Este dado é mais uma indicação de que o isolado de *S. uvarum* utilizado é, na verdade, pertencente à outra espécie de levedura.

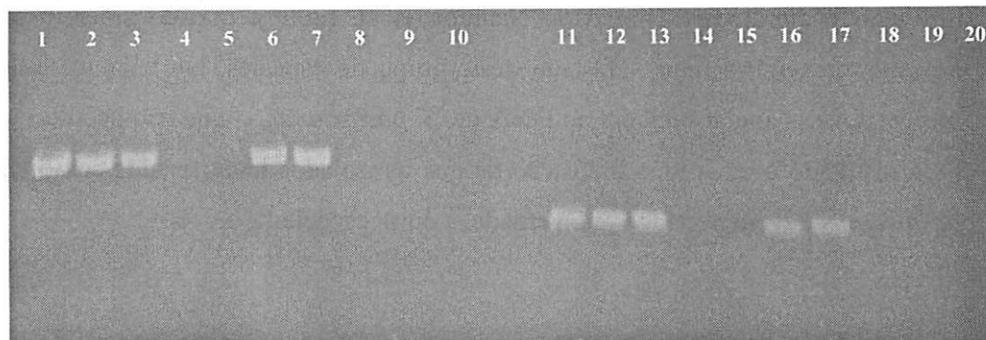


FIGURA 3 Resultados de eletroforese de um gel de agarose contendo amostras das reações de amplificação de DNA de *Saccharomyces* utilizando os *primer* SCREC114 (colunas 1-10) e SCHO (colunas 11-20) e temperatura de anelamento 61°C. 1/2/3/11/12/13- *S. cerevisiae*, 4/14 - *S. paradoxus*, 5/15- *S. bayanus*, 6/16- *S. pastorianus*, 7/17- *S. uvarum*, 8/18- *S. mikatae*, 9/19- *S. cariocanus*, 10/20- *S. kudriavzevii*.

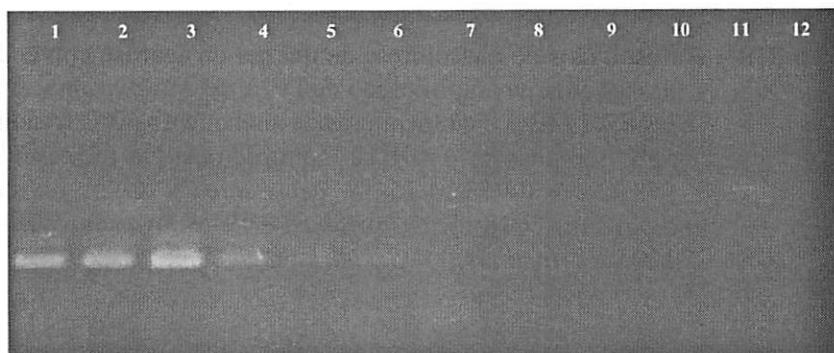


FIGURA 4 Resultados de eletroforese de um gel de agarose contendo amostras das reações de amplificação de DNA de *Saccharomyces* utilizando os *primers* SCREC114 (colunas 1-6) e SCHO (colunas 7-12) e temperaturas de anelamento 66°C (colunas 1-3/ 7-9) e 67°C (colunas 4-6/ 10-12). 1/4/7/10- *S. cerevisiae*, 2/5/8/11- *S. pastorianus*, 3/6/9/12- *S. uvarum*.

Apenas o DNA de *S. bayanus* foi amplificado com o *primer* LGHO, com as temperaturas de anelamento de 50°C e 55°C (Figura 5 e Tabela 3). Este resultado é condizente com o de Naumov et al. (2000), que consideram *S. bayanus* o membro mais afastado deste grupo de espécies. No entanto, este *primer* deveria anelar também ao DNA de *S. pastorianus*, o que não aconteceu. Esse resultado é mais uma indicação de que os isolados identificados como *S. pastorianus* devem pertencer, na verdade, à outra espécie.

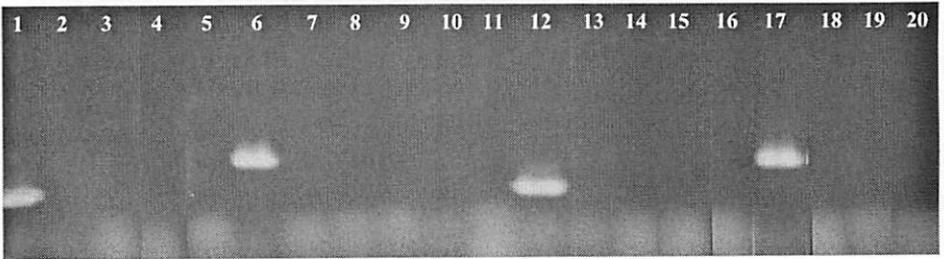


FIGURA 5 Resultados de eletroforese de um gel de agarose contendo amostras das reações de amplificação de DNA de *Saccharomyces* utilizando o *primer* LGHO e temperaturas de anelamento 50°C (colunas 12-20) e 55°C (colunas 1-11). 1/12- controle positivo (*S. cerevisiae*/*primer* SCHO), 2/3/4/13/14/15- *S. cerevisiae*, 5/16- *S. paradoxus*, 6/17- *S. bayanus*, 7/18- *S. pastorianus*, 8/19- *S. uvarum*, 9/20- *S. mikatae*, 10- *S. cariocanus*, 11- *S. kudriavzevii*.

TABELA 3 Resultados da amplificação de espécies de *Saccharomyces*

Espécies	Primers					
	SCREC114		SCHO		LGHO	
	55°C	61°C	55°C	61°C	55°C	61°C
<i>S. paradoxus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. bayanus</i>	-	-	-	-	+	-
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	-	-
<i>S. pastorianus</i>	+	+	+	+	-	-
<i>S. uvarum</i>	+	+	+	+	-	-
<i>S. mikatae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. cariocanus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. kudriavzevii</i>	-	-	-	-	-	-
+ amplificação	- não amplificou		55 e 61°C temperaturas de anelamento			

Na tentativa de diferenciar as espécies *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. cariocanus* e *S. kudriavzevii*, estas foram submetidas à amplificação com os primers SCREC114, SCHO e LGHO em temperaturas de anelamento inferiores: a 40°C e 45°C. Como resultado, o DNA de *S. paradoxus* foi amplificado com o primer SCHO na temperatura de anelamento 40°C (Figura 6 e Tabela 4).

TABELA 4 Resultados da amplificação de espécies de *Saccharomyces*

Espécies	Primer					
	SCREC114		SCHO		LGHO	
	40°C	45°C	40°C	45°C	40°C	45°C
<i>S. paradoxus</i>	-	-	+	-	-	-
<i>S. mikatae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. cariocanus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. kudriavzevii</i>	-	-	-	-	-	-
+ amplificação	- não amplificou		40 e 45°C temperatura de anelamento			

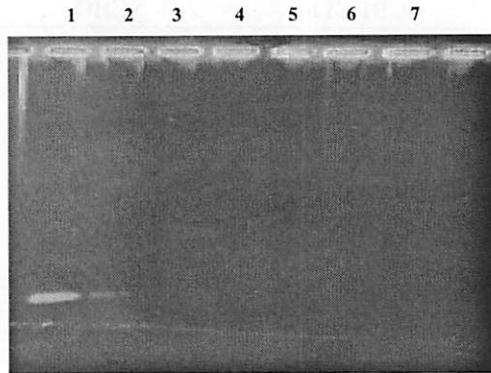


FIGURA 6 Resultados de eletroforese de um gel de agarose contendo amostras das reações de amplificação de DNA de *Saccharomyces* utilizando o *primer* SCHO (colunas 1-4) e LGHO (colunas 5-8) e temperatura de anelamento 40°C. 1/5- *S. paradoxus*, 2/6- *S. mikatae*, 3/7- *S. cariocanus*, 4/8- *S. kudriavzevii*.

Dentre as espécies do grupo *sensu stricto*, *S. cerevisiae* e *S. paradoxus* possuem 50% de homologia de DNA e apresentam cariótipo praticamente idêntico (Naumov, 1992b; 1996). Com relação às características fenotípicas, ambas crescem a 37°C e, muitas vezes, a 40/42°C e não possuem sistema de transporte de frutose (Vaughan-Martini & Martini, 1993). Considerando a técnica PCR com os *primers* SCREC114 e SCHO, pode-se diferenciar *S. cerevisiae* de *S. paradoxus*. Estes *primers* hibridizam com o DNA de *S. cerevisiae* mesmo em temperaturas de anelamento mais altas (50°C, 55°C e 61°C), enquanto que com *S. paradoxus* ocorreu a amplificação apenas com o *primer* SCHO a 40°C.

As espécies biológicas *S. cariocanus* e *S. paradoxus*, que também são proximamente relacionadas, foram diferenciadas com o *primer* SCHO quando se utilizou temperatura de anelamento de 40°C. Nestas condições, ocorreu

amplificação com *S. paradoxus* e não ocorreu amplificação com *S. cariocanus* (Figura 6 e Tabela 4).

As espécies *S. mikatae* e *S. kudriavzevii*, de origem japonesa, não foram diferenciadas com os *primers* testados, mas foi possível separá-las das espécies *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. bayanus* utilizando os *primers* SCREC114, SCHO e LGHO em diferentes temperaturas de anelamento.

Interessantemente, os três isolados de *S. pastorianus* utilizados neste trabalho apresentaram um comportamento idêntico a *S. cerevisiae*, considerando estes *primers* em diversas temperaturas de anelamento (Figura 3 e Tabela 3). Analisando-se o comportamento dos isolados de *S. pastorianus*, amplificando com o *primer* SCREC114 e não amplificando com o *primer* LGHO, pode-se sugerir que os isolados se comportam como *S. cerevisiae* e deveriam ser reclassificados. Comportamento semelhante foi observado com o isolado de *S. uvarum*, que também deveria ser reclassificado.

Para uma melhor confiança dos resultados, os *primers* SCREC114, SCHO e LGHO foram testados para outros gêneros de leveduras (Tabela 2). Um isolado identificado fenotipicamente como *Torulaspota delbrueckii* amplificou com os *primers* SCREC114 e SCHO (Figura 7 e 8 e Tabela 5), indicando que, genotipicamente, pertence ao gênero *Saccharomyces* e, provavelmente, à espécie *S. cerevisiae*. Como controle, foi utilizado um isolado cuja espécie já havia sido confirmada como *Torulaspota pretoriensis*. Os outros isolados, de gêneros variados, não amplificaram com nenhum dos *primers* testados (Figura 7, 8 e Tabela 5).

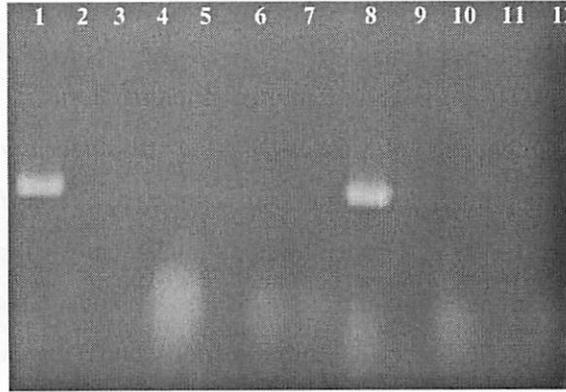


FIGURA 7 Resultados de eletroforese de um gel de agarose contendo amostras das reações de amplificação de DNA de leveduras utilizando o primer SCREC114 e temperatura de anelamento 61°C. 1- controle positivo (*S. cerevisiae*/SCREC114), 2- controle negativo (*T. pretoriensis*/SCREC114), 3- *Debaryomyces hansenii*, 4- *Candida sake*, 5- *Pichia guilliermondii*, 6- *Zygoascus hellenicus*, 7- *Stephanoascus smithiae*, 8- *Torulaspora delbrueckii*, 9- *Dekkera bruxelensis*, 10- *Arxula adeninivorans*, 11- *Citeromyces matritensis*, 12- *Kluyveromyces fragilis*.

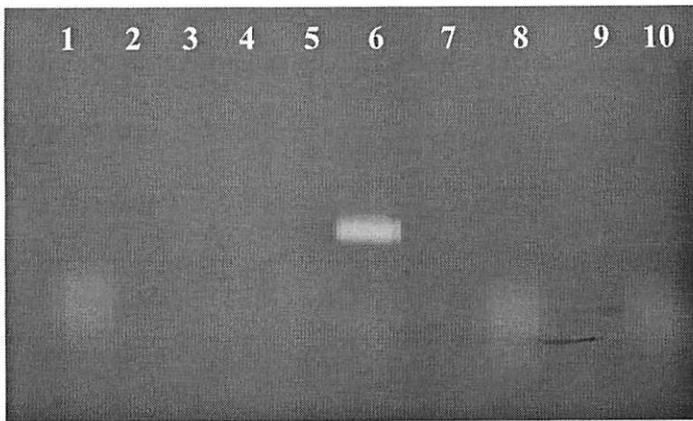


FIGURA 8 Resultados de eletroforese de um gel de agarose contendo amostras das reações de amplificação de DNA de leveduras utilizando o primer SCHO e temperatura de anelamento 61°C. 1- *Debaryomyces hansenii*, 2- *Candida sake*, 3- *Pichia guilliermondii*, 4- *Zygoascus hellenicus*, 5- *Stephanoascus smithiae*, 6- *Torulaspota delbrueckii*, 7- *Dekkera bruxelensis*, 8- *Arxula adeninivorans*, 9- *Citeromyces matritensis*, 10- *Kluyveromyces fragilis*.

A diferenciação por métodos tradicionais dos gêneros *Saccharomyces* e *Torulaspota* é baseada em somente um teste fisiológico: utilização de lisina. Com *Torulaspota*, ocorre utilização de lisina; com *Saccharomyces*, não ocorre (Barnett et al., 2000). No entanto, já foram observados isolados selvagens de *S. cerevisiae* que utilizam lisina; logo, estes gêneros não podem mais ser distinguidos por testes fisiológicos (Comunicação pessoal Schwan, 2003). Os resultados aqui obtidos utilizando os primers SCREC114 e SCHO distinguiram *Saccharomyces cerevisiae* de *Torulaspota*, mostrando que a técnica é eficiente para esse tipo de identificação.

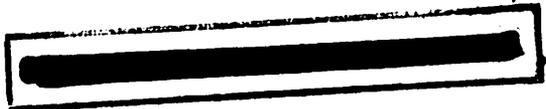


TABELA 5 Resultados da amplificação de gêneros variados de leveduras

+ amplificação	- não amplificou		
	<i>Primers</i>		
Espécies	SCREC114	SCHO	LGHO
<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	-	-
<i>Candida sake</i>	-	-	-
<i>Candida bombi</i>	-	-	-
<i>Candida rugopelliculosa</i>	-	-	-
<i>Pichia guilliermondii</i>	-	-	-
<i>Zygoascus hellenicus</i>	-	-	-
<i>Stephanoascus smithiae</i>	-	-	-
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	+	+	-
<i>Torulaspota pretoriensis</i>	-	-	-
<i>Dekkera bruxelensis</i>	-	-	-
<i>Arxula adeninivorans</i>	-	-	-
<i>Citeromyces matritensis</i>	-	-	-
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	-	-	-
<i>Lodderomyces elongiosporus</i>	-	-	-

Para certificar a autenticidade dos resultados acima, 10 isolados que apresentaram identificação duvidosa, por testes fisiológicos, entre *S. cerevisiae* e *Torulaspota* (Tabela 6) foram testados com o *primer* SCHO utilizando temperatura de anelamento de 61°C. O resultado mostrou que o DNA de todos os 10 isolados foi amplificado com este *primer*, evidenciando que os mesmo pertencem, na verdade, à espécie *S. cerevisiae* (Figura 9).

Esses resultados comprovam a eficiência e a rapidez dessa técnica na identificação de leveduras do gênero *Saccharomyces*. A utilização da técnica permite que grande parte dos isolados seja identificada sem a necessidade de utilização dos laboriosos testes fisiológicos, os quais poderiam ser utilizados apenas para os demais gêneros, dependendo da necessidade e interesse.

TABELA 6 Espécies de leveduras selvagens

Espécies	Designação das espécies
<i>S. cerevisiae/Torulaspóra</i>	9A
<i>S. cerevisiae/Torulaspóra</i>	10A
<i>S. cerevisiae/Torulaspóra</i>	11A
<i>S. cerevisiae/Torulaspóra</i>	12A
<i>S. cerevisiae/Torulaspóra</i>	17A
<i>S. cerevisiae/Torulaspóra</i>	18A
<i>S. cerevisiae/Torulaspóra</i>	7B
<i>S. cerevisiae/Torulaspóra</i>	11B
<i>S. cerevisiae/Torulaspóra</i>	12B
<i>S. cerevisiae/Torulaspóra</i>	13B

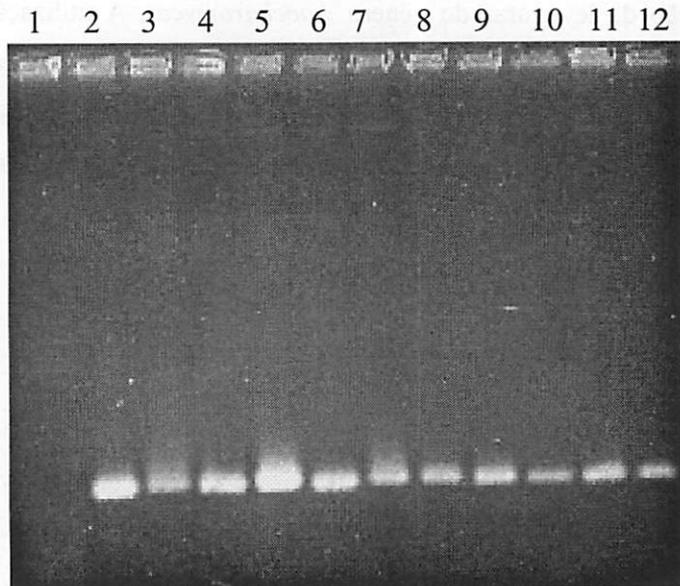


FIGURA 9 Resultados de eletroforese de um gel de agarose contendo amostras das reações de amplificação de DNA de leveduras utilizando o primer SCHO e temperatura de anelamento 61°C. 1- CCT1688 *Torulaspora pretoriensis* (controle negativo), 2- 9A, 3- 10A, 4- 11A, 5- 12A, 6- 17A, 7- 18A, 8- 7B, 9- 11B, 10- 12B, 11- 13B, 12- CA116 *S. cerevisiae* (controle positivo).

4.2 Polimorfismo no espaçador interno transcrito (ITS) do DNA ribossômico

A análise RFLP do gene 5.8S rRNA e dos espaços internos transcritos é um método seguro, simples e apropriado para a identificação de leveduras *Saccharomyces* (Montrocher et al., 1998; Dlauchy et al., 1999; Esteve-Zarzoso et al., 1999; Fernández Espinar et al., 2000).

Neste trabalho, a técnica PCR-RFLP da região 5.8S-ITS foi utilizada para efeito de comparação com os resultados de PCR obtidos no item anterior.

A região ITS foi amplificada por PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 e clivada com diferentes enzimas de restrição para análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP).

A região 5.8S-ITS amplificada por PCR mostrou um produto de aproximadamente 880pb para todas as espécies do grupo *Saccharomyces sensu stricto* (*S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. mikatae*, *S. cariocanus* e *S. kudriavzevii*) (Figura 10 e Tabela 7). Este tamanho do produto de PCR está de acordo com trabalhos anteriores (Valente, 1996; Guillamón, 1998; Esteve-Zarzoso, 1999; Fernandez-Espinar, 2000).

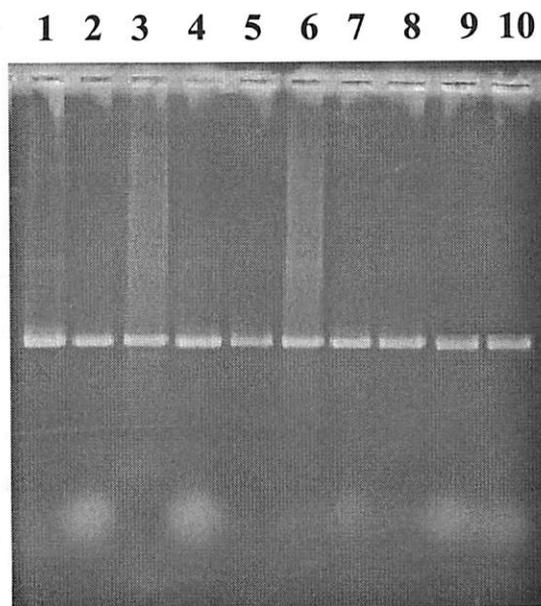


FIGURA 10 Resultados de eletroforese de um gel de agarose contendo amostras das reações de amplificação de DNA de *Saccharomyces* utilizando o *primer* ITS. 1/2/3- *S. cerevisiae*, 4- *S. paradoxus*, 5- *S. bayanus*, 6- *S. pastorianus*, 7- *S. uvarum*, 8- *S. mikatae*, 9- *S. cariocanus*, 10- *S. kudriavzevii*

Neste trabalho, a enzima de restrição *HaeIII* rendeu padrão de restrição que separou as 7 espécies em dois grupos formados por *S. cerevisiae/S. paradoxus/S. cariocanus/S. kudriavzevii/S. pastorianus* e *S. bayanus/S. mikatae* (Figura 11 e Tabela 7).

Em trabalhos anteriores, a análise de polimorfismo de restrição na região amplificada 5.8S-ITS suporta a evidência de que as espécies *S. bayanus* e *S. pastorianus* são muito relacionadas. Nenhum dos modelos de restrição obtido com várias enzimas testadas permitiu diferenciar *S. bayanus* de *S. pastorianus* (Guillamón, 1998; Esteve-Zaroso, 1999; Fernandez-Espinar, 2000; Morakile, 2002; Naumova, 2003). Estes resultados são condizentes com a origem híbrida de *S. pastorianus* (*S. bayanus* X *S. cerevisiae*). O rDNA de *S. pastorianus* e o do seu sinônimo *S. carlsbergensis* são bastante similares ao rDNA *S. bayanus*. Já foi sugerido que o loco rDNA foi herdado de somente um dos parentais: *S. bayanus* (Kurtzman & Robnett, 1991; Kurtzman, 1992; Montrocher et al., 1998; Dlauchy, 1999). Uma situação similar foi também relatada para o genoma mitocondrial presente nas células de *S. pastorianus*, que mostrou-se similar somente a *S. bayanus* (Guillamón, 1994).

Analisando-se os resultados obtidos com a enzima de restrição *HaeIII*, pode-se observar que os isolados de *S. pastorianus* utilizados possuem um alto nível de similaridade com *S. cerevisiae* na região ITS. Este comportamento idêntico foi também observado na técnica de PCR com os *primers* SCREC114, SCHO e LGHO e com as enzimas de restrição *MspI* e *RsaI* (Figura 13 e 15). Sendo assim, pode-se sugerir uma reclassificação desses isolados de *S. pastorianus* para *S. cerevisiae*.

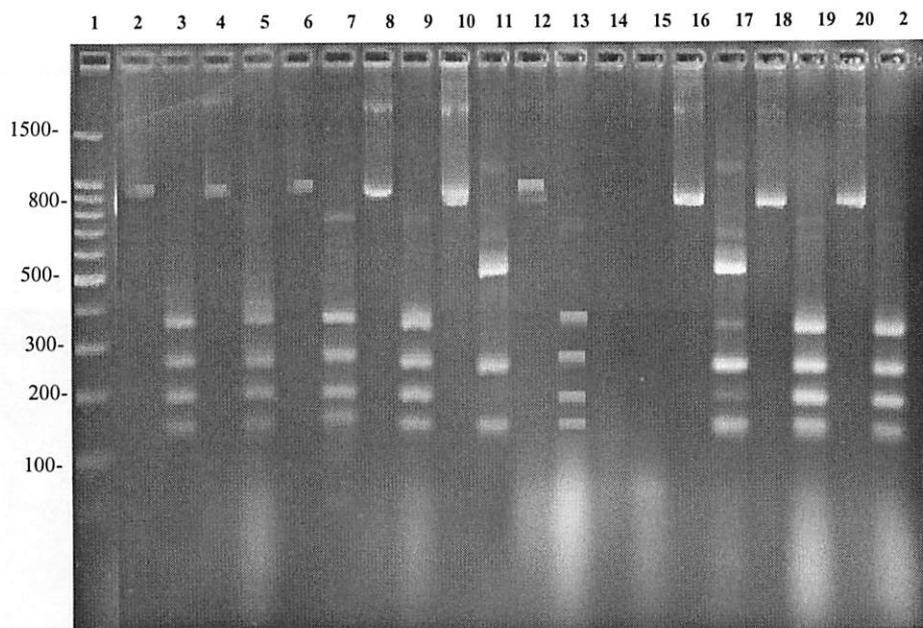


FIGURA 11 Modelo de restrição da região 5.8S-ITS, de espécies de *Saccharomyces*, amplificada por PCR e os fragmentos após digestão com a enzima *HaeIII*. 1- DNA lambda (marcador de peso molecular), 2/3/4/5/6/7- *S. cerevisiae*, 8/9- *S. paradoxus*, 10/11- *S. bayanus*, 12/13- *S. pastorianus*, 14/15- *S. uvarum*, 16/17- *S. mikatae*, 18/19- *S. cariocanus*, 20/21- *S. kudriavzevii*. Colunas pares - DNA antes da digestão de restrição. Colunas ímpares - DNA após digestão de restrição.

Os isolados identificados como *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* e *S. bayanus* apresentaram o mesmo padrão de restrição com a enzima *MspI*. Este padrão mostrou-se com um único local de restrição para a enzima em questão. As espécies *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. cariocanus* e *S. kudriavzevii* comportaram-se de forma diferente, ou seja, não apresentaram nenhum local de restrição (Figura 12 e 13 e Tabela 7). Morakile (2002), utilizando a enzima de restrição *MspI*, diferenciou *S. paradoxus* de *S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *S. pastorianus*. Neste trabalho, porém, verificou-se que *S. paradoxus* apresentou o mesmo padrão de restrição de *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* e *S. cariocanus*.

Nenhuma referência foi encontrada com respeito ao padrão de restrição das espécies *S. mikatae*, *S. cariocanus* e *S. kudriavzevii* com a enzima *MspI*.

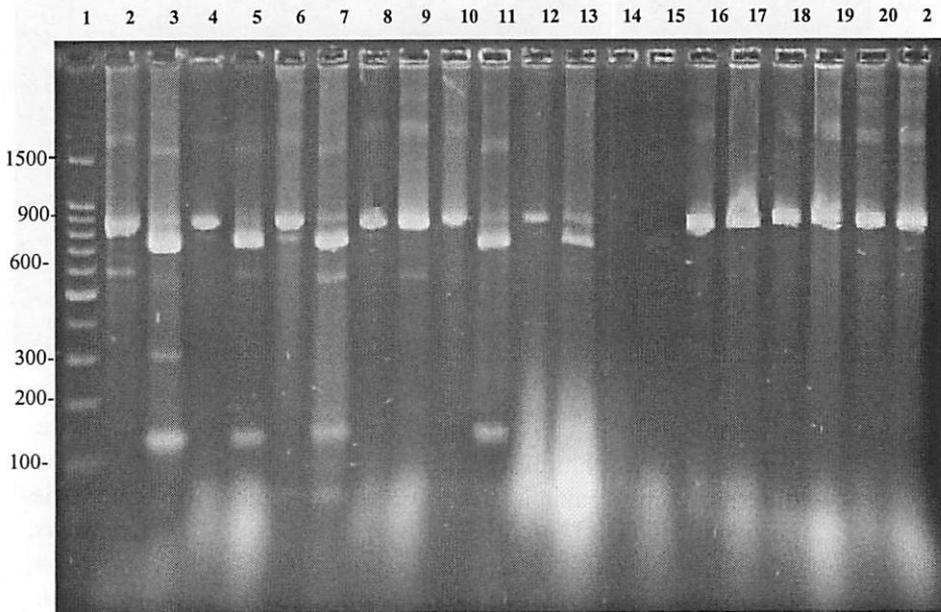


FIGURA 12 Modelo de restrição da região 5.8S-ITS, de espécies de *Saccharomyces*, amplificada por PCR e os fragmentos obtidos após digestão com a enzima *MspI*. 1- DNA lambda (marcador de peso molecular), 2/3/4/5/6/7- *S. cerevisiae*, 8/9- *S. paradoxus*, 10/11- *S. bayanus*, 12/13- *S. pastorianus*, 14/15- *S. uvarum*, 16/17- *S. mikatae*, 18/19- *S. cariocanus*, 20/21- *S. kudriavzevii*. Colunas pares - DNA antes da digestão de restrição. Colunas ímpares - DNA após digestão de restrição.

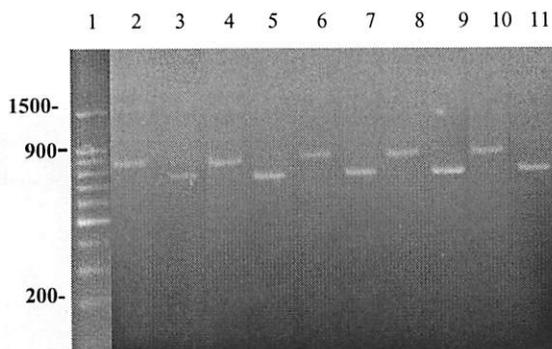


FIGURA 13 Modelo de restrição da região 5.8S-ITS, de espécies de *Saccharomyces*, amplificada por PCR e os fragmentos obtidos após digestão com a enzima *MspI*. 1- DNA lambda (marcador de peso molecular), 2/3- *S. cerevisiae*, 4/5/6/7/8/9- *S. pastorianus*, 10/11- *S. uvarum*. Colunas pares - DNA antes da digestão de restrição. Colunas ímpares - DNA após digestão de restrição.

Quando os produtos de PCR foram digeridos com *RsaI*, as espécies de *S. cerevisiae* foram diferenciadas das outras espécies do grupo *S. sensu stricto*. Um único local de restrição foi reconhecido na espécie *S. cerevisiae* e dois ou mais locais de restrição nas espécies *S. bayanus/S. cariocanus/S. kudriavzevii/S. mikatae/S. paradoxus* (Figura 14 e Tabela 7).

Os fragmentos menores que 50pb, obtidos com a endonuclease *RsaI*, não foram claramente visualizados e, sendo assim, não foram considerados.

O isolado de *S. uvarum*, assim como os isolados de *S. pastorianus*, comportou-se como *S. cerevisiae* quando a região ITS foi clivada com *MspI* e *RsaI* (Figura 13 e 15). Como esta semelhança já havia sido observada com a enzima de restrição *HaeIII* e na amplificação do gene HO e do gene REC114, é provável que este isolado pertença à espécie *S. cerevisiae*.

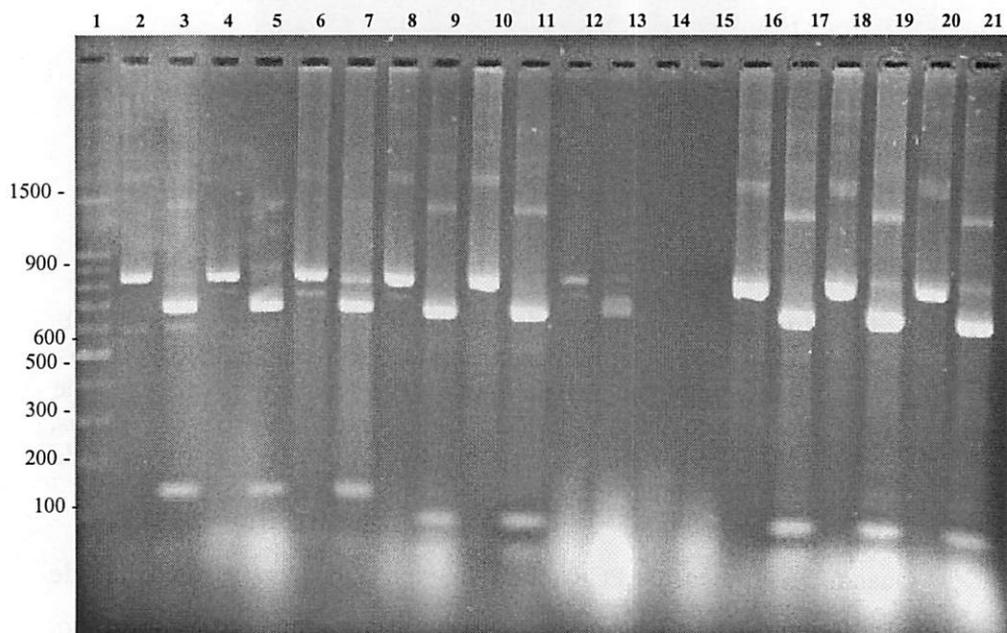


FIGURA 14 Modelo de restrição da região 5.8S-ITS, de espécies de *Saccharomyces*, amplificada por PCR e os fragmentos obtidos após digestão com a enzima *Rsa*I. 1- DNA lambda (marcador de peso molecular), 2/3/4/5/6/7- *S. cerevisiae*, 8/9- *S. paradoxus*, 10/11- *S. bayanus*, 12/13- *S. pastorianus*, 14/15- *S. uvarum*, 16/17- *S. mikatae*, 18/19- *S. cariocanus*, 20/21- *S. kudriavzevii*. Colunas pares - DNA antes da digestão de restrição. Colunas ímpares - DNA após digestão de restrição.

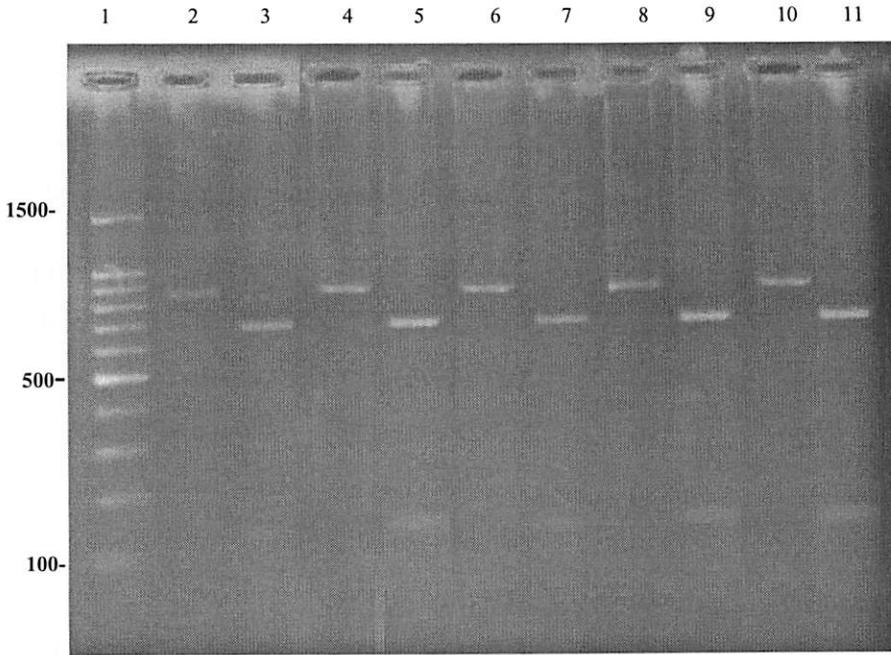


FIGURA 15 Modelo de restrição da região 5.8S-ITS, de espécies de *Saccharomyes*, amplificada por PCR e os fragmentos obtidos após digestão com a enzima *Rsa*I. 1- DNA lambda (marcador de peso molecular), 2/3- *S. cerevisiae*, 4/5/6/7/8/9- *S. pastorianus*, 10/11- *S. uvarum*. Colunas pares - DNA antes da digestão de restrição. Colunas ímpares - DNA após digestão de restrição.

TABELA 7 Comprimento (em pb) da região 5.8S-ITS, de espécies de *Saccharomyces*, amplificada por PCR e os fragmentos obtidos após digestão com três endonucleases de restrição.

Espécies	Tamanho do produto PCR (pb)	Tamanho do fragmento de restrição (pb)		
		<i>HaeIII</i>	<i>RsaI</i>	<i>MspI</i>
<i>S. bayanus</i>	880	500+250+130	730+100	740+140
<i>S. cariocanus</i>	880	325+250+175+130	730+100	880
<i>S. cerevisiae</i>	880	325+250+175+130	730+150	740+140
<i>S. kudriavzevii</i>	880	325+250+175+130	730+100	880
<i>S. mikatae</i>	880	500+250+130	730+100	880
<i>S. paradoxus</i>	880	325+250+175+130	730+100	880
<i>S. pastorianus</i>	880	325+250+175+130	730+150	740+140
<i>S. uvarum</i>	880	325+250+175+130	730+150	740+140

Os resultados indicaram que a combinação das endonucleases *HaeIII*, *RsaI* e *MspI* possibilita a discriminação de *S. bayanus*, *S. mikatae* e *S. cerevisiae*. As espécies de *S. cariocanus*, *S. paradoxus* e *S. kudriavzevii* não foram distinguidas com as enzimas de restrição citadas acima.

As espécies biológicas *S. cariocanus* e *S. paradoxus* são proximamente relacionadas, como observado no seqüenciamento da região ITS1 (Naumov, 2000) e não podem ser diferenciadas baseando-se no modelo de restrição com a combinação das endonucleases *HaeIII*, *HpaII*, *ScrFI* e *TaqI* (Naumova, 2003).

Para a separação de *S. kudriavzevii*, o fragmento amplificado deveria ser clivado com outras enzimas de restrição. Naumova (2003) separou *S. kudriavzevii* de todos os outros membros de *sensu stricto* utilizando a enzima *TaqI*.

Este estudo claramente mostrou que o polimorfismo nas regiões espaçadoras do rDNA é uma técnica valiosa para deduzir a posição filogenética de leveduras proximamente relacionadas.

O interessante desta região para identificação de espécies é que ela apresenta baixo polimorfismo intra-específico e alta variedade interespecífica.

A técnica PCR–RFLP da região 5.8S–ITS é de manipulação fácil e de alta reprodutibilidade sendo, portanto, útil para diferenciar espécies do grupo *Saccharomyces sensu stricto*.

A disponibilidade de uma técnica de identificação rápida permite uma detecção fácil de quais leveduras estão presentes na fase inicial de uma fermentação. A técnica pode ser usada não somente para determinar a qualidade do mosto, mas também para estudo da presença de espécies não *Saccharomyces* que são específicas para diferentes regiões de produção de vinho (Guillámon, 1998).

5 CONCLUSÕES

- Foi possível, por meio da técnica PCR utilizando os *primers* SCREC114, SCHO e LGHO, diferenciar espécies proximamente relacionadas, como *S. cerevisiae* de *S. paradoxus* e *S. cariocanus* de *S. paradoxus*.
- A espécie biológica *S. bayanus* foi diferenciada das outras espécies do grupo *Saccharomyces sensu stricto* utilizando o *primer* LGHO.
- A espécie biológica *S. cerevisiae* foi também diferenciada de espécies do gênero *Torulaspota*, pela amplificação com os *primers* SCREC114 e SCHO.
- Os isolados identificados como *S. pastorianus* e *S. uvarum* utilizados neste trabalho apresentaram comportamento idêntico a *S. cerevisiae* na análise por PCR e PCR-RFLP.
- A combinação das endonucleases *HaeIII*, *RsaI* e *MspI* para análise da região 5.8S-ITS possibilita a discriminação de *S. bayanus*, *S. mikatae* e *S. cerevisiae*. As espécies *S. cariocanus*, *S. paradoxus* e *S. kudriavzevii* não foram distinguidas com as enzimas de restrição citadas acima.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999. 757 p.

BARNETT, J. A. The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex. Reess: a short review for non-taxonomists. *Yeast*, Sussex, v. 8, n. 1, p. 1-23, Jan. 1992.

BARNETT, J. A.; PAYNE R. W.; YARROW, D. **Yeasts characteristics and identification**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

BARROS LOPES, M.; SODEN, A.; MARTENS, A. L.; HENSCHKE, P. A.; LANGRIDGE, P. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Reading, v. 48, n. 1, p. 279-286, Jan. 1998.

BELIN, J. M. Las leveduras. In: BOURGEOIS, C. M.; LARPENT, J. M. **Microbiologia Alimentaria, Fermentações alimentaria**. Zaragoza: Acriba, 1995. cap 2, p. 19-30.

CASTELLARI, L.; PACCHIOLI, G.; ZAMBONELLI, C.; TINI, V.; GRAZIA, L. Isolation and Initial Characterization of Cryotolerant *Saccharomyces* Strains. *Italian Journal of Food Science*, Perugia, v. 4, n. 3, p. 179-186, 1992.

DLAUCHY, D.; TORNAI-LEHOCZKI, J.; PETER, G. Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Systematic Applied Microbiology*, Jena, v. 22, n. 3, p. 445-453, Sept. 1999.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5. 8S rRNA gene and the two ribossomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Reading, v. 49, n. 1, p. 329-337, Jan. 1999.

FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; QUEROL, A.; BARRIO, E. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and 5. 8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeast. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v. 78, n. 1, p. 87-97, July 2000.

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

FIALHO, C. J. **Identificação de *Saccharomyces cerevisiae* por técnicas moleculares (PCR e PFGE) em uma fermentação de caldo de cana-de-açúcar**. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência dos alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GIUDICI, P.; CAGGIA, C.; PULVIRENTI, A.; ZAMBONELLI, C.; RAINIERI, S. Electrophoretic profiles of hybrids between cryotolerant and non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 31-34, July 1998.

GOULIAMOVA, D. E.; HENNEBERT, G. L. Phylogenetic relationships in the *Saccharomyces cerevisiae* complex of species. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 66, n. 1, p. 337-353, Jan./Feb. 1998.

GULLAMÓN, J. M.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; QUEROL, A. Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 44, n. 4, p. 708-714, Oct. 1994.

GULLAMÓN, J. M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E.; CANO, J.; QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal ITS regions. **Archives of Microbiology**, New York, v. 169, n. 5, 387-392, May 1998.

HANTULA, J.; DUSABENYAGASANI, M.; HAMELIN, R. C. Random amplified microsatellites (RAMS) – a novel method for characterizing genetic variation within fungi. **European Journal of Forest Pathology**, Berlin, v. 26, n. 3, p. 159-166, June 1996.

JAMES, S. A.; CAI, J.; ROBERTS, I. N.; COLLINS, M. D. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 47, n. 2, p. 453-460, Apr. 1997.

KISHIMOTO, M.; GOTO, SH. Growth temperatures and electrophoretic karyotyping as tools for practical discrimination of *Saccharomyces bayanus* and

Saccharomyces cerevisiae. **Journal of General Applied Microbiology**, Tokyo, v. 41, n. 3, 239-247, June 1995.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts a taxonomic study**. 3. ed. rev. and enl. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984. 1082 p.

KURTZMAN, C. P. rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeast. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 42, n. 1, p. 1-6, Jan. 1992.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, 1998. 1055 p.

KURTZMAN, C. P.; ROBBETT, C. J. Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. **Yeast**, Sussex, v. 7, n. 1, p. 61-72, Jan. 1991.

LOPÉZ, V.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; BARRIO, E.; RAMÓN, D.; QUEROL, A. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 63-71, Jan. 2003.

MASNEUF, I.; AIGLE, M.; DUBOURDIEU, D. Development of a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 138, n. 2/3, p. 239-244, May 1996.

MASNEUF, I.; HANSEN, J.; GROTH, C.; PISKUR, J.; DUBOURDIEU, D. New Hybrids between *Saccharomyces Sensu Stricto* Yeast Species Found among Wine and Cider Production Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 10, p. 3887-3892, Oct. 1998.

MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: editora Holos, 2001. 202 p.

MENDONÇA, A. T. **Identificação e Estudo das Características Fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae* Presentes em Fermentação Espontânea de Cana-de-açúcar**. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MONTROCHER, R.; VERNER, M. C.; BRIOLAY, J.; GAUTIER, C.; MARMEISSE, R. Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphism of rDNA spacer sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 48, n. 1, p. 295-303, Jan. 1998.

MORAIS, P. B.; HAGLER, A N.; ROSA, C. A; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; KLACZKO, L. B. Yeast associated with *Drosophila* in tropical forests of Rio de Janeiro, Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 11, p. 1150-1155, Nov. 1992.

MORAKILE, G.; KOCK, J. L. F.; VAN ZYL, W.; POHL, C. H.; VILJOEN, B. C. Differentiation of Brewing and Related Yeast Based on PCR Amplification and Restriction Fragment Length Polymorphism of Ribosomal DNA. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 108, n. 2, p. 164-168, 2002.

NAUMOV, G. I. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Journal of Industrial Microbiology**, Hampshire, v. 17, n. 3/4, p. 295-30, Sept./Oct. 1996.

NAUMOV, G. I.; JAMES, S. A.; NAUMOVA, E. S.; LOUIS, E. J.; ROBERTS, I. N. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Basingstoke, v. 50, n. 5, p. 1931-1942, Sept. 2000.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; GAILLARDIN, C. Genetic and karyotypic identification of wine *Saccharomyces bayanus* yeast isolated in France and Italy. **Systematic Applied Microbiology**, Jena, v. 16, n. 2, p. 272-279, July 1993.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; HAGLER, A N.; MENDONÇA – HAGLER, L. C.; LOUIS, E. J. A new genetically isolated population of the *Saccharomyces sensu stricto* complex from Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 67, n. 4, p. 351-355, 1995a.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; KORHOLA, M. Genetic identification of natural *Saccharomyces sensu stricto* yeasts from Finland, Holland and Slovakia. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 61, n. 3, p. 237-243, Apr. 1992b.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; LANTTO, R. A.; LOUIS, E. J.; KORHOLA, M. Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its

sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus*: electrophoretic karyotypes. **Yeast**, Sussex, v. 8, n. 8, 599-612, Aug. 1992a.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; LOVIS, E. J. Two new genetically isolated populations of the *Saccharomyces sensu stricto* complex from Japan. **Journal of General Applied Microbiology**, Tokyo, v. 41, n. 6, p. 499-505, Dec. 1995b.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; SANCHO, E. D. Genetic reidentification of *Saccharomyces* strains associated with black knot disease of trees in Ontario and *Drosophila* species in California. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, n. 4, p. 335-339, Apr. 1996c.b

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; SANCHO, E. D.; KORHOLA, M. Polymeric *SUC* genes in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 135, n. 1, p. 31-35, Jan. 1996b.c

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; SNIEGOWSKI, P. D. *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* are associated with exudates of North American oaks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, n. 11, p. 1045-1050, Nov. 1998.

NAUMOV, G. I.; NGUYEN, H. U.; NAUMOVA, E. S.; MICHEL, A.; AIGLE, M.; GAILLARDIN, C. Genetic identification of *Saccharomyces bayanus var. uvarum*, a cider-fermenting yeast. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 3, p. 163-171, May 2001.

NAUMOVA, E. S.; KORSHUNOVA, I. V.; JESPERSEN, L.; NAUMOV, G. I. Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 3, n. 2, p. 177-184, Apr. 2003.

ODA, Y.; YABUKI M.; TONOMURA K.; FUKUNAGA M. Sequence analysis of 18S – 28S rRNA spacer regions from *Saccharomyces kunashirensis*, *S. martiniae*, *S. rosinii* and *S. transvaalensis*. **Current Microbiology**, New York, v. 38, n. 1, p. 61-63, Jan. 1999.

PERPÉTE, P. Amplified Fragment Length Polymorphism, a New Method for the Analysis of Brewer's Yeast DNA Polymorphism. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, St. Paul, v. 59, n. 4, p. 195-200, 2001.

QUEROL, A.; RAMON, D. The application of molecular techniques in wine microbiology. **Trends Food Science Tecnology**, v. 7, n. 3, p. 73-78, 1996.

ROSINI, G. F.; FEDERICI, A. F.; VAUGHAN-MARTINI, A. Systematics of the species of the yeast genus *Saccharomyces* associated with the fermentation industry. **European Journal Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 15, n. 2, p. 188-193, Feb. 1998.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 827 p.

VALENTE, P.; GOUVEIA, F. C.; LEMOS, G. A.; PIMENTEL, D.; ELSAS, J. D.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* culturas. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 137, n. 2/3, p. 253-256, Apr. 1996.

VAUGHAN-MARTINI, A. *Saccharomyces barnetti* and *Saccharomyces spencerorum*: two new species of *Saccharomyces sensu lato* (van der walt). **Antonie van Leeuwenhoek**, Ddordrecht, v. 68, n. 2, p. 111-118, Feb. 1995.

VAUGHAN-MARTINI, A.; KURTZMAN, C. P. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 35, n. 4, p. 508-511, 1985.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. A taxonomic key for the genus *Saccharomyces*. **Systematic Applied Microbiology**, Jena, v. 16, n. 1, p. 113-119, Apr. 1993.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A.; CARDINALI, G. Electrophoretic karyotyping as a taxonomic tool in the genus *Saccharomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 63, n. 2, p. 145-156, Feb. 1993.

VAZQUEZ, F. J. L. H.; CAZORLA, L. M.; JIMENEZ, J. M. C.; VICO, F. R. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5. 8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 3-9, 2003.

VEZINHET, F.; BLONDIN, B.; HALLET, J. N. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tool for identification of enological

strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 32, n. 5, p. 568-571, Feb. 1990.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols. a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

YARROW, D.; VAN DER WALT, J. P. Methods for the isolation, maintenance classification and identification of yeast. In: KREGER-van Rij, N. J. W. (Ed.). **The Yeast – a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984. p. 47-104.